

**YONCA (*Medicago sativa* L.)' DA DOKU KÜLTÜRÜ
ÇALIŞMALARI ve *Agrobacterium tumefaciens*
ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI**
(Doktora Tezi)

133418

Semiha ERİŞEN

**DOKTORA TEZİ
(BİYOLOJİ EĞİTİMİ)**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

133418

**Aralık 2003
ANKARA**

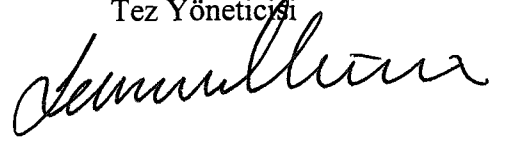
Semiha ERİŞEN tarafından hazırlanan YONCA (*Medicago sativa* L.)' DA DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI ve *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI adlı bu tezin Doktora Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.



Prof. Dr. ORHAN ARSLAN

Yrd. Doç. Dr. SEMRA MİRİCİ

Tez Yöneticisi



Bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:

: Prof. Dr. Sebahattin Özcan



Üye

: Prof. Dr. Orhan Arslan



Üye

: Prof. Dr. Fatma Ünal



Üye

: Doç. Dr. Cengiz Sancar

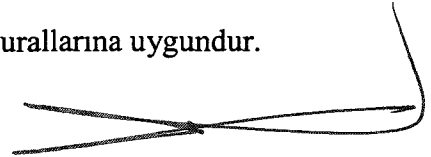


Üye

: Yrd. Doç. Dr. Şenol Bal



Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	ix
RESİMLERİN LİSTESİ	x
EKLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	9
2.1. Kuramsal Temeller	9
2.1.1. Bitkilere gen aktarımı	9
2.1.2. Adventif sürgün rejenerasyonu	15
2.2. Kaynak Araştırması	18
2.2.1. Adventif sürgün rejenerasyonu ile ilgili çalışmalar	18
2.2.2. Gen aktarımı ile ilgili çalışmalar	25
3. MATERYAL VE METOT	31
3.1. Materyal	31
3.1.1. Bitki materyali	31
3.1.2. Bakteri Materyali	31
3.2. Metot	32
3.2.1. Bitki doku kültürleri	32
3.2.2. Bakteri kültürleri	35

3.3. Non-onkogenik <i>A. tumefaciens</i> Aracılığıyla Yoncaya Gen Aktarımı ..	37
3.4. Histokimyasal Gus Analizi	37
3.5. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi	38
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	39
4.1. Adventif Sürgün Rejenrasyonu ile İlgili Bulgular	39
4.1.1 Verco çeşidinde BAP ve NAA' in adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi	39
4.1.2. Yonca çeşitlerinden somatik embriyogenesis yoluyla adventif sürgün eldesi	44
4.1.3. Verco çeşidinde MS ve Bsh temel besin ortamlarında adenin, kinetin ve 2,4-D'nin somatik embriyogenesis yoluyla adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi	52
4.1.4. Verco çeşidinde MS, Bsh ve SH temel besin ortamlarında 2,4-D, kinetin ve BAP'ün somatik embriyogenesis aracılığıyla adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi	58
4.1.5. Verco çeşidinin farklı eksplantlarından somatik embriyogenesis yoluyla adventif sürgün eldesi	73
4.1.6. Yonca çeşitlerine ait üçlü yaprak eksplantından somatik embriyogenesis yöntemiyle adventif sürgün eldesi	78
4.1.7. Verco çeşidinde TDZ'un adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi..	81
4.2. <i>A. tumefaciens</i> Aracılığıyla Yonca'ya Gen Aktarımı	86
4.2.1. Farklı <i>A. tumefaciens</i> hatları ile Verco çeşidinin yaprak eksplantına gen aktarımı	86
4.2.2. Farklı <i>A. tumefaciens</i> hatları ile Verco çeşidinin yaprak sapı eksplantına gen aktarımı	87
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	92
5.1. Yoncada Adventif Sürgün Rejenrasyonu.....	92
5.2. A. Tumefaciens Aracılığıyla Yoncaya Gen Aktarımı.....	98
KAYNAKLAR	101
EKLER.....	111
ÖZGEÇMİŞ.....	113

**YONCA (*Medicago sativa* L.)' DA DOKU KÜLTÜRÜ
ÇALIŞMALARI ve *Agrobacterium tumefaciens*
ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI
(Doktora Tezi)**

Semiha ERİŞEN

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Aralık 2003**

ÖZET

Bu araştırmada bazı ticari yonca (*Medicago sativa* L.) çeşitlerinde ve hatlarında adventif sürgün rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarımına yönelik çalışmalar yürütülmüştür. Adventif sürgün rejenerasyonunda farklı besin ortamlarında (MS, Bsh, SH) değişik bitki büyümesini düzenleyiciler (BAP, NAA, kinetin, adenin, 2,4-D ve TDZ) ve onların farklı konsantrasyonları değişik eksplant kaynaklarında denenmiştir. Yapılan denemelerde yaprak eksplantının en yüksek sıklıkla adventif sürgün rejenerasyonu oluşturan eksplant olduğu belirlenmiştir. Ayrıca çeşitler arasında en yüksek sıklıkla adventif sürgün rejenerasyonu oluşturan çeşidin % 33,33 ile Vercos çeşidi olduğu ve en uygun besin ortamının Bsh olduğu tespit edilmiştir. Denenen bitki büyümesini düzenleyicilerinden ise somatik embriyo oluşumunda 2,4-D ve kinetinin, embriyolardan sürgün gelişiminde ise hormon içermeyen ortamların etkili olduğu ve en uygun ortamın 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortam olduğu belirlenmiştir. Adventif sürgün rejenerasyonu çalışmalarında test edilen çeşitler arasında en başarılı sonuçların alındığı Vercos çeşidinin yaprak ve yaprak sapı eksplantlarına 3 farklı *A. tumefaciens* hattı (EHA 105, LBA4404, GV 2260) ile gen aktarım çalışması yapılmıştır. Çalışmalarda katı ve sıvı ko-kültüvasyon ortamları kullanılarak yapılan farklı sürelerde ko-kültüvasyon uygulamaları sonucunda sadece yaprak eksplantında

GV2260 hattında katı ko-kültüvasyon ortamında ve 2 günlük ko-kültüvasyon uygulamasından GUS pozitif embriyo veren eksplant elde edilmiştir. Transformasyon sıklığı %2,68 olarak tespit edilmiştir.

Bilim Kodu : 5001018
Anahtar Kelimeler : *Medicago sativa* L., yonca, somatik embriyogenesis, gen aktarımı, *A. tumefaciens*
Sayfa Adedi : 113
Tez Yöneticisi : Prof.Dr. Orhan ARSLAN
Yrd.Doç.Dr. Semra MİRİCİ

TISSUE CULTURE and GENE TRANSFER
by *Agrobacterium tumefaciens* in ALFALFA (*Medicago sativa* L.)
(Ph. D. Thesis)

Semiha ERİŞEN

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
December 2003

ABSTRACT

The study was carried out using commercial cultivars of alfalfa (*Medicago sativa* L.) aiming at shoot regeneration and transformation using *Agrobacterium tumefaciens* under *in vitro* conditions. MS, Bsh and SH media containing various concentrations and combinations of BAP, NAA, kinetin, adenine, 2,4-D and TDZ were used to achieve the purpose. Leaf explant was found most favorable for shoot regeneration. Highest shoot regeneration frequency of 33,33% was achieved with cultivar Verco on Bsh media. The best somatic embryo formation was recorded on media containing 4 mg/l 2,4-D and 1 mg/l kinetin with best development of embryos on media containing no plant growth regulators. Leaf and petiole explant of cultivar Verco were treated with EHA105, LBA4404 and GV2260 strains of *A. tumefaciens* both on liquid and solid co-cultivation media. GUS positive embryos with frequency of 2,68% were observed from leaf explant of cultivar Verco when co cultivated on solid media using GV2260 strain of *A. tumefaciens*.

Science Code : 5001018

Key Words : *Medicago sativa* L., alfalfa, somatic embriyogenesis, gene transfer, *A. tumefaciens*

Page Number : 113

Adviser : Prof.Dr. Orhan ARSLAN
Yrd.Doç.Dr. Semra MİRİCİ

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli bilgileri ve yardımları ile bana yol gösteren danışman hocalarım Prof. Dr. Orhan ARSLAN ve Yrd. Doç. Dr. Semra MİRİCİ ile çalışmanın her safhasında desteğini gördüğüm ve laboratuvar imkanlarını sunan Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN'a ve TİK üyesi Yrd. Doç. Dr. Şenol BAL'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Yine, çalışmalarımı yürüttüğüm A.Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölüm Başkanı Prof. Dr. Celal ER'e, çalışmada kullanılan tohumları sağlayan Prof. Dr. Suzan ALTINOK'a, tez çalışmalarımın her aşamasında yardımcı olan Doç. Dr. Cengiz SANCAK'a, laboratuvar çalışmaları, istatistiklerin yapılması ve sonuçların fotoğraflanmasında yardımlarını gördüğüm Arş. Gör. Satı ÇÖÇÜ, Dr. Khalid Mahmood KHAWAR, İskender PARMAKSIZ ve Dr. Serkan URANBEY ile teknisyen Hüseyin KALYONCU'ya teşekkürü bir borç bilirim. Son olarak tez çalışmalarım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen değerli eşim Dr.Yavuz ERİŞEN'e ve kızım İpek'e bana gösterdiği anlayıştan dolayı teşekkür ederim.

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge		Sayfa
Çizelge 1.1.	Türkiye yem bitkileri ekiliş ve üretimi	2
Çizelge 2.1.	<i>A. tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarılmış bazı önemli bitki türleri	10
Çizelge 2.2.	Gen aktarımında kullanılan bazı seçici işaret genleri.....	14
Çizelge 3.1.	Bakteri hatları ve özellikleri	31
Çizelge 3.2.	Çalışmalarda kullanılan ortamlarda bulunan besin maddeleri ve konsantrasyonları.....	33
Çizelge 3.3.	Kullanılan büyüme düzenleyicileri ve çözücüler	34
Çizelge 3.4.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> hatlarının büyütülmesinde kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları...	36
Çizelge 3.5.	Gen aktarımı yapılan dokuların seleksiyonunda kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları.....	36
Çizelge 4.1.	Farklı BAP ve NAA dozlarının Verco çeşidinin yaprak, yaprak sapı ve hipokotil eksplantlarından kallus oluşumuna etkisine ait varyans analizi	39
Çizelge 4.2.	Farklı BAP ve NAA dozlarının Verco çeşidinin yaprak, yaprak sapı ve hipokotil eksplantlarından kallus oluşumu ve adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait Duncan Testi sonuçları	41
Çizelge 4.3.	Farklı yonca çeşitlerinin yaprak, yaprak sapı, gövde ve hipokotil eksplantlarından kallus oluşumu ve adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi	47
Çizelge 4.4.	Farklı yonca çeşitlerinin yaprak, yaprak sapı, gövde ve hipokotil eksplantlarından kallus oluşumuna etkisine ait Duncan Testi sonuçları.....	49
Çizelge 4.5.	Farklı yonca çeşitlerinin yaprak, yaprak sapı, gövde ve hipokotil eksplantlarından somatik embriyogenesis yoluyla adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait Duncan Testi sonuçları.....	51

Çizelge 4.6.	Verc0 çeşidinde farklı eksplantların MS ve Bsh temel besin ortamlarında adenin, kinetin ve 2,4-D'nin farklı dozlarının kallus ağırlığı ve adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi	53
Çizelge 4.7.	Verc0 çeşidinde MS ve Bsh temel besin ortamlarında adenin, kinetin ve 2,4-D'nin farklı dozlarında kullanılan eksplantların kallus ağırlığına etkisine ait Duncan Testi sonuçları.....	54
Çizelge 4.8.	Verc0 çeşidinde farklı eksplantların MS ve Bsh temel besin ortamlarında adenin, kinetin ve 2,4-D'nin farklı dozlarının kallus ağırlığı ve embriyo oluşturan eksplant yüzdesi bakımından TBO x ortam arasındaki etkileşimine ait Duncan Testi sonuçları	55
Çizelge 4.9.	Verc0 çeşidinde farklı eksplantların MS ve Bsh temel besin ortamlarında adenin, kinetin ve 2,4-D'nin farklı dozlarının eksplant başına embriyo sayısı ve eksplant başına sürgün sayısına etkisine ait Duncan Testi sonuçları .	57
Çizelge 4.10.	Verc0 çeşidinde yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında MS, Bsh ve SH temel besin ortamlarında 2,4-D, kinetin ve BAP'ün kallus oluşumu ve somatik embriyogenesis aracılığıyla adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi	62
Çizelge 4.11.	Verc0 çeşidinde yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında MS, Bsh ve SH temel besin ortamlarında 2,4-D, kinetin ve BAP'ün TBO x ortam x eksplant etkileşiminin kallus oluşturan eksplant yüzdesine etkisine ait Duncan Testi sonuçları	63
Çizelge 4.12.	Verc0 çeşidinde yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında MS, Bsh ve SH temel besin ortamlarında 2,4-D, kinetin ve BAP'ün TBO x ortam etkileşiminin kallus ağırlığına etkisine ait Duncan Testi sonuçları	64
Çizelge 4.13.	Verc0 çeşidinde yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında MS, Bsh ve SH temel besin ortamlarında 2,4-D, kinetin ve BAP'ün TBO x eksplant etkileşiminin kallus ağırlığına etkisine ait Duncan Testi sonuçları	64
Çizelge 4.14.	Verc0 çeşidinde yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında MS, Bsh ve SH temel besin ortamlarında 2,4-D, kinetin ve BAP'ün eksplant x ortam etkileşiminin kallus ağırlığına etkisine ait Duncan Testi sonuçları	65

Çizelge 4.15.	Verc0 çeşidinde yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında MS, Bsh ve SH temel besin ortamlarında 2,4-D, kinetin ve BAP'ün embriyo oluşturan eksplant yüzdesine etkisine ait Duncan Testi sonuçları	67
Çizelge 4.16.	Verc0 çeşidinde yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında MS, Bsh ve SH temel besin ortamlarında 2,4-D, kinetin ve BAP'ün TBO x ortam etkileşiminin eksplant başına embriyo ve sürgün sayısına etkisine ait Duncan Testi sonuçları	69
Çizelge 4.17.	Verc0 çeşidinde yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında MS, Bsh ve SH temel besin ortamlarında 2,4-D, kinetin ve BAP'ün eksplant x TBO etkileşiminin eksplant başına embriyo ve sürgün sayısına etkisine ait Duncan Testi sonuçları	70
Çizelge 4.18.	Verc0 çeşidinde yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında MS, Bsh ve SH temel besin ortamlarında 2,4-D, kinetin ve BAP'ün eksplant x ortam etkileşiminin eksplant başına embriyo ve sürgün sayısına etkisine ait Duncan Testi sonuçları	72
Çizelge 4.19.	Verc0 çeşidinin farklı eksplantlarının kallus oluşumu ve somatik embriyogenesis yoluyla adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi	76
Çizelge 4.20.	Verc0 çeşidinin farklı eksplantlarının kallus oluşumu ve somatik embriyogenesis yoluyla adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait Duncan Testi sonuçları	77
Çizelge 4.21.	Farklı yonca çeşitlerinin üçlü yaprak eksplantında kallus oluşumu ve somatik embriyogenesisin adventif sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi	79
Çizelge 4.22.	Farklı yonca çeşitlerinin üçlü yaprak eksplantında kallus oluşumu ve somatik embriyogenesisin adventif sürgün rejenerasyonuna ait Duncan Testi sonuçları.....	80
Çizelge 4.23.	Farklı TDZ dozlarının Verc0 çeşidinin yaprak, kotiledon ve hipokotil eksplantlarında kallus oluşumu ve adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi	82
Çizelge 4.24.	Farklı TDZ dozlarının Verc0 çeşidinin yaprak, kotiledon ve hipokotil eksplantlarında kallus oluşumuna etkisine ait Duncan Testi sonuçları	83

Çizelge 4.25.	Farklı TDZ dozlarının Verco çeşidinin yaprak, kotiledon ve hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait Duncan Testi sonuçları.....	85
Çizelge 4.26.	Farklı <i>A. tumefaciens</i> hatları ile Verco çeşidinin yaprak eksplantına gen aktarımı	86
Çizelge 4.27.	Farklı <i>A. tumefaciens</i> hatları ile Verco çeşidinin yaprak sapı eksplantına gen aktarımı	89



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Yoncanın kök, yaprak, üreme organları ve tohumunun genel görünüşü.....	3
Şekil 2.1. T-DNA aktarım mekanizması.....	12



RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Verco çeşidinin yaprak eksplantında BAP ve NAA'nın somatik embriyo oluşumu ve adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	43
Resim 4.2. Verco çeşidinin yaprak eksplantı üzerinde oluşan açık renkli ve şeffaf kalluslarında 11 mg/l 2,4-D ve 0,2 mg/l kinetin içeren SH ortamında somatik embriyo gelişimi.....	45
Resim 4.3. Verco çeşidinde somatik embriyolardan MS0 ortamında gelişen bitkiciklerde kök ve gövde oluşumu	46
Resim 4.4. Kültür başlangıcından 10-12 hafta sonra Verco çeşidine ait yaprak eksplantlarından somatik embriyo oluşumu.....	59
Resim 4.5. Verco çeşidinde yaprak eksplantında somatik embriyolardan Bsh0 ortamında gelişen bitkicikler.....	60
Resim 4.6. Verco çeşidine ait yaprak sapı eksplantlarında 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren MS ortamında somatik embriyo oluşumu.....	66
Resim 4.7. Verco çeşidine ait yaprak eksplantlarında kallus oluşumu ve somatik embriyo gelişimi.....	74
Resim 4.8. Verco çeşidinin yaprak eksplantlarında somatik embriyolardan bitkicik gelişimi.....	75
Resim 4.9. Verco çeşidine ait yaprak eksplantına GV2260 bakteri hattı ile gen aktarımı ve histokimyasal GUS analizi.....	88

EKLERİN LİSTESİ

Ek		Sayfa
Ek-1	Yoncanın önemi hakkında internetten alınan bilgi.....	112



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler ve Kısaltmalar	Açıklama
Adenin	Adenin sülfat
BAP	6-benzylaminopurine
Bsh	Modifiye Gamborg's temel besin ortamı
Boi2y	Modifiye Blaydes temel besin ortamı
2,4-D	2,4-dichloropophenoxyacetic acid
EDTA	Ethylenediaminetetra acetic acid
GUS	β -glucuronidase
K.O.	Karaler Ortalaması
Kinetin	6-furfil aminopurine
Km	Kanamisin
MS	Murashige ve Skoog temel besin ortamı
NA	Nutrient Agar
NAA	α -Naphthaleneacetic acid
NB	Nutrient Broth
NPT-II	Neomycin-phosphotransferase-II
Npt-II	Neomycin-phosphotransferase-II geni
Onc	Oncogenes
PEG	Polyethilene glucol
S.D.	Serbestlik Derecesi
SH	Schenk ve Hildebrandt temel besin ortamı
T-DNA	Transfer DNA
TDZ	Thidazuron
Tn	Transposon
Vir	Virulens geni

1. GİRİŞ

Çok sayıda bitki grubunu içine alan baklagiller (Fabaceae Syn: Leguminosae) bitkiler aleminin en kalabalık familyalarından biridir. Bu familyaya ait üç alt familya, yaklaşık 600 cins, 15 000'e yakın tür olduğu bilinmektedir. Baklagillerin sahip olduğu bu zengin çeşitlilik onların insan gıdası, hayvan yemi, süs bitkisi, yeşil gübre, yağ ve endüstri ham maddesi gibi birçok alanda kullanılmalarını sağlamıştır.

İnsan beslenmesinin temel maddelerinden biri de bitkisel ve hayvansal kaynaklı proteinlerdir. Hayvansal kaynaklı proteinler üstün kaliteli proteinlerdir. Kolay sindirildikleri ve sindirimde fazla kayba uğramadıkları için ayrı bir öneme sahiptirler. Ayrıca, yeterli miktarda alınmadıklarında gelişim bozuklukları ve çeşitli sağlık sorunları ortaya çıkmaktadır. Bu nedenlerden ötürü hayvansal üretime dolayısıyla hayvancılığa gereken önemin verilmesi insanlığın geleceği ve sağlığı için mutlak gereklidir. Hayvancılıkta istenilen hedeflere ulaşmak; hayvanların beslenmeleri ve belli düzeylerde hayvansal ürünler elde etmek ancak yeterli miktarda ve kalitede yem ihtiyaçlarının karşılanmasıyla mümkündür.

Baklagil yem bitkileri hayvan beslenmesinde büyük öneme sahiptir. Yapılan tahminlere göre, hayvanların tükettiği proteinin %38'i, lipidlerin %16'sı karbonhidratların %5'i baklagil yem bitkilerinden sağlanmaktadır (1). Baklagil yem bitkileri aynı zamanda morfolojik, ekolojik ve tarımsal karakterler bakımından da oldukça önemlidirler. Bu önemin farkında olan gelişmiş ülkelerde yem bitkileri tarımı, toplam ekili alanın %25-30'unu kapsarken, bu oran ülkemizde ancak % 3,2 civarındadır (2). Türkiye'de yem bitkileri ekiliş ve üretim miktarları Çizelge 1.1.'de verilmiştir (3).

Dünya tarımının en önemli materyalini teşkil eden baklagil yem bitkilerinin tarımı tarihin eski devirlerinden beri yapılmaktadır. Ortadoğu'da yapılan M.Ö. 8000-6000 yıllarına ait kazılarda, fiğ ve burçak tohumlarının bulunması bunun bir kanıtıdır (1). Yoncanın yem bitkisi olarak kullanılması ile ilgili en eski tarihi

Çizelge 1. 1. Türkiye yem bitkileri ekiliş ve üretimleri

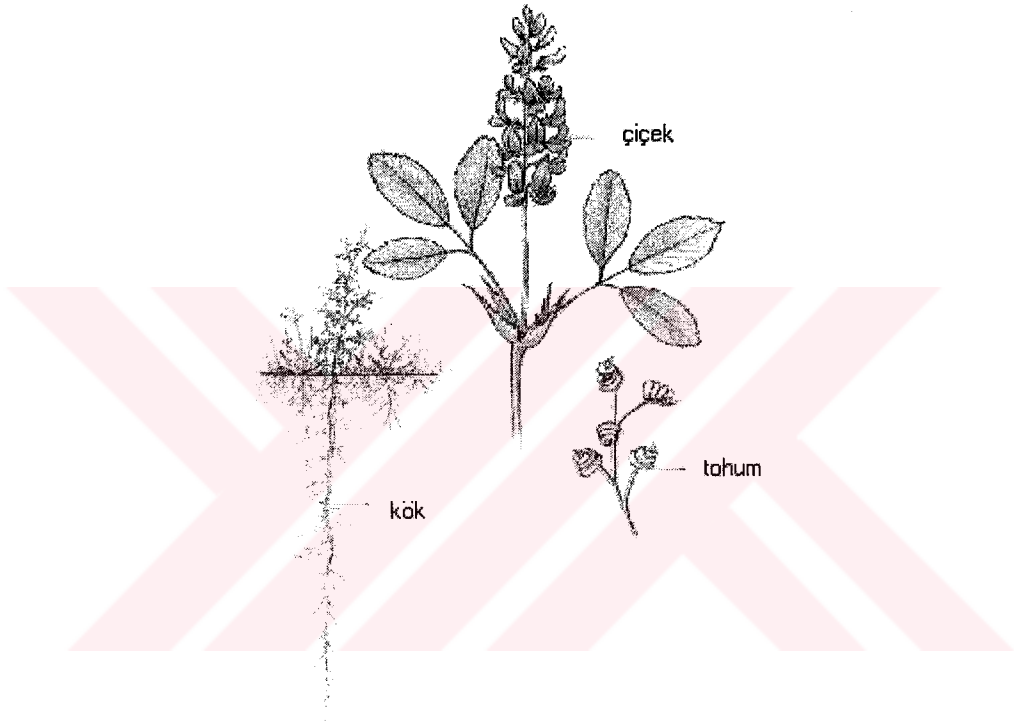
YILLAR	1997		1998		1999		2000		2001	
BİTKİLER	Ekiliş (ha)	Üretim (ton)	Ekiliş (ha)	Üretim (ton)	Ekiliş (ha)	Üretim (ton)	Ekiliş (ha)	Üretim (ton)	Ekiliş (ha)	Üretim (ton)
MISIR	545 000	576 000	550 000	680 000	448 412	640 000	511 795	700 000	517 951	710 000
FIĞ	252 000	646 000	235 000	665 000	232 584	700 000	205 051	656 000	239 370	730 000
BURÇAK	8 100	3 534	6 000	3 000	1 970	2 550	1 498	1 160	1 028	1 255
YONCA	215 500	3 271 930	230 000	3 302 260	245 606	3 236 890	250 800	3 348 900	249 000	3 339 910
KORUNGA	82 500	462 830	93 000	555 900	94 362	497 140	107 500	531 938	105 500	538 925
TOPLAM	1 105 100	4 960 294	1 114 000	5 206 160	1 022 934	5 076 580	1 076 644	5 237 998	1 112 849	5 375 090

kayıtlar M.Ö. 1200-1400 yıllarında Çorum Alacahöyük bölgesinde Hititler tarafından yetiştirildiğini, diğer tarihi kayıtlarda ise M.Ö. 7000 yıllarında Dicle ve Fırat nehirleri boyunca Sümer askerleri ile Mezopotamya'ya, buradan da gemilerle Doğu Akdeniz'e götürüldüğünü göstermektedir (4).

Yonca (*Medicago sativa* L.) dünyada en çok yetiştirilen yem bitkisidir. Bazı ülkelerdeki ekim alanı toplam ekim alanının 1/4'ünü oluşturmaktadır. Yurdumuzda ise toplam ekilebilir alan içindeki payı %0,8'dir. Ülkemizin her bölgesinde yetiştirilen yonca baklagiller familyasının Papilionaceae alt familyasının trifoliae oymağına aittir. Yonca cinsine bağlı 60 kadar tür vardır. Davis'e göre ülkemizde 30 yonca türü bulunmaktadır. Bu türlerin en önemlisi olan *Medicago sativa* L. yonca tarımının % 90-95'ini oluşturmaktadır (5,6).

Yoncanın morfolojik özellikleri türden türe büyük değişiklikler göstermektedir. Genel olarak 1, 2 veya çok yıllık otsu, nadiren çalimsı olan yoncanın yaprakları tipik olarak 3 yaprakçıktan oluşur. Toprağın derinliklerine inebilen, silindirik yapılı kazık kökü vardır. Dik olarak gelişen sap, yetiştirme koşullarına bağlı olarak 30-120 cm kadar boylanabilir. Çiçekler sapçıklar üzerinde bir araya gelerek gevşek bir salkım oluşturur. Meyveler ise sarmal biçimde 1-5 kez kendi üzerine kıvrılmış bir yapıdadır (Şekil 1.1). Temel kromozom sayısı $x=8$ olan yoncanın diploid ($2n=16$), tetraploid ($2n=32$), hekzaploid ($2n=48$) formları

mevcuttur. Bu grupların oluşumunda poliploidinin etkili olduğu, melezleme ve sitogenetik çalışmalarla gösterilmiştir. Bugün dünyada yetiştirilen çok yıllık yonca çeşitleri iki ana türden gelişmiştir. Bu türler *Medicago sativa* L. ve *Medicago falcata* L'dır.



Şekil 1.1. Yoncanın kök, yaprak, üreme organları ve tohumun genel görünüşü.

Yem bitkilerinin kraliçesi olarak adlandırılan yonca, tarımı yapılan tüm yem bitkilerinden daha yüksek bir yem değerine sahiptir. Yoncanın sahip olduğu üstün nitelikleri şöyle sıralayabiliriz.

*Yonca geniş bir uyum yeteneğine sahiptir.

Dünyada soğukların $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye ulaştığı Sibiry ve Alaska bölgeleriyle, sıcaklığın $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar yükseldiği kurak bölgelerde yetişebilen yonca çeşitleri vardır. Deniz seviyesinden 3000 metre yüksekliğindeki bölgelerde de görülen yoncaya ülkemizin hemen her bölgesinde rastlanmaktadır.

*Yoncanın ot verimi fazladır.

Kök tacındaki gözlerden bol sürgün veren yonca, yem bitkileri içinde en fazla ot verimine sahiptir.

* Yonca otu yüksek besin değerine sahiptir.

Çiftlik hayvanları için çok lezzetli, besleme ve sindirilme değeri yüksek ot üreten yonca yaklaşık %15-22 arasında protein içerir. Ayrıca mükemmel bir vitamin ve mineral kaynağıdır. Yoncanın yaprak içeriğinde bulunan vitamin, mineral ve amino asitler şunlardır;

Vitaminler:

Beta Karoten

Vitamin B-1

Vitamin B-2

Niyasin

Vitamin B-6

Vitamin B-12

Pantotenik asit

Folik asit

Biyotin

P.A.B.A.

Inositol

Choline

Vitamin C

Vitamin E

Vitamin K

Mineraller:

Krom

Kalsiyum

Bakır

Iyot

Demir

Magnesium

Manganez

Molibden

Fosfor

Potasyum

Selenyum

Sodyum

Çinko

Amino Asitler:

Arginin

Alanin

Aspartik asit

Sistein

Glutamik asit

Glisin

Histidin

Izolosin

Lösin

Lizin

Metionin

Fenilalanin

Prolin

Tirozin

Treonin

Valin

* İyi bir ekim nöbeti bitkisidir.

Kendisinden sonra gelen bitkinin verimini arttırdığı gibi kendisi de bol ot vermektedir.

* Yonca uzun ömürlü bir bitkidir.

Çok yıllık türleri bulunan yonca iyi adapte olduğu yerlerde uzun yıllar yaşayabilir. Ayrıca koşullara bağlı olarak 4-8 yıl arasında ürün verebilmektedir.

*Bir mevsimde birden fazla biçilebilir.

Normal yağışlı bölgelerde sulanmaksızın, kurak bölgelerde ise sulamak şartıyla 3-7 defa biçilebilmektedir.

* Yonca meralarda vejetasyonun besleme değerini artırır.

Özellikle yere yatık yabani türlerin kullanıldığı mera tesislerinde besleme değerinin arttığı araştırmalarla kanıtlanmıştır.

Yonca geleneksel olarak hayvan beslenmesinde kullanılmasının yanı sıra değişik amaçlarla da kullanılması gündemdedir. Bunları elektrik üretiminde biyolojik yakıt olarak kullanımı, toprağın azot seviyesinin artırılmasında biyolojik gübre olarak kullanımı, lignin peroksidaz, alfa-amilaz, selüloz ve fitaz gibi endüstriyel enzimlerin üretiminde kullanımı, insan beslenmesi ve hastalıkların tedavisinde kullanılması olarak sıralayabiliriz. Yoncanın romatizma, idrar yolu, böbrek, safra kesesi enfeksiyonları, prostat gibi rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılabileceği aynı zamanda vücudu özellikle akciğerleri temizleyici özelliği olduğu araştırmalarla gösterilmiştir. Hayvanlarla yapılan çalışmalar yoncanın yaprak ve köklerindeki bazı maddelerin anti-viral özelliğe sahip olduğu ve kanser hücrelerinin kontrolünde etkili olduğu da belirtilmiştir (7).

Yonca çok fazla form zenginliği olan bir türdür ve çok geniş toprak ve iklim koşullarına uyum sağlamıştır. Bu nedenle yonca formlarının sahip olduğu varyasyonlar sınırsızdır. Autotetraploidi ($2n=4x$) nedeniyle oldukça karmaşık bir kalıtıma sahiptir. Gametlerinin diploid ($n=2x$) yapısı ıslah çalışmalarını önemli ölçüde etkilemiştir. Buna rağmen yonca ıslahı ile ilgili çalışmalar oldukça başarılıdır (4).

İlk ıslah çalışmaları ABD ve Batı Avrupa ülkelerinde olmuştur. Nemli ve soğuk bölgelerde uygun ve güçlü bir gelişme gösteren Atlantic varyetesi 1940 yılında, bakteriyel solgunluğa dayanıklı olan Ranger varyetesi 1942, Buffalo varyetesi ise 1943 yıllarında elde edilmiştir. 1048 yılında ise Tysdal ve Crandall sentetik varyeteleri geliştirilmiş olup günümüzde piyasadaki yonca varyetelerinin çoğu sentetiktir. Ülkemizde de Kayseri ekotipinde yapılan seleksiyon çalışmaları sonucunda Bilensoy ve Elçi yonca varyeteleri 1950 yıllarında geliştirilmiştir (6).

Hanson ve ark., hastalık ve böcek zararlılarına karşı dayanıklı çeşitlerin ıslahı konusunda ilerlemeler kaydetmişlerdir. 16 jenerasyon boyu sürdürdükleri tekrarlamalı fenotipik seleksiyon ile pas, yaprak sararması, bakteriyel solgunluk gibi özellikleri taşıyan gen havuzları oluşturmuşlardır. Her ne kadar klasik ıslah çalışmaları ile önemli başarılar elde edilse de sonuçlar yetersiz ve yavaştır (4).

Klasik ıslah yöntemlerinin karşılaştığı bir başka sorun da kısırlık ve uyumsuzluk nedeniyle, türler arasında melezlemenin sınırlı olması ve istenilen karakterin bir başka bitki türüne aktarılırken, bağlı genler nedeniyle istenmeyen özelliklerin de yeni bitkiye geçişinin önlenememesidir. Halbuki, genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak bu sorunlarla karşılaşılmadan, bir çeşidin istenen özellikleri muhafaza edilerek ona yeni özellikler kazandıran bir ya da birkaç gen kolaylıkla aktarılabilir (8).

Günümüzde gelişmiş genetik mühendisliği tekniklerinin başarıyla uygulanması sonucunda herbisitlere, böceklerle ve virüslere karşı dayanıklılıkları artırılmış bitkiler elde edilmiştir. Örneğin, *Salmonella typhimurium* dan izole edilen "aro A" ve *Streptomyces hygroscopicus*'dan izole edilen "bar" genlerinin değişik bitki türlerine aktarılmasıyla herbisitlere dayanıklı tütün, patates ve yonca çeşitleri geliştirilmiştir. (9-11). Ayrıca, bazı böceklerin sindirim sistemlerine zarar vererek ölümlerine neden olan toksik proteinleri kodlayan genlerin *Bacillus thuringiensis* (bt)'den izole edilerek bitkilere aktarılmasıyla böceklerle dayanıklı transgenik domates, tütün, pamuk, mısır bitkileri üretilmiştir (12-13). Yine tütün, patates,

domates ve yonca gibi bitkilere virüs kılıf protein genlerinin aktarılmasıyla bu bitkilerde değişik virüs ırklarına dayanıklılık sağlanmıştır (14-15).

Bitki genetik mühendisliğinde önemli olan diğer bir yöntem ise “antisens RNA” tekniğidir. Bu teknik ile belirli protein ve enzimlerin üretiminden sorumlu genlerin etkileri kolayca ortadan kaldırılabilir. Böylece bazı istenmeyen özellikler önlenmektedir. Son yıllarda geliştirilen bu teknik sayesinde hasat edilen domateslerde etilen üretimi engellenerek depolama süreleri uzatılabilmiştir (16).

Bitki hücre ya da dokularına tarımsal öneme sahip genlerin aktarımında doğrudan ve dolaylı olmak üzere birçok biyoteknolojik yöntem kullanılmaktadır. Bugün *A. tumefaciens* aracılığıyla bitkilere dolaylı olarak gen aktarılması ve transgenik bitkilerin elde edilmesi en yaygın kullanılan yöntemdir. Bir gen aktarım sisteminde esas olan, tam bir bitki oluşturabilme yeteneğine sahip hücrelerin kromozomlarına istenilen genleri taşıyan DNA parçasının yerleştirilmesidir (8). Bu nedenle gen aktarımı yapılacak bitki türlerinin adventif sürgün oluşturma yetenekleri önemlidir.

Gen aktarımı yapılacak bitki türlerinde yüksek oranda adventif sürgün oluşumu gen aktarım çalışmalarının başarısını önemli ölçüde etkilemektedir. Bununla birlikte doku kültürü yöntemleri ile laboratuvar şartlarında bir çok bitki çeşidinin hızlı üretilmesi mümkün hale gelmiştir. Ayrıca bitki ıslahçıları için ek bir varyasyon kaynağı olabilecek somatik varyasyonların varlığı da ayrı bir avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle, gen aktarımına başlamadan önce her tür için hatta her çeşit için *A. tumefaciens* ile gen aktarımına uygun bir adventif sürgün rejenerasyon yönteminin geliştirilmesi gerekmektedir.

Yonca geniş adaptasyon yeteneği, yüksek kaliteli yemi, toprağı iyileştirici özelliği nedeniyle ıslahçıların ilgisini çekmiş ve odak noktası olmuştur. Bitki ıslah amaçlarını gerçekleştirmede doku kültürü tekniklerini bir araç olarak kullanabilmek için kültür çeşitleri ve ıslah hatlarının rejenerasyona cevabını ve rejenerantların toprak ortamında yetiştirilmesini başarmak gereklidir.

Gen aktarımı ve rejenerasyona elverişli birkaç yem bitkisinden birisi olan yonca yapay tohum teknolojisinin geliştirilmesinde de model bir bitkidir (17-19).

Bu çalışmada da yonca (*Medicago sativa* L.)'nın ticari çeşitlerinde adventif sürgün rejenerasyonu ve *A. tumefaciens* aracılığıyla etkili gen aktarım yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır.



2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kuramsal Temeller

2.1.1. Bitkilere gen aktarımı

Tarımın başlamasıyla birlikte daha üstün özelliklere sahip çeşitlerin seçilerek yetiştirilmesiyle başlayan ıslah çalışmaları, 1980'li yıllarda *Agrobacterium* aracılığıyla tütün protoplastlarına gen aktarımının gerçekleştirilmesi ile yeni bir boyut kazanmıştır (20). Bu gelişmenin ardından değişik gen aktarım tekniklerinin kullanılması ile 40'ın üzerinde bitki türüne istenilen özellikleri kodlayan genler aktarılmıştır. Günümüzde transgenik bitkilerin ekim alanı 60 milyon hektara ulaşmıştır. Gen aktarımında kullanılan yöntem farklılıklarına rağmen amaç; totipotent hücrelerin (yeni bir bitki oluşturabilecek yeteneğe sahip hücre) kromozomlarına istenilen genleri taşıyan bir DNA parçasının kalıcı olarak yerleştirilmesidir (8,21). Bu amaçla bitkilere gen aktarımı için dolaylı (*A. tumefaciens* aracılığıyla) ve doğrudan gen aktarımı yöntemleri geliştirilmiştir.

Gen aktarımı yapılan hücreden de mutlaka gen aktarılmış bitki (transgenik) elde edilmesi gerekmektedir. *A. tumefaciens* bakterisinin kullanıldığı dolaylı gen aktarım yöntemi sayesinde çok sayıda kültür bitki türünde transgenik bitkiler elde edilmiştir (Çizelge 2.1.). Bu özelliğinden dolayı *A. tumefaciens* bakterisine bitkilerin doğal genetik mühendisi adı verilmiştir (8). Bu teknikle başlangıçta iki çenekli bitkilerde başarıyla gen aktarımı yapılırken, buğdaygilleri de içeren tek çenekli bitkilerde hedeflenen başarıya ulaşılammıştır (22-23). Bu engeli aşmak için elektroporasyon, mikroenjeksiyon ve partikül tabancası gibi doğrudan gen aktarım yöntemleri geliştirilerek tek çenekli bitkilerde de başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Doğrudan gen aktarım teknikleriyle arpa (24), çeltik (25) ve mısır (26) gibi ekonomik önemi yüksek olan buğdaygillerde transgenik bitkiler kolaylıkla üretilenmiştir.

Çizelge 2.1. *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarılmış bazı önemli bitki türleri (27)

Sebzeler	Endüstri Bitkileri
Lahana	Ayçiçeği
Patates	Şeker pancarı
Domates	Kolza
Salatalık	Soya
Havuç	Pamuk
Bezelye	Keten
Brokoli	Hardal
Karnıbahar	Yem Bitkileri
Kuşkonmaz	Yonca
Patlıcan	Gazal Boynuzu
Marul	Aküçgül
Süs ve Tıbbi Bitkiler	Meyve ve Ağaçlar
Petunya	Elma
Tütün	Kavak
Krisentum	Çilek
Geranium	Kavun

2.1.1.1. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı

A. tumefaciens, Rhizobiacea familyasına ait toprak kökenli, gram negatif bir bakteridir. Aynı familyaya dahil olan *A. rhizogenes*, bitkilerde saçak kök oluşumuna *A. tumefaciens* kök boğazı uruna neden olmaktadır. *A. tumefaciens* bitkiyi kök boğazında oluşan yaralardan enfekte ederek, bitki hücrelerinin düzensiz bölünmeler geçirmesine neden olarak tümör (ur) oluşturmaktadır. Başlangıçta kanser tedavisi amacıyla mekanizmanın anlaşılmasına yönelik çalışmalarla gündeme gelen *A. tumefaciens* gen aktarım mekanizmasının anlaşılmasından sonra biyoteknolojide kullanılmaya başlanmıştır.

Yapılan araştırmalar sonunda bakteriden bitki hücresine geçen ve Ti-plazmid (tumour-inducing/tümör oluşturan) üzerinde bulunan bir DNA parçasının (T-DNA) bitkide tümör oluşumuna sebep olduğu belirlenmiştir (28). T-DNA bitki kromozomlarına entegre olduktan sonra taşıdığı genler etkisiyle bitki hücresi içinde yeni enzimler üretilir ve hücrelerin hormon dengesi bozulur. Hormon dengesi

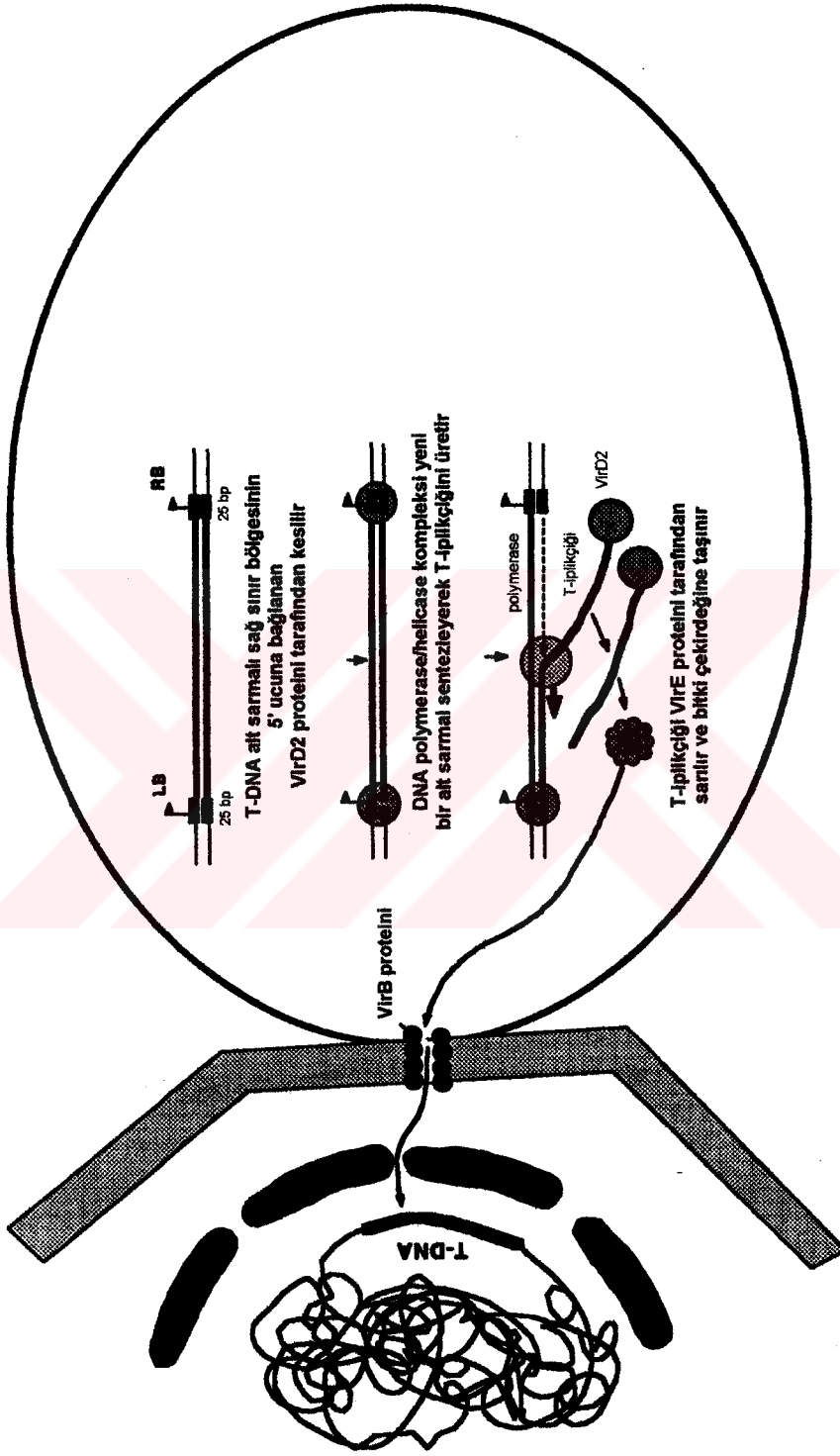
bozulan hücreler hızla ve düzensiz bir şekilde bölünmeye başlayarak tümör meydana getirirler (8).

T-DNA'nın bitki hücresine entegre olabilmesi için T-DNA'yı sağdan sınırlandıran RB (sağ sınır) ve soldan sınırlandıran LB (sol sınır) bölgelerini taşıması gereklidir (29). Bu iki sınır arasına yerleştirilen herhangi bir DNA parçasının kolayca bitki hücresine aktarılabilirdiği gösterilmiştir (30). Üstelik, tümör meydana getiren genlerin, T-DNA bölgesinden kesici enzimler ile kesilerek çıkarılmasının bitki hücresine olan gen aktarımını hiçbir şekilde etkilemediği çalışmalar sonucunda ortaya konmuştur (31). Tümör oluşturan genleri çıkarılan Ti-plazmidleri non-onkogenik (tümör oluşturmeyen) Ti-plazmidler olarak adlandırılmaktadır (8). Araştırmalar, T-DNA'nın sağ sınır nükleotid dizisinin gen aktarımında mutlak gerekli olduğunu ortaya koyarken, sol sınırdaki parça eksilmelerinin bakteriden bitki hücresine genetik materyal aktarımını etkilemediğini göstermiştir (32).

Bitki hücresine gen aktarımında rol oynayan ikinci unsur; T-DNA'nın dışında ve sol sınıra yakın olan, yaklaşık 35 kb uzunluğundaki "virulens (*vir*)" bölgesidir. Yapılan araştırmalar *vir* bölgesinin altı ana genden (*VirA*, *VirB*, *VirC*, *VirD*, *VirE* ve *VirG*) oluştuğunu göstermiştir (33). *Vir* genleri; yaralanmış bitki hücrelerinin salgıladığı fenolik bileşikler tanıma, T-DNA iplikçisinin rejenerasyonu, T-DNA'nın bakteriden bitki hücresine hareketinde etkili olmaktadır (34).

Gen aktarımında etkili olan üçüncü unsur *Agrobacterium*'un kendi kromozomu üzerinde yer alan üç adet lokus (*chvA*, *chvB*, *pscA*)'dur. Bu lokusların kodladığı ürünler bakterinin bitki hücresine tutunmasında önemli rol oynamaktadır (35).

T-DNA aktarım mekanizması özetle şöyledir (Şekil 2.1); *Agrobacterium*, yaralanan bitki hücresinin hücre duvarına bitki tarafından salgılanan fenolik bileşiklerin sinyalleri sayesinde tutunur (36). Bitkinin hücre duvarına tutunan bakteri içerisine fenolik bileşiklerin girmesi ile *vir* genleri aktif hale gelir (37-39). T-DNA'nın alt sarmalına homolog, tek sarmal bir DNA molekülü (T-iplikçisi) üretilir ve bitki



Şekil 2.1. T-DNA aktarım mekanizması (8)

hücrelerine aktarılır. Bitki hücrelerine giren T-iplikçisi bir veya bir kaç kopya halinde rastgele bitkinin kromozomuyla birleşir. Son aşamada ise bitki DNA'sı onarılır ve T-iplikçisinin çift zincirli dönüşümü için replikasyon gerçekleşir (40,41,21).

2.1.1.1.1. Ti plazmidlerinin bitkilere gen aktarımında kullanılması

Onkogenik Ti-plazmidlerini taşıyan *A. tumefaciens* hatları ile gen aktarımı yapıldığında, gen aktarımı yapılan bitki dokularında fitohormonlar sentezlenir. Böylece gen aktarılan bitki hücreleri *in vitro* koşullarda fitohormonlara ihtiyaç duymadan geliştikleri için transgenik materyal tanınması mümkün olur. Ancak, bu yolla gen aktarımı yapıldığında anormal bitkiler gelişmektedir (42). Non-onkogenik Tİ-plazmidi ile T-DNA aktarımı yapılmış bitki hücreleri ise diğer hücreler gibi davrandığından seçilmeleri olanaksızdır. Bu sorun markör (işaret) genlerin kullanılması ile ortadan kaldırılmıştır. İşaret genleri aktarıldığı bitki hücre ve dokularının antibiyotik veya herbisite karşı dayanıklı olmasını sağlamaktadır. Bu sayede antibiyotik veya herbisitleri içeren seçici ortamlarda sadece seçici işaret genleri taşıyan bitki hücrelerin gelişmesi sağlanacaktır. Çizelge 2.2.'de gen aktarımında kullanılan bazı seçici işaret genleri verilmiştir.

Seçici işaret genlerle birlikte gen aktarımı yapılan hücre ve dokuların belirlenmesinde raportör genler de kullanılmaktadır. Örneğin, β -glucuronidase (GUS) markör genini taşıyan transgenik bitki dokuları X- Gluc içerisinde GUS aktivitesinin histokimyasal lokalizasyonu ile belirlenebilmektedir (8). Ayrıca, Southern blot ya da PCR gibi moleküler tekniklerle aktarılan genlerin bitkilerde kesin olarak bulunup bulunmadığı teyit edilebilmektedir.

2.1.1.1.2. T-DNA bölgesine istenen genlerin klonlanması

Bitkilere aktarılmak istenen tarımsal öneme sahip genler ile işaret genlerinin Ti-plazmidinin T-DNA bölgesine doğrudan aktarılması, Ti plazmidinin büyük hacimli olmasından dolayı pratikte pek mümkün olmamaktadır (8). Karşılaşılan bu

Çizelge 2.2. Gen aktarımında kullanılan bazı seçici işaret genleri (41)

İşaret Geninin Elde Edildiği Organizma	Dayanıklılığı Sağlanan Antibiyotik veya Herbisit	İşaret Geninin Adı
<i>E.coli</i>	Kanamycin Neomycin G418	Neomycin phosphotransferase II (NPT II)
<i>E. Coli</i>	Hygromycin B	Hygromycin phosphotransferase (Hpt)
Fare	Metathotrexate	Mouse dihydrofolate reductase (DHFR)
<i>S.hyroscopicus</i> Bar geni	Bialaphos	Phosphinotricin acetyltransferase (Bar)
<i>E.coli</i>	Bleomycin	Bleomycin
Mutant Arabidopsis ALS geni	Sulphonylurea Herbicides	Acetolactate synthase (ALS)

sorunu aşmak amacıyla ko-entegratif ve binari (ikili) vektör sistemleri geliştirilmiştir. Ko-entegratif vektör T-DNA bölgesinin büyük bir bölümü çıkarılmış onun yerine aracı plazmide homolog olan bir DNA parçası yerleştirilmiş vektörlerdir. Böylece ko-entegratif vektör içeren *Agrobacterium*'a istenen genleri taşıyan plazmidler aktarıldığında homolog rekombinasyon ile Ti plazmidinin T-DNA'sına bağlanmış olur (8). Fakat bu yolla istenmeyen DNA parçası bitkilere geçmektedir. Bu nedenle kullanımı yaygın değildir (40).

Hoekema et al., (43) tarafından geliştirilen ikili vektör sistemi hem replikasyon hem de konjugasyon faktörlerini içeren birbirinden bağımsız olarak replike olabilen iki küçük plazmidten oluşmaktadır. Bu plazmidlerde T-DNA bölgesi tamamen çıkarılmıştır. Ti plazmidi sadece *vir* bölgesini taşır. Diğeri ise T-DNA sınır bölgeleri içersinde bitkilere aktarılmak istenen genleri, seçici işaret genlerini taşır (8). Bu plazmidler gen aktarımında oldukça yaygın kullanılırlar. Hatta süper ikili vektörlerin

geliştirilmesi ile tek çenekli bitkilere de *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı yapılabilmektedir (24,26,44).

2.1.2. Adventif sürgün rejenerasyonu

Bitkiler; izole edilmiş bir sürgün, kök, yaprak, çiçekler ve hatta organize olmamış kallus gibi dokulardan bütün bir bitkiyi yeniden oluşturabilme kapasitesine sahiptirler (45). *In vitro* koşullarda bitkilerin değişik kısımları besin maddeleri, hormonlar ve vitaminler gibi kimyasal; ısı, ışık ve nem gibi fiziksel gereksinimleri karşılandığı takdirde kültüre alınabilmektedir (46,47). Doku kültürü olarak adlandırılan bu yöntemler farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Bunlar mikroçoğaltım, sentetik tohum üretimi, hastalıksız bitki elde etmek, sekonder metabolit üretimi ve ıslah çalışmaları için adventif sürgün rejenerasyonunun oluşturulması olarak sayılabilir. Ancak, hücre ve dokulardan sürgün rejenerasyonunu başarmak için uygun eksplantın seçilmesi, büyümede aktif maddeleri içeren uygun ortamın belirlenmesi ve fiziksel çevre koşullarının uygun olması gerekmektedir (48-50).

Bitki rejenerasyonunda kullanılan besin ortamları bitki büyümesi için gerekli olan makro ve mikro elementler ile enerji kaynağı olan şekeri içerir. Bu ortamlar agar ilave edilerek katılaştırılır. Besin ortamına eklenen bitki büyüme düzenleyicileri de bitki rejenerasyonunun vazgeçilmez ve en önemli faktörleridir. Genelde, yüksek oranda oksin (IAA, IBA, NAA, 2,4-D) bulunan ortamlar kallus oluşumunu teşvik ederler (51-53). Kallus düzensiz bölünen, organize olmamış hücreler kümesidir (54). Gen aktarımı gibi biyoteknolojik çalışmaların yapılabilmesi için önce kallus kültürlerinin oluşturulması gerekmektedir (55,56). Sitokininlerin (BA, 2 İP, Zeatin, Kinetin) bulunduğu ortamlarda ise adventif sürgün rejenerasyonu teşvik edilir.

Bitki hücre ve dokulardan *in vitro* adventif sürgün rejenerasyonu organogenezis ve embriyogenezis olarak iki yolla gerçekleşmektedir.

2.1.2.1. Organogenezis

Döllenmeyi takiben meydana gelen zigot, mitotik bölünmeler geçirerek yeni bir organizma meydana getirebilmektedir. Bölünmelerin devam ettiği süreçte hücrelerde meydana gelen farklılaşmalar ile canlının doku, organ ve sistemleri oluşmakta ve bu aşamadan sonra hücreler bir değişiklik geçirmeden görevlerini yerine getirmektedirler. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalar ile farklılaşan bu hücrelerin bozulmamış bir hücre zarı sistemi ve canlı bir çekirdeğe sahip olduğu sürece tekrar meristematik bir özellik kazanarak mitotik bölünme gösterebileceğini ortaya koymuştur. Bu bölünmeler sonunda ya doğrudan adventif sürgün veya kök (direk organogenezis) ya da hücreler yığını olan kallus ve bu kallustan sürgün ya da kök meydana gelmektedir (indirek organogenezis) (57). İndirek organogenezisde meristematik merkezin oluşturularak ardından sürgün ve kök oluşumundan önce eksplant belirli bir form ve polaritesi olmayan hücre yığınlarının (kallus) oluşması için uyarılır. Direk organogenezisde ise kallus gelişimi olmadan sürgün gelişimi gözlenir (27).

Organogenezis ile bitkinin değişik kısımlarından alınan hücre ve dokulardan yeni bitki eldesi mümkün olduğu için generatif yollardan çoğaltılması zor olan bitki türlerinin üretilmesi olanaklı hale gelmiştir. Organogenezis diğeri bir önemi ise bitkilere gen aktarımında başarı sağlanması için gerekli olan rejenerasyon yöntemini sağlamasıdır.

2.1.2.2. Embriyogenezis

Doku kültürü çalışmaları ile bir bitkinin herhangi bir somatik hücre, doku ve organından embriyo elde etmek mümkündür. Somatik hücrelerden elde edilen embriyolara somatik embriyo, adventif embriyo veya vejetatif embriyo adı verilir. Somatik embriyoların gelişimi de zigotik embriyoların gelişimine benzer. Aralarındaki asıl fark elde ediliş yöntemlerinden kaynaklanmaktadır. Somatik embriyogenezis için değişik bitki kısımları kullanılmakla birlikte özellikle olgunlaşmamış zigotik embriyolar önemli bir kaynağı oluşturmaktadır. Bununla

birlikte çiçek kısımları, anterler, polen ve endosperm dokularının somatik embriyogenezis için iyi bir başlangıç olduğu bildirilmiştir (58,59).

Somatik embriyogenezisin başarısında eksplant seçimi oldukça önemlidir (60). Başarıyı etkileyen en önemli faktör ise bitkinin genotipidir. Soya (61), mısır (62,63), arpa (64), buğday (65) ve pamuk (66) gibi bir çok kültür bitkisinde bireysel genotiplerin somatik embriyo oluşumunu etkilediği belirlenmiştir. Yonca ile yapılan bir çalışmada da iki genin yüksek rejenerasyon yeteneği sağladığı belirtilmiştir (67). Besin ortamının içeriği de etkili faktörlerden bir diğeridir. Başarılı bir embriyogenezis için besin ortamının iyi optimize edilmesi gereklidir (54). Somatik embriyogenezis, besin ortamına oksin ilavesiyle teşvik edilir (58). En çok kullanılan oksin 2,4-D'dir (68,50). Embriyo oluşumu teşvik edildikten sonra kültürler büyüme düzenleyicileri içermeyen ortama aktarılır. Bu ortamda embriyoların gelişmesi ve çimlenmesi sağlanır.

Bitki türü, eksplant ve besin ortamının içeriğine göre somatik embriyogenezis direkt ve indirekt olmak üzere iki tipte oluşur. Direkt somatik embriyogenezis yönteminde somatik embriyolar hücre ya da dokudan ara bir kallus oluşmadan gelişirler. İndirek somatik embriyogenezisde ise kültüre alınan protoplast ya da eksplantlardan önce kallus oluşumu gözlenir, ardından kalluslar üzerinde embriyoidler oluşur. Embriyo ve embriyoidler tek hücreden gelişebildiği gibi hücre gruplarından da gelişebilir (27).

Somatik embriyogenezis, yapay tohum üretimine olanak sağladığı için oldukça önemli bir yöntemdir (69). Ayrıca indirekt somatik embriyogenezisde somatik embriyoların elde edilmesinden önce ara bir kallus safhası bulunduğu için *A. tumefaciens* ile gen aktarımında kullanılabilir. Gen aktarımı yapılan hücrelerden önce embriyogenik kallus oluşturulmakta ve bu kallustan önce embriyolar, sonrada transgenik bitkiler elde edilmektedir. *A. tumefaciens* ile gen aktarımı ve somatik embriyogenezis yönteminin birlikte kullanılmasıyla transgenik bitkiler elde edilmiştir (70-72,11).

2.2. Kaynak Araştırması

2.2. 1. Adventif sürgün rejenerasyonu ile ilgili çalışmalar

Bingham et al., tetraploid *Medicago sativa* L. germplasm kaynağından elde ettikleri kallus kültürlerinden yaptıkları seleksiyonlar ile rejenerasyon yeteneğini yüksek çeşit geliştirmeyi amaçlamışlardır. Hipokotil eksplantlarını 2'şer mg/l NAA, 2,4-D ve kinetin içeren BO temel ortamında kültüre almışlar ve 28 gün sonra yarı katı Boi2Y ortamına transfer etmişlerdir. Gelişen bitkicikleri birbirleri ile tozlaştırmak için seraya almışlardır. Rejenerasyon frekansının %12'den sırasıyla %50, %67'ye çıktığını bildirmişler, geliştirdikleri çeşide ise Regen-S adını vermişlerdir (73).

Reisch and Bingham, diploid *M. sativa* türlerinde yaptıkları çalışmalar sonucunda somatik embriyogenesinin iki dominant genin kontrolünde olduğunu rapor etmişlerdir (67).

Lupotto, yaptığı çalışmada yoncanın akdeniz varyetelerinde somatik embriyo gelişimini belirlemeye çalışmıştır. Kotiledon ve hipokotil eksplantlarını 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre almış ve embriyo gelişiminin hormonsuz MS ve yeast ekstrak içeren ortamlarda olduğunu bildirmiştir. Gelişen embriyoların bir kısmını bitki oluşumunda kullanırken diğer kısmını yeni embriyo gelişimi için kullanmıştır. Bu embriyonik dokuların gelişim desenlerini incelemiş, bunların zigotik embriyolar gibi ikincil embriyoları oluşturma yeteneğinde olduğunu ve *Medicago sativa* L'nin rejenerasyon yeteneği olan kültürlerinin bitki üretiminde kullanabileceğini tartışmıştır (74).

Brown et al., *Medicago sativa* L. türüne ait kültür formlarını in vitro rejenerasyon bakımından incelemişlerdir. Bu amaçla 76 kültüre ait 20'şer tohum kullanmışlar ve üç aşamadan oluşan bir protokol uygulamışlardır. Bu protokol birinci aşamada kallus oluşumu için B5 + 2,4-D + kinetin, ikinci aşamada embriyo oluşumu için SH + yüksek oranda 2,4-D ve son aşamada ise embriyo gelişimi için Bo + yeast ekstrakt + inositol içermektedir. Brown ve arkadaşları denemeler sonucunda elde

ettikleri embriyoları germplasm kaynağını ve genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla incelemişler ve embriyoların çoğunun *M. falcata* x Ladak kaynaklı olduğunu bulmuşlardır. Kallus oluşumu ile germplasm dağılımı arasında bir ilişki olmadığını, embriyo oluşumunda seçilen yöntemin etkili olduğunu belirtmişlerdir. Kendilerinin kullandıkları protokolün yüksek rejenerasyon kabiliyetine sahip kültürler için en iyi sonucu veren yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Sonuçlarına göre *M. falcata* x Ladak tabanlı kültürlerle ait popülasyonlarda in vitro rejenerasyon frekansının daha fazla artırılmasını sağlayan gen kontrolünün laboratuvar şartlarında seçilebileceğini önermişlerdir (75).

Atanassov and Brown, *Medicago sativa*'nın kotiledon kökenli hücre süspansiyonu ve mezofil II protoplastlarından bitki rejenerasyonunu başarmak için bir sistem geliştirmişlerdir. 6 günlük hücre kültürleri enzim karışımı ile karıştırılarak elde edilen protoplastlar önce yüksek oranda oksin, düşük oranda sitokinin içeren SH ortamında daha sonra hormonsuz Blaydes ya da LS ortamında embriyo oluşumu için kültüre almışlardır. Test ettikleri 3 çeşitten ikisinde embriyo gelişimi olduğunu gözlemişlerdir. Embriyo gelişiminin güçlü bir şekilde genotipe bağlı olduğunu ve embriyo oluşumunda kinetinin BAP, 2iP ve zeatine göre daha etkili sonuç verdiğini bildirmişlerdir (76).

Meijer and Brown, diploid *M. sativa* türüne ait dört alt türden elde edilen 19 ekotip ile somatik embriyo gelişimi ve rejenerasyon yeteneğinin genotip geçmiş ile ilişkisini incelemişlerdir. Bu amaçla iki farklı protokol uygulamışlar ve 3 aşamalı bir sistem kullanmışlardır. Çalışmalarının sonucunda iki protokol arasında anlamlı bir farklılık tespit etmediklerini bildirmişlerdir. Genel olarak diploid *M. sativa* ekotiplerinde rejenerasyonun düşük olduğunu ve germplasm kaynağı ile yüksek rejenerasyon frekansı arasındaki korelasyonu tespit edilmesinin mümkün olmadığını belirtmişlerdir. Falcata alt türün ait ekotiplerin yüksek rejenerasyon yeteneğine sahip olduklarını bu nedenle somatik embriyogenesis ve genetik değişiklik çalışmaları için önemli ve ideal bitkiler olduğunu bildirmişlerdir (77).

McKenzie and Walton, *Medicago sativa* ve *M. media* türlerine ait 10 kültür ve ıslah hatlarının hipokotil ve kök eksplantları ile yaptıkları embriyogenesis çalışmasında 3 farklı protokol kullanarak embriyo ve adventif sürgün rejenerasyonunu incelemişlerdir. Yüksek oranda 2,4-D, düşük oranda sitokinin içeren ortamın en iyi sonucu verdiğini, ortam ile embriyo oluşumu arasında önemli bir farkın olduğunu bulmuşlardır. *M. media* türüne ait kültür ve ıslah hatlarında embriyo oluşumunu yüksek oranda meydana geldiğini gözlemişler ve genotip ile ortam arasında önemli bir farklılık bulunduğunu istatistiksel olarak göstermişlerdir. Eksplant ile embriyo oluşumu arasında istatistiksel bir farklılığın olmadığını ama gözlemlerine göre farklılık olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca; başarılı bir rejenerasyonun embriyoid üretiminin nitelik ve niceliği ile yakından ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (78).

Chen and Marowitch, *Medicago falcata*'nın 17 ekotipin kotiledon, hipokotil, kök ve yaprak eksplantlarından elde ettikleri kallus dokularından somatik embriyo oluşumunu ve bitkicik gelişimini izlemişler. 10 ekotipin rejenerasyon yeteneğine sahip olduğunu, in vitro rejenerasyon kabiliyeti ile genotip arasında önemli bir ilişki bulunduğunu belirtmişlerdir (79).

Ray and Bingham, diploid yonca populasyonlarında rejenerasyonu sağlayan genetik etkileri incelemişlerdir. Populasyonun %10'unda rejenerasyonun gerçekleştiğini görmüşler ve yaptıkları incelemeler sonucunda elde ettikleri verilere dayanarak rejenerasyonun sıralı birkaç gen tarafından kontrol edildiğini rapor etmişlerdir (80).

Hernandez, Rangelander, Moris-Kabul ve 81-120R'nin her birinden seçilen S1 ve F1 döllerini somatik embriyogenesis için gözlemiştir. Sonuçta yoncada embriyogenik kabiliyetin tetrasomik ayrılmış 2 bağımsız lokus tarafından kontrol edildiğini ve embriyogenik genotipin oluşmasında bir gendeki 1 veya 2 lehte allelin diğer gendeki 3 veya 1 lehte allelle bir araya gelmesi gerektiğini bildirmiştir. Kallus oluşumunun da dominant bir lokus tarafından kontrol edildiğini ve bu genin 2 allelinin de kallus düzenlemesinde olması gerektiğini belirtmişlerdir (81).

Sorenses et al., *Medicago sativa* KS10 germplasm kaynağına ait petiol eksplantlarını 2 mg/l 2,4-D ve 0, 5 mg/l kinetin içeren ortamda kültüre almışlardır. Kallusları daha sonra hormonsuz ortama (50 qM prolin ve 30 qM alanin içeren) aktarmışlar ve KS10 bitkilerinin %42 oranında rejenerasyon kabiliyetine sahip olduklarını gözlemişlerdir. Aynı protokolü KS10'dan elde edilen KS206 bitkilerine uyguladıklarında rejenerasyonu %71 olarak gerçekleştirdiğini, sonuç olarak *in vitro* rejenerasyon yeteneğinin genetik kontrol altında ve yüksek oranda kalıtsal olduğunu bildirmişlerdir (82).

Suginobu et al., Yonca'da genotip, ortam ve eksplant çeşidinin kallus ve somatik embriyo oluşumuna etkisini incelemişlerdir. Kùltürler ve seçilmiş rejenerantlar arasında dikkate değer bir farklılık olduğunu, somatik embriyo ve kallus oluşum frekansının seçilmiş rejenerantlarda mevcut kùltürler veya orijinal kùltürlerden çok daha yüksek olduğunu görmüşlerdir. MS ortamında BO ortamına göre kallusların daha büyük olduğunu ama B5 ortamıyla aralarında önemli bir farklılık bulunmadığını tespit etmişlerdir. En fazla somatik embriyoyu MS ortamından elde etmişlerdir. Hipokotil eksplantının en geniş kallusları verdiğini, eksplant-ortam, eksplant-kùltür arasındaki etkileşimin önemli olduğunu görmüşlerdir. Somatik embriyo oluşum frekansının en iyi gövde eksplantından elde etmişlerdir. Sonuç olarak somatik embriyo oluşumunda genotipik geçmişin ortam, eksplant kaynağı gibi faktörlere oranla çok daha kritik bir faktör olduğunu bildirmişlerdir (83).

Takamizo et al., 26 çeşit kullanarak yaptıkları somatik embriyo oluşumu denemelerinde 3 Japon çeşidinde somatik embriyo oluşumunun düşük olduğunu belirlemişlerdir. Bunlardan bir tanesini model bitki olarak kullanarak inatçı kùltürler için iyi bir rejenerasyon protokolü geliştirmeyi amaçlamışlardır. 4 ortamı (B2, B5h, UM, SH) somatik embriyo oluşumu açısından karşılaştırmışlar. Sadece UM ortamında embriyo oluştuğunu gözlemişlerdir. 2 mg/l 2,4-D içeren UM ortamında 4 sitokinin (BA, 2ip, kinetin, zeatin) etkisine baktıklarında BA'nın hem kallus oluşumu hem de somatik embriyo oluşumunda çok daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. 2,4-D ve BA'in farklı kombinasyonlarında ise 4 mg/l 2,4-D içeren ortamda embriyo miktarının 4 kez daha fazla oluştuğunu belirlemişlerdir (84).

Kielly and Bowley, *M. sativa*'ya ait üç embriyogenik, bir embriyogenik olmayan genotiplerini kullanarak somatik embriyogenesiste etkili olan genetik kontrolü belirlemeye çalışmışlardır. Embriyogenik x embriyogenik ve embriyogenik x embriyogenik olmayan genotipleri çaprazlamışlar elde ettikleri S1 ve BC1'leri *in vitro* rejenerasyon için değerlendirmişlerdir. Somatik embriyogenesisin dominant iki lokusun kontrolünde olduğunu ve her üç rejenerasyon yeteneği yüksek genotipin genel bir genetik sistemi paylaştıklarını görmüşlerdir (85).

Parrott and Bailey, 300 *M. sativa* genotiplerinden elde edilen kallus kültürlerinden oluşan somatik embriyolardan yeniden embriyo gelişimini araştırmışlardır. Yaprak, petiol, internod eksplantlarını 2 mg/l NAA, 2mg/l indol-3-asetik asit ve 3,2 mg/l kinetin içeren Blaydes ortamında kültüre almışlar ve 5 genotipte somatik embriyo oluşumu olduğunu gözlemişlerdir. Bu embriyoları hormonsuz MS (B5 vitaminlerini içeren) ortamına transfer etmişler ve her hangi bir kallus safhası olmadan yeni embriyoların direkt olarak oluştuğunu bildirmişlerdir. Ortamdan şeker uzaklaştırıldığında ise embriyo oluşumunun durduğunu belirtmişlerdir. Bu sistemin yeni gen aktarım sistemlerinin ve yapay tohum üretiminin geliştirilmesi için bir avantaj olduğunu söylemişlerdir (86).

Scarpa et al., yaptıkları çalışma ile İtalya'da yetişen *Medicago polymorpha* yabani türüne ait 17 ekotipin doku kültürüne verdiği cevabı değerlendirmişlerdir. Bunlardan ikisinin 1 mg/l 2iP ve 0.1 mg/l IAA içeren ortamda en yüksek rejenerasyonu gösterdiğini belirtmişlerdir. Eksplant kaynağının etkili olduğunu, en iyi sonucun hipokotil eksplantından elde edildiğini bildirmişlerdir (87).

Hammad et al., iki yonca varyetesi ile yaptıkları çalışmada yedi günlük fidelerden aldıkları yaprak, gövde ve kök eksplantlarını 6 farklı ortamda kültüre almışlardır. Kallus oluşumunun tüm ortamlarda meydana geldiğini fakat embriyo elde edilmesi için prolin ve glutaminin gerekli olduğunu gözlemişlerdir. Prolinin glutaminden daha yüksek oranda embriyogenesisi uyardığını ve yaprak eksplantının her zaman en iyi sonucu verdiğini belirtmişlerdir (88).

Okumura et al., *M. sativa*'nın dört kültüründe 7 farklı eksplant (Kök ucu, kök, hipokotil, kotiledon ucu, gövde ucu, petiol ve yaprak) kaynağı kullanılarak eksplant kaynağının somatik embriyogenesise etkisini araştırmışlardır. Kallus oluşumu için eksplantları SH + 5,0 mg/l 2,4-D + 0,2 mg/l kinetin ortamında kültüre almışlar ve embriyo oluşturan kallusları 50 mM prolin ve 11.2 mM amonyum sülfat içeren SH ortamına transfer etmişlerdir. Gövde ucunun %78 ile en yüksek oranda embriyo oluşturduğunu bunu hipokotil (%68) eksplantının izlediğini fakat yaprak, kök, kök ucu eksplantlarında bireysel olarak %80'nin üzerinde embriyo oluşumu olduğunu rapor etmişlerdir. En düşük embriyo üretimini %15 ile kotiledon eksplantında bulmuşlar fakat 7 eksplant kaynağından oluşan somatik embriyo sayısında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmadığını bildirmişlerdir (89).

Lai and McKersie, kütleli somatik embriyo üretimi üzerine *M. sativa* ile bir çalışma yapmışlardır. Petiol eksplantlarını kallus oluşturmak amacıyla 1,0 mg/l 2,4-D, 0,2 mg/l kinetin içeren SH ortamında 14 gün süreyle kültüre almışlar, daha sonra 1,0 mg/l 2,4-D bulunan B5g sıvı ortamına transfer etmişlerdir. 7 gün arayla alt kültüre aldıkları süspansiyonları Boi2y katı ortamına yayarak embriyo gelişimini gözlemişlerdir. Yapay tohum üretiminde embriyo üretimini arttırmak için alternatif bir metod olabileceğini belirtmişlerdir (90).

Kraic et al., adventif sürgün rejenerasyonu için *M. sativa* türüne ait yaprak, petiol, gövde eksplantlarını kallus gelişimi amacıyla 8,0 mg/l 2,4-D, 8,0 mg/l kinetin, 0,5 mg/l NAA içeren GMK ortamında kültüre almışlardır. GMK ortamı B5 ortamı modifiye edilerek oluşturulmuştur. Daha sonra eksplantlar 0,2 mg/l BAP içeren B5 ortamına ve sırasıyla hormon içermeyen GMK ve GMZ ortamlarına aktarmışlar ve yeşil yapılı kalluslardan sürgün gelişimi olduğunu gözlemişlerdir (91).

Ivanova et al., *M. falcata* hatlarında direkt somatik embriyogenesis süresince içsel hormon düzeylerini incelemişlerdir. Bu amaçla *in vitro* yetiştirilen farklı embriyogenik kapasiteye sahip *M. falcata* hatlarının ilk yapraklarında içsel IAA, ABA ve sitokinilerinin seviyelerini değerlendirmişlerdir. Hızlı embriyogenik oluşumun yüksek IAA ve düşük ABA seviyesiyle ilişkili

olduğunu, sitokinin içeriğinin önemli farklılığa neden olmadığını gözlemişlerdir. Embriyogenik potansiyelin açığa çıkarılması için büyüme düzenleyicileri arasındaki orantının önemli olduğunu belirtmişlerdir (92).

Moursy et al., *M. sativa* cv. Ismailia'nın petiol, gövde, yaprak ve kotiledon eksplantlarını farklı büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda kültüre almışlar ve 2,0 mg/l 2,4-D ve 1,5 mg/l kinetin içeren ortamın kallus oluşumunu için en iyi ortam olduğunu görmüşlerdir. Çalışmalarında 8 protokol kullanmışlar kallus ve sürgün oluşumunun gözlemlendiği petiol eksplantlarını 0,1 mg/l NAA ve 1,0 mg/l BA eklenen MS ortamında kültüre almışlardır. 10 cm uzunluğuna ulaşan rejenere bitkicikleri büyüme odasında toprağa aktarmışlar iki hafta sonra 20 cm'ye ulaşan bitkileri seraya almışlardır (93).

Romagnoli et al., Pampeana'dan toplanan *M. sativa* R11 genotipinde somatik embriyo üretimini amaçlamışlardır. Kallus oluşumu için yaprak eksplantlarını oksin içeren altı farklı ortamda kültüre almışlar embriyo üretimi için en iyi sonucun MS + 10 qM 2,4-D + 4.6 q M kinetin ortamından alındığını bildirmişlerdir. Kallusları daha sonra 10-20 mM NH₄ + 30 mM prolin içeren MS ortamına transfer etmişlerdir. Petri başına 500'den fazla embriyo üretmeyi başarmışlardır. Bitki gelişimi için embriyoları MS ve yarı MS ortamlarına aktarmışlardır. Rejenere bitkiciklerinin R11 genotipine benzediklerini bildirmişlerdir (94).

Özgen vd. "Elçi" ve "Mesa-Sirsa" yonca çeşitlerinde, çimlendirme ile elde edilen fidelerden alınan sapçıklarda, *in vitro* koşullarda sürgün oluşumu sağlamışlardır. Sapçıklar farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren MS ortamında büyütülmüştür. Sürgün sayısı, en fazla "Elçi" çeşidinde 2 mg/l BAP ve 0.2 mg/l NAA; "Mesa-Sirsa" çeşidinde ise, 1 mg/l BAP ve 0.2 mg/l NAA içeren kültür ortamlarından elde edilmiştir. Kültür ortamına ilave edilen IBA oranının artırılması ile köklenme miktarı %80-90 oranına ulaşmıştır. Bununla beraber, "Elçi" çeşidinin her bir sürgünde ortalama kök uzunluğu, "Mesa-Sirsa" çeşidinden daha fazla bulunmuştur. Kültür

ortamında üretilen sürgünlerde somatik kromozom sayılarının değişmediği görülmüştür (95).

Kepczynski et al., yonca'da methyl jasmonate (JA-Me) ve ABA büyüme düzenleyicilerinin somatik embriyo oluşumuna etkilerini incelemiştir. Yaptıkları çalışmada 5, 50, 450 pikomol içeren dozlarda hormon kullanmışlar ve kallus ağırlığı, oluşan somatik embriyo sayısına göre değerlendirme yapmışlardır. Buna göre; JA-Me ve ABA'nın somatik embriyo oluşumunu azalttığını ve JA-Me'nin kallus gelişimi ve embriyo oluşumunda ABA'dan daha az etkili olduğunu bildirmişlerdir (96).

Iantcheva et al., yabani yonca türlerinde direkt somatik embriyogenesis basit ve hızlı şekilde üretimi için prosedür geliştirmişlerdir. Meristematik kısımları içeren eksplantları farklı konsantrasyonlardaki TDZ ve BAP içeren ortamlarda kültüre almışlardır. İlk somatik yapıların 20 gün sonra meydana geldiğini gözlemişlerdir. Rejenere olan bitkilerin düşük seviyede makroelement ve şeker içeren ortamlarda kültüre edildikten sonra seralara adaptasyonunun kolaylıkla gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Diploid tek yıllık yoncalarda TDZ ve BAP'ın yüksek oranda somatik embriyogenesis oluşmasında etkili olduğunu söylemişlerdir (97).

2.2.2. Gen aktarımı ile ilgili çalışmalar

Söyler, yonca bitkisinin Bilensoy, Bitlis, Elçi, Kayseri, Mesa-sırsa, Nitro, Peru ve Verco çeşitlerine ait farklı eksplantların *in vitro* şartlarda *A. tumefaciens*'e karşı duyarlılıklarını belirlemeye çalışmıştır. Bakterinin tümör oluşturma yeteneğinin çeşit ve eksplanta göre farklılık gösterdiğini belirlemiştir. Non-onkogenik *A. tumefaciens* hatlarıyla yoncaya gen aktarımında A281 hattından türeyen bakteri hatları ile hipokotil ve yaprak eksplantlarının tercih edilmesini önermiştir (98).

Deak et al., rejenerasyon kabiliyeti yüksek *Medicago varia* A2 genotipinde *A. tumefaciens* aracılığıyla transformasyon çalışması yapmışlardır. Sürgün kısımlarını kanamisine dayanıklılık sağlayan pGA471 plazmidini taşıyan bo42

hattı ile muamele etmişler dayanıklı bitkilerin yeşil kalluslardan ve gövde parçalarında meydana geldiğini belirtmişlerdir (99).

Damiani, baklagil yem bitkilerinin çeşitli türlerine kanamisin ve higromisin antibiyotiklerine dayanıklılık genlerini taşıyan vektörleri içeren *A. rhizogenes* ve *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı yapmıştır. Çalışmasında *M. sativa*' dan kanamisine dayanıklı transgenik bitkiler elde etmesine rağmen *M. arborea*, *Lotus corniculatus*, *L. tenuis*, *Onobrychis viciifolia* türlerinden transgenik bitki elde edemediğini bildirmiştir. Transformasyon etkinliğinin *Agrobacterium* hattından etkilenmediğini gözlemlemiştir (100).

D' Halluin et al., *A. tumefaciens* aracılığıyla *M. sativa*'nın RA-3 hattına gövde ve petiol eksplantlarını kullanarak transformasyon sistemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemle herbisitlere dayanıklılığı sağlayan ve 3 işaret genini taşıyan DNA parçasını aktarmayı başarmışlardır. Elde ettikleri 59 transgenik bitkiyi tarla şartlarında analiz etmişlerdir (11).

Hill et al., 5 yonca çeşidinden seçtikleri genotiplerden *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarımı yöntemiyle 100'den fazla transgenik yonca bitkisi elde etmişlerdir. Elde ettikleri transgenik bitkiler kanamisine dirençlilik geni ve yonca mozaik virüsü kılıf proteini taşımaktadır. Yaprak proteininin her miligramında 500 ng kılıf proteini içeren bitkilerin yonca virüsüne karşı dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir (101).

Pezzotti et al., *M. sativa*'nın somatik embriyogenesis ile seçilen rejenerasyon kapasitesi yüksek genotipleri ile *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyon çalışması yapmışlardır. Çalışmalarında pKan3A plazmidi ve NPTII genini taşıyan ikili vektörleri içeren At81 bakteri hattını kullanmışlardır. Gövde parçalarını bakteri ile muamele etmişler ve kanamisine dayanıklı kallus elde etmişlerdir. Bitki rejenerasyonunu ise sadece antibiyotik içermeyen ortamlarda başarabilmişlerdir. Genetik transformasyonu DNA-DNA hidridizasyonu ve enzimatik tahlil yöntemleri ile belirlemişlerdir. MezofilIII protoplastları, yaprak kallusları ve gen aktarılan

bitkilerin S1 dölleri kanamisinin varlığında yetiştirilmiş ve somatik hibridizasyonda kanamisine dayanıklı bitkilerin kullanılabilirliğini tartışmışlardır (102).

Thomas et al., *Medicago truncatula* ile kanamisine dayanıklılık genlerini taşıyan ikili ve non-onkogenik ti plazmidi içeren *A. tumefaciens* hatlarını kullanarak gen aktarım çalışmalarında fertil transgenik bitkiler elde ettiklerini bildirmişlerdir. Sonuca ulaşmada rejenerasyon protokolü ve kullanılan eksplantın rejenerasyon yeteneğinin etkili olduğunu fakat Ri plazmidin T-DNA'sı üzerindeki genlerin somatik embriyogenesi olumsuz etkilediğini bu nedenle sadece T-DNA bölgesi bulunmayan non-onkogenik Ti plazmidi veya *rol A* geni inaktif edilmiş Ri plazmidi içeren hatlarla muamele edilen dokularda transgenik bitki rejenerasyonu gözlediklerini belirtmişlerdir. Fertil transgenik bitkileri sadece non-onkogenik *A. tumefaciens* ile yaptıkları denemelerden elde ettiklerini ve NPT II genini R1 dölüne aktardıklarını rapor etmişlerdir (103).

Masoud et al., elde ettikleri transgenik yonca bitkisine ait yapraklarda β -1,3 glukanaz aktivitesinin kontrol bitkisi yapraklarından 10 kat daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Yapısal olarak pek çok bitki kitazının fazla ekspresyonunun ve β -1,3 glukanazın transgenik bitkilerinin fitopatojenik funguslara karşı dirençliliklerinin arttığı bilinmektedir. Bu transgenik yonca bitkilerinin de bir çok fitopatojenik fungusa karşı dayanıklılığının arttığını tespit etmişlerdir (104).

Du et al., yonca'nın kültürü yapılan üç embriyogenik klonu (A70-34, RA3 ve C2-4) ile gen aktarımında bitki genotipinin etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında petiol ve gövde eksplantlarını ve farklı vektörleri içeren *Agrobacterium* hatlarını kullanmışlardır. Sadece C2-4 embriyogenik klona ait petiol eksplantından 24 adet transgenik aday bitki elde etmişlerdir. C2-4 klonu genotipinin diğer klonlardan çok farklı olduğunu ve C2-4 bitkilerinin daha kalın gövde ve petiollere sahip olduğunu ve böceklerle ve hastalıklara daha toleranslı olduklarını belirtmişlerdir. Bu faktörlerin transformasyonda etkili olabileceğini bildirmişlerdir (105).

Desgagnes et al., *M. sativa*'nın rejenerasyon yeteneği yüksek üç genotipinden elde edilen 11 ıslah hattı ile gen aktarım çalışması yapmışlardır. Çalışmalarında C58, A281, LBA4404 *Agrobacterium* hatlarını kullanmışlardır. Deneme sonucunda PCR ve southern hibridizasyon yöntemleri ile yaptıkları analizlerde üç genotipten de transgenik kallus ve transgenik bitki elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Genotiplerin kullanılan bakteri ırkları ve vektörlere farklı cevaplar verdiğini bu nedenle iyi bir transformasyon için genotip-bakteri ırkı-vektör kombinasyonunun önemli olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, kanamisin transgenik olmayan materyalin elimine edilmesinde oldukça etkili olduğunu bildirmişlerdir (106).

Samac, *A. tumefaciens* aracılığıyla *M. sativa*'nın 9 farklı kaynaktan gelen ticari çeşitleri ile transformasyon çalışması yapmıştır. Çalışmasında GUS ve NPTII genini taşıyan ikili vektörleri içeren 3 hat ile A208, A348, A281, A136 yabancı bakteri ırklarını kullanmıştır. 2 haftalık kök ve kotiledon eksplantlarını bakteriler ile inoküle etmiştir. Elde ettiği sonuçlara göre doku kültüründe germplasm kaynağının, bitki transformasyonunda bakteri ırkının yüksek oranda etkili olduğunu belirtmiştir (107).

Pereira and Erickson, yonca'da partikül bombardımanı yöntemiyle transgenik bitkiler elde etmeyi başarmışlardır. Yaprak sapı ve gövde eksplantlarından elde ettikleri kalluslara gen aktarmışlar ve kanamisin içeren Boi2Y ortamında kültüre almışlardır. Çalışmalarında sadece bir sistemde 7 transgenik bitki elde ettiklerini açıklamışlardır (108).

Ninkovic et al., yonca'da tekrarlamalı somatik embriyogenesis yöntemiyle çoğaltılan embriyolara genetik transformasyon konulu bir araştırma yapmışlardır. Araştırmalarında tekrarlamalı embriyo üretilen kültürlerde 5-7 mm uzunluğa gelen somatik embriyoları tek tek ayırarak yaralamışlar ve bakteri ile muamele etmişlerdir. Daha sonra embriyoları litrede 40 g sukroz, 1 g yeast extract ve 0,05 mg BA içeren katı ortamda kültüre almışlardır. Ayrıca transgenik klonları belirlemek için 100 mg/l kanamisin ilave etmişler ve southern blot, NPT II ve GUS analizleri ile transformasyonu belirlemişlerdir. Somatik embriyogenesisi

temel alan bu transformasyon/ rejenerasyon sisteminin transgenik yonca hatlarının elde edilmesinde uygun olabileceğini bildirmişlerdir (109).

Chabaud et al., *A. tumefaciens* LBA4404 hattı ile *M. truncatula*'nın 3 genotipine gen aktarım çalışması yapmışlardır. Somatik embriyogenesis ile Jemalong kültürünün iki genotipinde rejenerasyon ve transformasyon protokolü oluşturmuşlardır. Bu protokolü kullanarak 4-10 ay içerisinde transgenik bitkiler elde ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmalarında MtENOD12 erken nodilin promotörü ve gus raportör geni arasındaki bir kimerik fuzyonu *M. truncatula*'a da ortaya çıkartmışlar ve transgenik bitkilerin takibinde köklerdeki simbiyosis-özel gen ürünlerinden bilgi sağlanabileceğini belirtmişlerdir (110).

Trieu and Harrison, *M. truncatula* cv Jemalong için 2.5 ay içerisinde transgenik bitki elde edilmesini sağlayan hızlı bir transformasyon ve rejenerasyon sistemi geliştirdiklerini bildirmişlerdir. Çalışmalarında kotiledon eksplantını kullanmışlar ve direkt organogenesis ile transgenik bitki rejenerasyonu sağlamışlardır. Transformasyon işlemini ikili vektör içeren LBA4404 *A. tumefaciens* hattını kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Transgenik bitkilerin Ignitu herbisitine karşı yüksek dayanıklılığa sahip olduğunu bu nedenle ticari uygulamalarda kullanılabileceğine işaret etmişlerdir (111).

Trinh et al., iki diploid *Medicago* hattı ile basit ve etkili rejenerasyon ve transformasyon protokolu oluşturduklarını bildirmişlerdir. Tek yıllık *M.truncatula* R108-1 ve çok yıllık *M. sativa* ssp. *falcata* Arcangeli PI. 564263'ü yüksek embriyogenik genotipler olarak belirledikten sonra yaprak eksplantlarını *A. tumefaciens* ile muamele etmişlerdir. Bütün eksplantlardan 3-4 ay içerisinde fertil transgenik bitkiler ürettiklerini ve bu protokolün baklagil bitkiler içerisinde şimdiye kadar rapor edilen en etkili ve en hızlı transformasyon protokolü olduğunu belirtmişlerdir (19).

Kamate et al., *M. truncatula*'nın iki hattında çiçek kısımlarını kullanarak *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı yapmışlardır. Kullandıkları çiçek

sisteminden canlı hücrelerde renk oluşturan *gft* raportör geni taşıyan transgenik bitkiler elde etmişlerdir. Bu yöntemin zaman kazandırdığını ve ana bitkilerin serada daha küçük alanlarda yetiştirilmesini sağladığını bildirmişlerdir. GFT proteininin zehirli etkisi olmadığını ve rejenere bitkilerin belirlenmesinde *gft* raportör geninin kullanılabileceğini rapor etmişlerdir (112).

Shao et al., *M. falcata*'nın tetraploid embriyogenik hatlarında iki farklı rejenerasyon sistemi kullanarak hızlı ve etkili bir transformasyon sistemi geliştirmeyi amaçlamışlardır. Yaprak eksplantlarını *A. tumefaciens* ile muamele ettikten sonra kanamisin içeren ve 2,4-D, kinetin ilave edilen MS (MSH) ve Bsh ortamlarında kültüre almışlardır. MS'li ortamdakileri hormonsuz MS ortamında alt kültüre almışlar her iki sistemde de rejenerasyon süresini kısaltmak ve embriyo gelişimi için Boi2y ortamına geçirmişlerdir. Burada olgunlaşan embriyoları bitki gelişimini teşvik etmek için hormonsuz MS ortamına almışlardır. Transgenik bitkicikleri MSH sisteminde 10-14 haftada, Bsh sisteminde ise 12-16 haftada üretmişlerdir. MSH sisteminin baklagil türlerinde bugüne kadar bildirilen transformasyon sistemlerinden daha hızlı olduğunu ve transformasyonu southern blot hibridizasyonu, PCR analizleri ile onayladıklarını bildirmişlerdir. Çalışmalarında kullandıkları 2,4-D ile muamele edilmiş gusA yapılarının transformasyonun belirlenmesinde kullanılabiliğini göstermişlerdir (113).

Farago et. al., yonca'da besin kalitesini arttırmak ve hastalıklara dirençliliği sağlamak amacıyla *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarım çalışması yapmışlardır. Rg9/I-14-22 yonca hattının yüksek rejenerasyon yeteneğine sahip petiol eksplantlarını farklı vektörleri taşıyan *A. tumefaciens* hatlarıyla ko-kültüvasyona tabi tutmuşlardır. Somatik embriyogenesis yoluyla rejenerasyonu sağlamışlar. Eksplantları kanamisin içeren ortama aktararak transgenik adayları belirlediklerini bildirmişlerdir. Virüslere dayanıklılığı ve besin kalitesini arttıran genleri taşıyan 19 ve 20 transgenik bitki elde ettiklerini ve bunları PCR ve farklı biyolojik prosedürlerle teyit ettiklerini belirtmişlerdir (114).

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

Çimlendirme ve sürgün rejenerasyonu ortamlarını optimize etmek için başlangıçta Verco çeşidi kullanılmıştır. Daha sonra tüm çeşitler (Kayseri, Hemedan, Nitro alfalfa, Peru, Bitlis, Kalender, Elçi, Elçi:13, Elçi:45, Elçi:28-A) denenmiş ve en iyi sonuç veren çeşit ile gen aktarımı denemelerine devam edilmiştir.

3.1.2. Bakteri materyali

Çalışmada, Çizelge 3.1'de verilen non-onkogenik bakteri hatları kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Bakteri hatları ve özellikleri (115,116)

Bakteri Hattı (Seçici Antibiyotik)	Yardımcı Plazmid (Seçici Antibiyotik)	Vektör	Bitki Seleksiyonu
2260 (100 mg/l rif)	pGV 2260 (50 mg/l cb)	p35S GUS-INT (50 mg/l km)	km (50-100 mg/l)
EHA105	pTiBo542	p35S GUS-INT (50 mg/l km)	km (50-100 mg/l)
LBA4404 (100 mg/l rif)	pAL 4404	pRGG bar (25 mg/l km)	fos (0,5-10 mg/l)

rif: rifampisin, cb: karbenisilin, km: kanamisin, fos: fosfonitrisin,

3.2. Metot

3.2.1. Bitki doku kültürleri

3.2.1.1. Genel doku kültürü şartları

Denemelerde %3 sukroz içeren ve % 7'lik agar (Type A, Sigma) ile katılaştırılan MS (117), B5h (76), SH (118) ve BOi2Y (76) ortamları temel besin ortamı olarak kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Ortamlar çift distile saf su kullanılarak hazırlanmış olup gerekli durumlarda besin ortamlarına farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilmiştir. Besin ortamlarının pH'ı 1N NaOH ya da 1N HCl kullanarak 5,8'e ayarlanmıştır. Besin ortamlarının sterilizasyonu 1.2 atmosfer basınç altında, 121°C de 20 dakika otoklavlanarak yapılmıştır. Denemeler 3 tekerrürlü kurulmuş ve her petriye (100 x 10 mm'lik) 10 eksplant yerleştirilmiştir. Tüm kültürler 25 °C de 16 saat ışık/8 saat karanlık fotoperiyotta $35\mu \text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ florasan ışığında, kültür odasında büyütülmüştür. Tüm doku kültürü çalışmaları steril kabin içerisinde yapılmış olup, kullanılan alet ve ekipman önceden steril edilmiştir.

3.2.1.2. Bitki büyüme düzenleyicileri

Araştırmada kullanılan tüm büyüme düzenleyicileri Sigma Chemical Co. ya da Merck'den temin edilmiştir. Büyüme düzenleyicileri uygun çözücülerde çözüldükten sonra saf su ile istenilen miktarda ve oranda stok solüsyonları hazırlanmıştır (Çizelge 3.3). Büyüme düzenleyicileri, ortamlar otoklavda steril edilmeden önce ilave edilmiştir. Hazırlanan stok solüsyonlar +4 °C'de 4-6 hafta saklanmıştır.

Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan ortamlarda bulunan besin maddeleri ve konsantrasyonları

ORTAMDA BULUNAN MADDELER	KONSANTRASYONU (mg/l)			
	MS	Bsh	SH	Boi2Y
Makro Elementler				
KNO ₃	1900	3000	2500	1000
KH ₂ PO ₄	170	-	-	300
KCl	-	-	-	65
NH ₄ NO ₃	1650	-	-	1000
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	300	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134	-	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	500	400	35
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	150	200	-
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	-	-	347
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	-	150	-	-
Mikro Elementler				
KI	0,83	0,75	1,00	0,80
H ₃ BO ₃	6,20	3,00	5,00	1,60
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,30	-	-	-
MnSO ₄ ·H ₂ O	-	10,00	10,00	4,40
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,60	2,00	1,00	1,50
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,10	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,20	-
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	0,10	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,85	27,80	15,00	27,80
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,25	37,00	20,00	37,50
Vitaminler ve Aminoasitler				
Myo-Inositol	100,00	100,00	1000,00	100,00
Nicotinic Acid	0,50	1,00	5,00	0,50
Pyrotinic Acid	0,50	1,00	0,50	0,10
Thiamine-HCl	0,10	10,00	5,00	0,10
Glicine	2,00	-	-	2,00
L-glutamine	-	800,00	-	-
Serine	-	100,00	-	-
L-glutathionre	-	10,00	-	-
Yeast extract	-	-	-	2000,00

Çizelge 3.3. Kullanılan büyüme düzenleyicileri ve çözücüler

Büyüme Düzenleyicileri	Çözücü	Saklama Koşulları °C
Oksinler		
2,4-D	1N NaOH veya % 100'lük etanol	+4
NAA	1N NaOH	+4
Sitokininler		
TDZ	DMSO	+4
Kinetin	1 N NaOH	+4
Adenin	1 N NaOH	+4
BAP	1 N NaOH	+4

3.2.1.3. Tohumların yüzey-sterilizasyonu ve çimlendirilmesi

Çalışmalarda kullanılan yonca çeşitlerine ait tohumların yüzey sterilizasyonu % 70'lik ticari çamaşır suyunda (Axiom) 30 dakika manyetik karıştırıcıda çevrilerek yapılmıştır. Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar steril saf su ile 3 kez 5'er dakika durulama işlemine tabi tutulmuştur. Steril edilen tohumlar MSO besin ortamı içeren steril magenta ya da küçük cam kavanozlarda 24 °C'de 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta çimlendirmeye alınmışlardır.

3.2.1.4. *İn vitro*'da yetiştirilen fidelerden eksplant izolasyonu

Yoncaya ait hipokotil ve kotiledon eksplantları 8-10 günlük, yaprak, yaprak sapı ve gövde eksplantları ise 15-20 günlük steril şekilde yetiştirilen fidelerden elde edilmiştir. Eksplantların her biri 5-6 mm uzunluğunda parçalara ayrılarak rejenerasyon ortamına konmuştur.

3.2. 1. 5. Rejenere olan yonca sürgünlerinin köklendirilmesi

Rejenere olan sürgünler bulundukları ortamda (MSO besin ortamı) köklenmeye başlamışlardır. Burada köklenen sürgünler daha sonra iklim odasında kompost

içeren küçük saksılara alınmıştır. Birkaç gün yüksek nemde (% 90) tutularak fidenin hem dış şartlara uyumu hem de kök sisteminin gelişmesi sağlanmıştır.

3.2. 2. Bakteri kültürleri

3.2.2.1. Bakteri kültürlerinin büyütülmesi

Sıvı bakteri kültürlerinin büyütülmesine, -80 °C'de depolanmış olan gliserol stoktan steril bir lup yardımıyla bir parça alınarak veya +4 °C'de NA (Nutrient Agar; Lab-Lemco' Powder 1,0 g/l; Yeast extract 2,0 g/l; Peptona 5,0 g/l; Sodium chloride 5,0 g/l; Agar 15,0 g/l) ve seçici antibiyotikler içeren (Çizelge 3.4) 9 cm'lik petrilerde saklanan bakterilerden tek koloni alınarak başlanmıştır. Bakteri kültürleri 10 ml NB (Lab-Lemco' Powder 1,0 g/l; Yeast extract 2,0 g/l; Peptona 5,0 g/l; Sodium chloride 5,0 g/l) ve seçici antibiyotikler içeren (Çizelge 3.4) 50 ml'lik steril tüplerle kültüre alınmışlardır. Bakteriler bir gece ya da istenilen büyüme elde edilinceye kadar 28 °C, 150 devir/d'da inkübatörde büyütülmüştür.

Yeniden bireysel koloniler elde etmek için; büyüyen sıvı bakteri kültüründen, steril bir lup yardımıyla alınan bakteriler NA ve gerekli antibiyotikler içeren (Çizelge 3.4) agarlı besin ortamı üzerine yayılmıştır. Bu bakteri kültürlerini içeren petri kutuları ters çevrilerek 28 °C'de inkübe edilmiştir. İki gün içerisinde kolonilerin oluşumu gözlenmiştir. Tüm çalışmalar kontaminasyonu önlemek için steril kabin içerisinde yapılmıştır.

3.2.2.2. Bakteri kültürlerinin saklanması

Sıvı bakteri kültürü ve % 40 gliserol içeren NB ortamı eşit miktarlarda alınarak 2 ml'lik kryogenik tüplerde karıştırıldıktan sonra -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Bu şekilde bakterileri 10 yıl muhafaza etmek mümkün olmaktadır. Kısa süreli

muhafaza için katı besin ortamında, büyütülen bakteri kültürleri ters çevrilmiş halde +4°C'de buzdolabında 4-6 hafta saklanabilmiştir.

3.2.2.3. Antibiyotiklerin kullanımı

Antibiyotiklerin stok solüsyonları hazırlandıktan sonra sterilizasyon için mikrofiltrelerden (0,22 µm) geçirilmiştir. Sıvı ortamlara antibiyotikler direk olarak eklenmiş, agarlı ortamlara ise ortam ısısı 45°C'ye düştükten sonra ilave edilmiştir. Kullanılan antibiyotikler, kullanım oranları, çözücüler ve saklama koşulları Çizelge 3.4 ve 3.5 'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. *Agrobacterium tumefaciens* hatlarının büyütülmesinde kullanılan antibiyotikler çözücüler ve saklama koşulları

Antibiyotikler	Kullanım Oranları	Stok (mg/ml)	Çözücüler	Saklama Koşulları °C
Rifampisin	100 mg/l	25	Methanol	- 20
Kanamisin	100 mg/l	50	Su	+ 4

Çizelge 3.5. Gen aktarımı yapılan dokuların seleksiyonunda kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları

Antibiyotikler	Stok (mg/l)	Seleksiyon için Kullanılan Konsantrasyon	Çözündüğü Sıvılar	Saklama Koşulları (°C)
Kanamisin	50	50	su	+4
Fosfinotrisin	2,5	2,5	su	-20
Augmentin *	100	500	su	-20

*Ko-kültivasyondan sonra *A.tumefaciens*'in gelişmesini engellemek için kullanılmıştır.

3.3. Non-onkogenik *A. tumefaciens* Aracılığıyla Yoncaya Gen Aktarımı

Rejenerasyon çalışmaları sonucunda yaprak eksplantının rejenerasyon kabiliyeti en yüksek bulunmuştur. Bu nedenle bu eksplantla çok sayıda gen aktarımı denemesi yapılmıştır. Ayrıca, yaprak sapı eksplantında da rejenerasyonun yüksek olması nedeniyle bu eksplant da gen aktarım çalışmaları yapılmıştır. Denemelerde değişik gen aktarım vektörlerini içeren *A. tumefaciens* hatları kullanılmıştır.

Gerekli antibiyotikleri içeren NB ortamında bir gece büyütülen bakteri hatları ile eksplantlar 1/50 oranında seyreltilmiş bakteri kültüründe 30 dakika bekletilerek inoküle edilmiştir. Daha sonra da eksplantlar sıvı ya da katı yonca sürgün rejenerasyon ortamında değişik (2-5 gün) süreyle ko-kültivasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda eksplantlar *Agrobacterium*'un gelişimini önlemek için 500 mg/l augmentin içeren ve sadece gen aktarımı yapılmış sürgünlerin gelişmesini sağlamak için 50 mg/l kanamisin (pGV2260 ve EHA105) veya 2,5 mg/l fosfonitrisin (LBA4404) içeren sürgün rejenerasyonu ortamına aktarılmıştır. Eksplantlar 4-6 haftada bir alt kültüre alınmıştır. Bu ortamda gelişen kallus, embriyo ve sürgün gelişimi kontrol altında tutularak aktarılan genlerin belirtileri gözlenmiştir. Gelişen embriyo ve sürgünlere gen aktarılıp aktarılmadığı histokimyasal GUS analizi yöntemiyle belirlenmiştir.

3.4. Histokimyasal GUS Analizi

Bazı değişikliklerle birlikte Histokimyasal Gus Analizi Jefferson (119) ve Özcan (41)'ın tarif ettiği gibi yapılmıştır. Gen aktarılmış bitki dokuları 37 °C 'de 4-12 saat süre ile 100 mM Sodyum fosfat (pH 7,0), 10 mM EDTA, %0,1 Triton X-100 ve 1 mM 5-Broma 4-Chloro-3-Indolyl glucoronide (X-GLUC) içeren solüsyonda inkübe edildikten sonra, % 70'lik etanolde bekletilmiştir. Dokular içerisindeki mavi renge göre GUS aktivitesi belirlenmiştir.

3.5. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Çalışmalar tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş olup, her uygulama içerisinde 10 adet eksplantın bulunduğu 3 ya da 4 tekerrürlü petri kutularından oluşmuştur. Elde edilen verilerin “SPSS for Windows” bilgisayar programıyla varyans analizi yapılmıştır. Ortalama değerler yine bilgisayarda MSTAT-C programı kullanılarak “Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi” ile karşılaştırılmıştır. Yüzde değerleri normal dağılıma çevirmek için istatistik analizinden önce “arcsin” dönüştürme işlemi uygulanmıştır (120).



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Adventif Sürgün Rejenerasyonu ile İlgili Bulgular

4.1.1. Vercu çeşidinde BAP ve NAA'nın adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi

Yoncanın Vercu çeşidi ile yapılan *in vitro* adventif sürgün rejenerasyon çalışmalarında yaprak, yaprak sapı ve hipokotil eksplantları 15 günlük *in vitro* gelişen bitkiciklerden izole edilerek değişik oranlarda BAP (1-4 mg/l) ve NAA (0,10-0,50 mg/l) içeren MSO ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 2 hafta sonra eksplantlar üzerinde kallus oluşumu gözlenmiş ve 10 hafta sonra BAP ve NAA dozlarının Vercu çeşidinde kallus oluşturan eksplant yüzdesi ve kallus ağırlığına ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı BAP ve NAA dozlarının Vercu çeşidinin yaprak, yaprak sapı ve hipokotil eksplantlarından kallus oluşumuna etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)		Kallus ağırlığı (g)	
		K. O.	F	K.O.	F.
Genel	80	--			
Ortam	8	2987,317	11,183**	0,208	3,189**
Eksplat	2	3136,397	11,741**	0,886	13,578**
Ortam x Eksplant.	16	514,571	1,926*	0,104	1,590
Hata	54	267,141	--	0,065	--

** p<0.01 düzeyinde önemli

* p<0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi, kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından farklı oranlarda kullanılan BAP ve NAA ile eksplant tipi arasındaki fark 0,01 düzeyinde

önemlilik gösterirken ortam $\times$ eksplant etkileşimi 0,05 düzeyinde önemli bulunmuştur. Kallus ağırlığı bakımından ise eksplantlar ve ortamlar arasındaki fark 0,01 düzeyinde önemli olmasına rağmen ortam $\times$ eksplant etkileşimi arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan Testi sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2 incelendiğinde kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından yaprak eksplantında en yüksek değer %100 ile 1 mg/l BAP- 0,10 mg/l NAA içeren ortamdan ve %96,66 ile 2 mg/l BAP - 0,25 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Ayrıca, 2 mg/l BAP- 0,10 mg/l NAA, 1 mg/l BAP- 0,25 mg/l NAA ve 1-2-4 mg/l BAP- 0,50 mg/l NAA içeren ortamlardan elde edilen sonuçlar da istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir. Yaprak sapı eksplantında en yüksek değer % 100 ile 1 mg/l BAP- 0,25 mg/l NAA içeren ortam ile 1-2- 4 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA içeren ortamlardan elde edilmiştir. Bununla birlikte 1 mg/l BAP- 0,10 mg/l NAA ve 2 mg/l BAP- 0,25 mg/l NAA içeren ortamlardan elde edilen sonuçlarda aynı gruba girmiştir. Hipokotil eksplantında ise kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından en iyi sonuçlar 1-2 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA içeren ortamlardan (%83,33 ve %93,33) elde edilirken 1 mg/l BAP- 0,10 mg/l NAA ve 1-2 mg/l BAP-0,25 mg/l NAA içeren ortamlarda istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir. Kallus ağırlığı bakımından en iyi ortam (0,71g) 2 mg/l BAP - 0,50 mg/l NAA içeren ortam olurken 1 mg/l BAP- 0,25 mg/l NAA, 1-4 mg/l BAP- 0,50 mg/l NAA içeren ortamlarda aynı gruba girmiştir. Kullanılan eksplantlar bakımından ise hipokotil eksplantı (0,63 g) en iyi eksplant olarak belirlenmiştir.

Adventif sürgün rejenerasyonunun başarısını belirlemede sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısının birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Fakat denemelerimizde sürgün gelişimi sadece 4 mg/l BAP ve 0,10 mg/l NAA içeren ortamda ve yaprak eksplantında gözlenmiştir. Bu nedenle sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısına ait varyans analizi yapılmamıştır. Sürgün oluşturan eksplant sayısı

Çizelge 4.2. Farklı BAP ve NAA dozlarının Vercu çeşidinin yaprak, yaprak sapı ve hipokotil eksplantlarından kallus oluşumu ve adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait Duncan Testi sonuçları

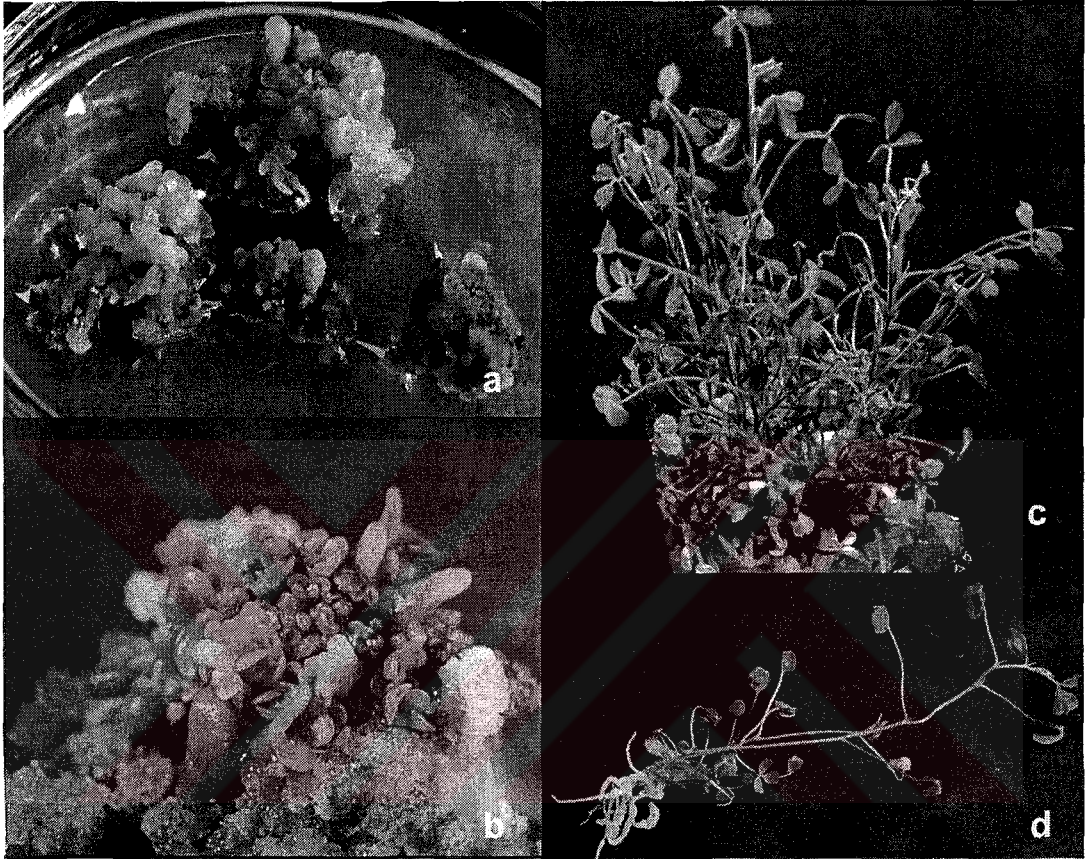
Ortamlar (mg/l)		Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)						Kallus Ağırlığı (g)				Sürgün Oluşturan Eksplant Sayısı	Petri Başına Sürgün Sayısı
BAP	NAA	Yaprak	Yaprak sapı	Hipokotil	Ortamların Ortalaması	Yaprak	Yaprak sapı	Hipokotil	Ortamların Ortalaması	Yaprak	Yaprak sapı	Yaprak	Yaprak
1	0,10	100,00 a	76,66 ab	70,00 abc	82,22	0,03	0,127	0,68	0,32 bcd	0		0	0
2	0,10	73,33 ab	66,66 bc	36,66 bc	58,88	0,10	0,46	0,20	0,25 d	0		0	0
4	0,10	63,33 b	66,66 bc	33,33 bc	54,44	0,31	0,28	0,49	0,36 bcd	3		229	0
1	0,25	90,00 ab	100,00 a	70,00 abc	86,66	0,41	0,29	0,67	0,45 abcd	0		0	0
2	0,25	96,66 a	96,66 ab	70,00 abc	87,77	0,53	0,09	0,44	0,35 bcd	0		0	0
4	0,25	13,33 c	40,00 c	40,00 bc	31,11	0,06	0,05	0,72	0,28 cd	0		0	0
1	0,50	93,33 ab	100,00 a	83,33 a	92,22	0,31	0,43	0,95	0,56 ab	0		0	0
2	0,50	86,66 ab	100,00 a	93,33 a	93,33	0,65	0,50	0,98	0,71 a	0		0	0
4	0,50	93,33ab	100,00 a	23,33 c	72,22	0,51	0,52	0,59	0,54 abc	0		0	0
Eksplantların Ortalaması		78,88	82,96	57,77		0,32 B	0,32 B	0,63 A					

Aynı sütun içerisinde farklı küçük harflerle, aynı satır içerisinde farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.
LSD=26,76

ve petri başına sürgün sayısı değerleri hesaplanarak Çizelge 4.2’de verilmiştir. Canlılığını koruyan kalluslardan 3 tanesinin üzerinde kültür başlangıcından 6-7 ay sonra embriyo gelişimi gözlenmiş olup 9. ay sonunda bu embriyolardan toplam 229 adet sürgün gelişimi olduğu görülmüştür (Resim 4.1.).

In vitro çalışmalarda bitki büyüme düzenleyicilerinin adventif sürgün rejenerasyonunun başarısını en fazla etkileyen etmenlerin başında geldiği ve besin ortamındaki oksin-sitokinin dengesinin iyi ayarlanması neticesinde *in vitro* rejenerasyon kabiliyeti son derece düşük olan bitkilerden de yüksek oranlarda adventif sürgün rejenerasyonunun elde edilebileceği değişik araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (27,116,8). Aynı araştırmacılar en uygun oksin-sitokinin dengesinin eksplantın yapısına göre de değiştiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada da ortam x eksplant etkileşiminin kallus oluşumuna etkisinde benzer sonuçlar elde edilmesine rağmen kallus ağırlığına etkisi olmadığı görülmüştür.

Özgen ve arkadaşları (95) Elçi ve Mesa-Sirsa yonca çeşitlerinde yaptıkları mikro çoğaltım çalışmasında Elçi çeşidinde 2 mg/l BAP ve 0,2 mg/l NAA içeren ortamdan, Mesa-Sirsa çeşidinde ise 1 mg/l BAP- 0,2 mg/l NAA içeren ortamdan en iyi sonuçları elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise adventif sürgün rejenerasyonu sadece yaprak eksplantında tek bir ortamdan elde edilmiştir. Bu ortamda kalluslar üzerinde önce embriyo oluşumu gözlenmiş daha sonra bu embriyolardan sürgünler gelişmiştir. Iantcheva et al., (97) ise yüksek oranda TDZ ve BAP konsantrasyonlarının somatik embriyo oluşumunda etkili olduğunu bildirmişlerdir. Ivanova et al., (92), embriyogenik potansiyelin açığa çıkartılmasında büyümeyi düzenleyiciler arasındaki orantının önemli olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada da denenen BAP konsantrasyonlarından en yükseği olan 4 mg/l BAP ile sadece 0,10 mg/l NAA içeren ortamda embriyo oluşumu görülmüştür.



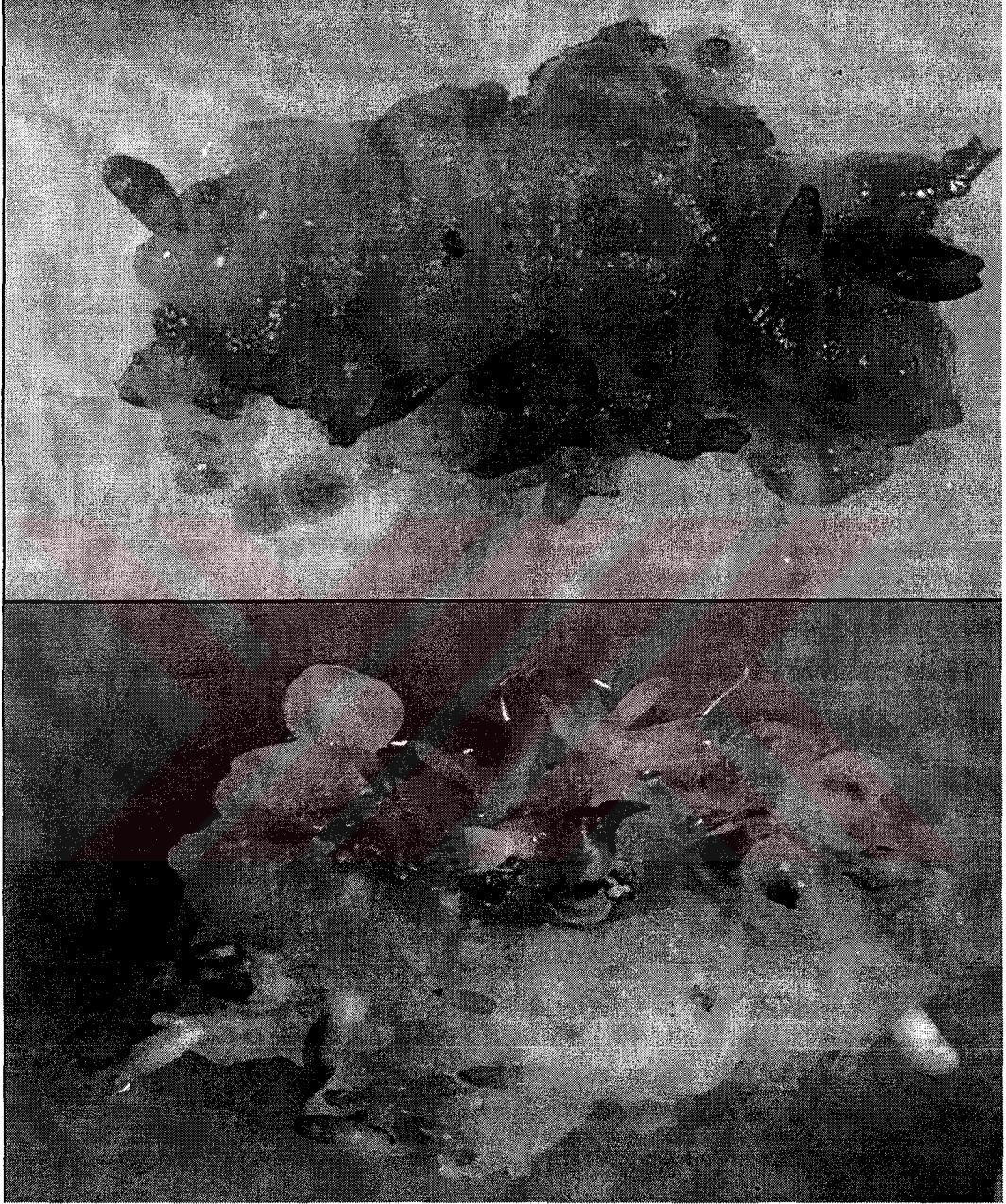
Resim 4.1. Vercos çeşidinin yaprak eksplantında BAP ve NAA'nın somatik embriyo oluşumu ve adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi
 (a) kültür başlangıcından 3 ay sonra 4 mg/l BAP-0,01 mg/l NAA içeren ortamda kallus oluşumu
 (b) kültür başlangıcından 6 ay sonra kalluslar üzerinde MSO ortamında somatik embriyo gelişimi
 (c, d) 9. ayın sonunda somatik embriyolardan MSO ortamında gelişen bitkicikler

4.1.2. Yonca çeşitlerinden somatik embriyogenesis yoluyla adventif sürgün eldesi

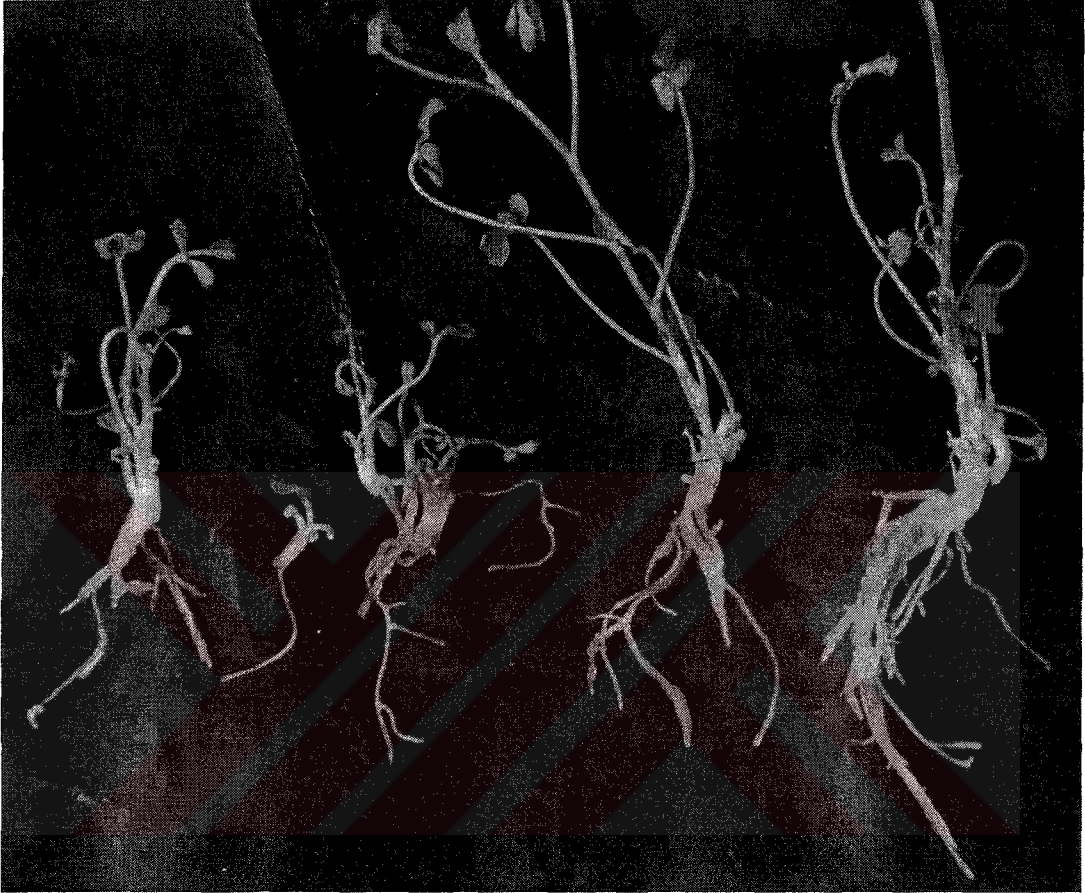
BAP ve NAA dozlarına ait ortamlarla kurulan denemeden istenilen sonuçlar alınamadığı için somatik embriyogenesis yöntemiyle adventif sürgün rejenerasyonunun sağlanması amaçlanmıştır. Bu nedenle birçok araştırmacı tarafından da adventif sürgün gelişimi için kullanılan Brown et al. (75)'in yaptıkları denemeler sonucu elde ettikleri protokolün yüksek rejenerasyon kabiliyetine sahip kültürler için en iyi sonucu verdiğini belirttikleri üç aşamalı protokol kullanılmıştır.

Yonca'ya ait 9 farklı çeşidin yaprak, yaprak sapı, gövde ve hipokotil eksplantları *in vitro* gelişen bitkiçiklerden izole edilerek embriyogenik kallus oluşumu için 1 mg/l adenin, 1 mg/l 2,4-D ve 0,2 mg/l kinetin içeren Bsh ortamında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 1 hafta sonra eksplantlar üzerinde kallus oluşumu başlamıştır. Kültür başlangıcından 21 gün sonra kalluslar 11 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l kinetin içeren SH ortamına embriyo gelişimi için aktarılmıştır. Bazı petrilerde kültür başlangıcından 4- 6 hafta sonunda embriyo oluşumu elde edilmiştir. Embriyo gelişiminin gözlendiği kallusların genellikle açık renkli ve şeffaf olduğu gözlenmiştir (Resim 4.2.). Bununla birlikte yeşil ve daha kompakt görüntülü kalluslarda da embriyo gelişimi olmasına rağmen embriyo oluşumu 3-4 hafta kadar daha geçikmiştir. Embriyoların olgunlaşması amacıyla embriyogenik kalluslar SH ortamına alındıklarından 21 gün sonra Boi2y ortamına aktarılmıştır. Boi2y ortamından sonra kültürler 4-6 haftalık periyotlarla MSO ortamında alt kültüre alınmıştır. Tam olarak sürgün gelişimi ise 8 ay gibi uzun bir süre almasına rağmen gelişen sürgünlerin kök sistemleri oldukça sağlıklı olmuştur (Resim 4.3.). Kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu ile ilgili varyans analizi sonuçları Çizelge 4.3' de verilmiştir.

Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi, kullanılan eksplantların kallus oluşturan eksplant yüzdesi üzerine etkisi 0,01 düzeyinde önemli çıkarken kullanılan çeşitlerin etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Kallus ağırlığı bakımından ise kullanılan



Resim 4.2. Vercos çeşidinin yaprak eksplantı üzerinde oluşan açık renkli ve şeffaf kalluslardan 11 mg/l 2,4-D ve 0,2 mg/l kinetin içeren SH ortamında somatik embriyo gelişimi



Resim 4.3. Verco çeşidinde somatik embriyolardan MSO ortamında gelişen bitkiciklerde kök ve gövde oluşumu

Çizelge 4.3. Farklı yonca çeşitlerinin yaprak, yaprak sapı, gövde ve hipokotil eksplantlarından kallus oluşumu ve adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)		Kallus Ağırlığı (g)		Embriyo Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)		Eksplant Başına Embriyo Sayısı (adet)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	
		K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.
Genel	96										
Çeşit	7	1039,985	1,734	1,531	6,209 **	421,816	3,010 **	2147,945	24,387 **	103,024	14,889 **
Eksplant	3	4565,228	7,614 **	0,798	3,237 *	228,624	1,631	575,220	6,531 **	17,694	2,557
Çeşit x Eksplant	21	880,032	1,468	0,833	3,376 **	115,902	0,827	584,106	6,632 **	16,560	2,393 **
Hata	64	599,621		0,247		140,148		88,077		6,919	

** p<0.01 düzeyinde önemli

* p<0.05 düzeyinde önemli

çeşitlerin tek başına etkisi 0.01 düzeyinde, ortamların tek başına etkisi ise 0,05 düzeyinde önemli, aynı zamanda çeşit x eksplant etkileşimi de 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Embriyo oluşturan eksplant yüzdesi incelendiğinde çeşitlerin etkisi 0,01 düzeyinde önemli bulunurken eksplantların etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Eksplant başına embriyo sayısı incelendiğinde ise çeşitlerin ve eksplantların tek başına etkisi ile çeşit x eksplant etkileşimi 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Kullanılan çeşitlerin ve eksplantların eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi incelendiğinde çeşitlerin 0,01 düzeyinde önemli olduğu görülürken eksplantların etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. Ayrıca çeşit x eksplant etkileşiminin etkisinin de 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan Testi sonuçları Çizelge 4.4-5 ' de verilmiştir.

Çizelge 4.4 incelendiğinde kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından çeşitler arasında önemli bir farklılık olmamakla birlikte en yüksek değerler Hemedan ve Elçi çeşitlerinde (%91,66) görülmektedir. Vercos çeşidi ise %90,83 ile en yüksek ikinci değere sahip olmuştur. Kullanılan eksplantlar bakımından ise ortalamaların %99,58 ile %62,91 arasında olduğu, hipokotil eksplantının en iyi sonucu verdiği bunu %83,75 ile gövde eksplantının izlediği görülmüştür. Kallus ağırlığı bakımından ise Vercos (1,04g), Kayseri (0,68g), Hemedan (1,38g), Elçi (1,39g) ve Bitlis (0,91g) çeşitleri için kullanılan tüm eksplant tiplerinden (gövde, yaprak, y.sapı, hipokotil) elde edilen kallus ağırlıkları arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır. Nitro alfalfa çeşidinde de ise en yüksek kallus ağırlığı veren eksplantlar gövde (1,57g), yaprak sapı (1,40g) ve hipokotil (1,03g) olurken yaprak eksplantından hiç kallus elde edilememiştir. Peru çeşidinde ise gövde eksplantının (3,28 g), en fazla kallus verdiği yaprak (1,64g), yaprak sapı (1,07g) ve hipokotil (1,37g) eksplantlarının ise istatistiksel olarak ikinci grupta yer aldığı görülmüştür. Kalender çeşidinde de yaprak (1,37g), yaprak sapı (1,20g) ve hipokotil eksplantları (1,80 g) istatistiksel olarak birinci grupta yer almıştır. Gövde eksplantı (0,62g) ise ikinci grupta yer almıştır.

Çizelge 4.4. Farklı yonca çeşitlerinin yaprak, yaprak sapı, gövde ve hipokotil eksplantlarından kallus oluşumuna etkisine ait Duncan Testi sonuçları

Çeşitler	Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)					Kallus Ağırlığı (g)				
	Gövde	Yaprak	Yaprak sapı	Hipokotil	Çeşitlerin Ortalaması	Gövde	Yaprak	Yaprak sapı	Hipokotil	Çeşitlerin Ortalaması
Verco	83,33	83,33	96,66	100,00	90,83	1,59 b* A	0,73 bc A	0,97 ab A	0,88 a A	1,04
Kayseri	66,66	60,00	66,66	100,00	73,33	0,64 c A**	0,66 bc A	0,42 b A	1,03 a A	0,68
Hemedan	100,00	66,66	100,00	100,00	91,66	1,46 bc A	1,67 a A	1,21 ab A	1,18 a A	1,38
Elçi	100,00	100,00	66,66	100,00	91,66	1,58 b A	1,50 ab A	1,07ab A	1,44 a A	1,39
Nitro alfalfa	100,00	0,00	100,00	100,00	75,00	1,57 b A	0,00 c B	1,40 a A	1,03 a A	1,00
Peru	63,33	63,33	60,00	96,66	70,83	3,28 a A	1,64 a B	1,07 ab B	1,37 a B	1,84
Bitlis	90,00	66,66	86,66	100,00	85,83	0,71 bc AB	0,48 c A	1,50 a A	0,96 a AB	0,91
Kalender	66,66	63,33	53,33	100,00	70,83	0,62 c B	1,37 ab AB	1,20 ab AB	1,80 a A	1,25
Eksplantların Ortalaması	83,75 b**	62,91 c	78,75 bc	99,58 a		1,43	1,00	1,11	1,21	

LSD=0,81

*) Aynı sütun içerisinde farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.

**) Aynı satır içerisinde farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.5 incelendiğinde embriyo oluşturan eksplant yüzdesi bakımından eksplantlar arasında her ne kadar istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmasa da en iyi eksplant (%8,75) yaprak olarak belirlenmiştir. En iyi çeşidin ise Verco (%14,16) olduğu görülmüştür. Kayseri (%7,50), Hemedan (10,83) ve Nitro alfalfa (%6,66) çeşitlerinden elde edilen sonuçlar da istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir. Eksplant başına embriyo sayısına bakıldığında Verco çeşidinde 93,56 adet ile en iyi sonuç yaprak eksplantından elde edilirken yaprak sapı eksplantında embriyo oluşumu görülmemiştir. Verco çeşidine ait gövde eksplantında eksplant başına 30,50 adet embriyo oluşurken hipokotil eksplantında 34,00 adet embriyo oluşmuştur. Verco çeşidi dışındaki çeşitlerde ise kullanılan eksplantlar arasında önemli farklılıklar bulunmadığından tüm eksplantların aynı gruba girdiği görülmüştür. Ancak, Kayseri çeşidinde en iyi sonuç yaprak eksplantından (2,66 adet) elde edilirken, gövde eksplantında embriyo gelişimi gözlenmemiştir. Hemedan çeşidinde ise gövde eksplantında eksplant başına 6,33 adet embriyo oluşurken en düşük embriyo oluşumunun gözlendiği hipokotil eksplantında 5,33 adet embriyo oluştuğu belirlenmiştir. Elçi çeşidi incelendiğinde yaprak (2,66 adet) ve hipokotil (2,33 adet) eksplantlarında embriyo oluşurken gövde ve yaprak sapı eksplantlarının hiç embriyo oluşturmadığı görülmüştür. Nitro alfalfa çeşidinde ise en iyi sonuç 5,00 adet ile gövde eksplantından elde edilirken, yaprak eksplantında embriyo oluşmamıştır. Peru, Bitlis ve Kalender çeşitlerinde de hipokotil eksplantı dışındaki eksplantlarda embriyo oluşumu gözlenmemiştir. Bu çeşitlere ait hipokotil eksplantlarında ise eksplant başına sırasıyla 5,83 adet, 1,00 adet ve 4,66 adet embriyo oluştuğu belirlenmiştir.

Kullanılan çeşitlerin ve eksplantların eksplant başına sürgün sayısına etkisi incelendiğinde ise Verco çeşidinde en iyi eksplantın yaprak eksplantı (15,66 adet) olduğu görülmektedir. Hipokotil eksplantından 11,00 adet, gövde eksplantından ise 6,66 adet sürgün elde edilirken yaprak sapı eksplantında embriyo oluşumu olmadığından sürgün gelişimi olmamıştır. Diğer çeşitlerde ise kullanılan tüm eksplant tiplerinden elde edilen sürgün sayıları arasında istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır. Ancak Kayseri, Hemedan ve Peru çeşitlerinde sadece hipokotil eksplantında sürgün oluşumu görülmesine rağmen tüm eksplantlar aynı

Çizelge 4.5. Farklı yonca çeşitlerinin yaprak, yaprak sapı, gövde ve hipokotil eksplantlarından somatik embriyogenesis yoluyla adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait Duncan Testi sonuçları

Çeşitler	Embriyo Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)					Eksplant Başına Embriyo Sayısı ¹ (adet)					Eksplant Başına Sürgün Sayısı ¹ (adet)				
	Gövde	Yaprak	Yaprak sapı	Hipokotil	Çeşitler Ort.	Gövde	Yaprak	Yaprak sapı	Hipokotil	Çeşitler Ort.	Gövde	Yaprak	Yaprak sapı	Hipokotil	Çeşitler Ort.
Vercö	13,33	26,66	0,00	16,66	14,16a	30,50 aB	93,56 aA	0,00 aC	34,00 aB	39,51	6,66 aC	15,66 aA	0,00D	11,00 aB	8,33
Kayseri	0,00	16,66	6,66	6,66	7,50ab	0,00 bA	2,66 bA	1,33 aA	1,83 bA	1,45	0,00 bA	0,00 bA	0,00A	0,33 bA	0,08
Hemedan	6,66	16,66	10,00	10,00	10,83ab	6,33 bA	5,83 bA	5,66 aA	5,33 bA	5,79	0,00 bA	0,00 bA	0,00A	0,66 bA	0,16
Elçi	0,00	10,00	0,00	3,33	3,33b	0,00 bA	2,66 bA	0,00 aA	2,33 bA	1,25	0,00 bA	0,00 bA	0,00A	0,00 bA	0,00
Nitro alfalfa	10,00	0,00	6,66	10,00	6,66ab	5,00 bA	0,00 bA	3,66 aA	1,00 bA	2,41	0,00 bA	0,00 bA	0,00A	0,00 bA	0,00
Peru	0,00	0,00	0,00	10,73	2,68b	0,00 bA	0,00 bA	0,00 aA	5,83 bA	1,45	0,00 bA	0,00 bA	0,00A	0,33 bA	0,08
Bitlis	0,00	0,00	0,00	3,33	0,83b	0,00 bA	0,00 bA	0,00 aA	1,00 bA	0,25	0,00 bA	0,00 bA	0,00A	0,00 bA	0,00
Kalender	0,00	0,00	0,00	3,33	0,83b	0,00 bA	0,00 bA	0,00 aA	4,66 bA	1,16	0,00 bA	0,00 bA	0,00A	0,00 bA	0,00
Eksplantlar Ort.	3,75	8,75	2,91	8,00		5,22	13,09	1,33	7,00		0,83	1,95	0,00	1,54	

LSD=15,31

LSD=4,29

Aynı sütun içerisinde farklı küçük harflerle, aynı satır içerisinde farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark $p < 0,05$ düzeyinde önemlidir.

¹ Embriyo ve sürgün oluşturan eksplant başına embriyo ve sürgün sayısı.

gruba girmiştir. Elçi, Nitro alfalfa, Bitlis ve Kalender çeşitlerinde ise eksplantlarda sürgün oluşumu gözlenmemiştir.

Yapılan birçok araştırmada somatik embriyo oluşumunda etkili olan faktörler genotip, eksplant kaynağı ve besin ortamının içeriği olarak sıralanmaktadır (60). Brown et al., (75) 3 aşamalı ortam kullanarak yaptıkları çalışmada *M.sativa* türüne ait 76 kültürü incelemişler ve yüksek rejenerasyona sahip kültürlerin aynı gen kaynağından geldiğini bildirmişlerdir. Yine birçok araştırmacı yaptıkları denemelerde somatik embriyo oluşumu ile genotip arasında önemli ilişki bulunduğunu ve rejenerasyon kabiliyetinin yüksek oranda genotipe bağlı olduğunu belirtmişlerdir (76, 78, 79, 80, 82, 83, 85). Parrott and Bailey (86), somatik embriyo oluşum frekansının türlere göre farklılık göstermesi yanı sıra aynı tür içerisindeki genotip ve çeşitlerin de embriyo oluşturma yeteneğinin farklı olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiş olup, kullanılan *M.sativa* L. türüne ait çeşitler arasında somatik embriyo gelişimi bakımından önemli farklılıkların olduğu görülmüştür.

4.1.3. Verco çeşidinde MS ve Bsh temel besin ortamlarında adenin, kinetin ve 2,4-D'nin somatik embriyogenesis yoluyla adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi

Somatik embriyogenesis yoluyla sürgün rejenerasyonu çalışmasının sonucunda Verco'nun en iyi çeşit olarak belirlenmesiyle çalışmalara bu çeşit ile devam edilmiştir. MS ve Bsh temel besin ortamlarında (TBO) kotiledon, yaprak ve yaprak sapı eksplantları adenin (1-2 mg/l), kinetin (0,2-0,4 mg/l) ve 2,4-D (1-4 mg/l)'nin farklı dozlarındaki kombinasyonlarında kültüre alınmıştır. Eksplantlar *in vitro* şartlarda yetiştirilen 15 günlük bitkilerden alındıktan sonra kültür ortamına aktarılmış ve 1 hafta sonunda kallus oluşumunun başladığı gözlenmiştir. Kültür başlangıcından 8 hafta sonra kalluslar hormon içermeyen ortamlara aktarılmış ve bu ortamlara aktarıldıktan 4-5 ay sonra embriyo oluşumu ve ardından sürgün gelişimi gözlenmiştir. Tüm eksplantlar kallus oluşturdıkları için kallus oluşturan eksplant

yüzdesi bakımından istatistiksel bir değerlendirme yapılmamıştır. Kallus ağırlığı, embriyo oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına embriyo ve sürgün sayısı bakımından yapılan varyans analizi sonuçları Çizelge 4.6'da, farklılıkların önem düzeyini belirlemek için yapılan Duncan Testi sonuçları da Çizelge 4.7-8 ve 9'da verilmiştir.

Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi kallus ağırlığı bakımından kullanılan eksplantların ve ortamların etkisi ile TBO x ortam etkileşimi 0,01 düzeyinde önemli bir farklılık gösterirken temel besin ortamlarının etkisi 0,05 düzeyinde önemli bulunmuştur. TBO x ortam x eksplant ve ortam x eksplant etkileşimin kallus ağırlığı üzerine etkisi ise istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Embriyo oluşturan eksplant

Çizelge 4.6. Vercò çeşidinde farklı eksplantların MS ve Bsh temel besin ortamlarında adenin, kinetin ve 2,4-D'nin farklı dozlarının kallus ağırlığı ve adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	Kallus Ağırlığı (g)		Embriyo Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)		Eksplant Başına Embriyo Sayısı (adet)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	
		K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.
Genel	144								
T.B. O.	1	0,037	4,225*	14,221	0,512	10,081	0,401	0,001	0,001
Ortam	7	0,030	3,395**	315,227	11,357**	249,371	9,930**	16,298	11,372**
Eksplant	2	0,069	7,801**	76,875	2,770	171,467	6,828**	8,898	6,209**
TBO x Ortam	7	0,060	6,809**	415,563	14,972**	329,135	13,106**	21,731	15,162**
TBO x Eksplant	2	0,011	1,252	9,300	0,335	20,006	0,797	0,712	0,497
Ortam x Eksplant	14	0,012	1,440	38,261	1,379	84,918	3,381**	4,220	2,945
TBO x Ortam x Eksplant	14	0,009	1,022	47,914	1,726	106,555	4,243**	5,390	3,761**
Hata	96	0,008		27,755		25,114		1,433	

** p<0.01 düzeyinde önemli

* p<0.05 düzeyinde önemli

yüzdesine incelendiğinde ise ortamların tek başına etkisi ve TBO x ortam etkileşimi 0,01 düzeyinde önemli çıkarken eksplantların ve temel besin ortamlarının tek başına etkisi istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır. Ayrıca TBO x eksplant, ortam x eksplant ve TBO x ortam x eksplant etkileşimleri de istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Kullanılan temel besin ortamı, ortam ve eksplantların eksplant başına embriyo sayısına etkisi incelendiğinde ortamların ve eksplantların etkisi 0,01 düzeyinde önemli bulunurken temel besin ortamlarının etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. Yine eksplant başına embriyo sayısı bakımından TBO x ortam x eksplant etkileşiminin, TBO x ortam ve ortam x eksplant etkileşimlerinin 0,01 düzeyinde önemli olduğu görülürken TBO x eksplant etkileşimi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Eksplant başına sürgün sayısı incelendiğinde ise temel besin ortamlarının, TBO x eksplant, ortam x eksplant etkileşimlerinin istatistiksel olarak önemli olmadığı görülürken ortamların ve eksplantların etkisi ile TBO x ortam, TBO x ortam x eksplant etkileşimlerinin 0,01 düzeyinde önemli olduğu görülmüştür.

Çizelge 4. 7. Vercu çeşidinde MS ve Bsh temel besin ortamlarında adenin, kinetin ve 2,4-D'nin farklı dozlarında kullanılan eksplantların kallus ağırlığına etkisine ait Duncan Testi sonuçları.

Eksplantlar	Kallus Ağırlığı (g)
Kotiledon	0,330 a
Yaprak	0,308 a
Yaprak sapı	0,256 b

Aynı sütun içersinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.7 incelendiğinde kallus ağırlığı bakımından en iyi eksplantların kotiledon (0,330g) ve yaprak (0,308g) eksplantları olduğu görülmektedir. Yaprak sapı eksplantında ise eksplant başına kallus ağırlığı ortalaması 0,256 g olmuştur.

Çizelge 4. 8 incelendiğinde ise kallus ağırlığı bakımından MS temel besin ortamında 1 mg/l adenin- 0,2 mg/l kinetin- 1 mg/l 2,4-D içeren ortam (0,39 g) ile 2 mg/l adenin- 0,4 mg/l kinetin- 4 mg/l 2,4-D içeren ortam (0,38 g) en iyi sonuçları

vermiştir. Bsh temel besin ortamında ise kallus ağırlığı bakımından en iyi sonuçlar 0,40 g ile 1 mg/l adenin- 0,2 mg/l kinetin- 4 mg/l 2,4-D içeren ortam ve 0,41 g ile 2 mg/l adenin- 0,4 mg/l kinetin- 1 mg/l 2,4-D içeren ortamdan elde edilmiştir. Ayrıca 1 mg/l adenin-0,4 mg/l kinetin-1 mg/2,4-D, 2 mg/l adenin- 0,2 mg/l kinetin- 1-4 mg/l 2,4-D içeren ortamlardan elde edilen sonuçlar da istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir.

Çizelge 4.8. Vercos çeşidinde farklı eksplantların MS ve Bsh temel besin ortamlarında adenin, kinetin ve 2,4-D'nin farklı dozlarının kallus ağırlığı ve embriyo oluşturan eksplant yüzdesi bakımından TBO x ortam arasındaki etkileşimine ait Duncan Testi sonuçları.

Ortamlar (mg/l)			Kallus Ağırlığı (g)		Embriyo Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)	
Adenin	Kinetin	2,4-D	MS	Bsh	MS	Bsh
1	0,2	1	0,39 a	0,28 bc	17,77	0,00
1	0,2	4	0,23 bc	0,40 a	0,00	0,00
1	0,4	1	0,16 c	0,31 ab	0,00	0,00
1	0,4	4	0,28 b	0,21 c	0,00	0,00
2	0,2	1	0,28 b	0,33 ab	0,00	12,22
2	0,2	4	0,26 b	0,32 ab	0,00	0,00
2	0,4	1	0,28 b	0,41 a	0,00	0,00
2	0,4	4	0,38 a	0,27 bc	0,00	0,00

Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.
LSD=0,08

Yine Çizelge 4.8 incelendiğinde eksplant yüzdesi bakımından iki farklı temel besin ortamı uygulamalarından farklı sonuçlar alındığı belirgin olarak görülmektedir. MS temel besin ortamında sadece 1 mg/l adenin, 0,2 mg/l kinetin ve 1 mg/l 2,4-D içeren ortamda bulunan eksplantlarda (%17,77) embriyo oluşumu gözlenmiştir. Bsh temel besin ortamında da sadece 2 mg/l adenin, 0,2 mg/l kinetin ve 1 mg/l 2,4-D içeren ortamda bulunan eksplantlar üzerinde (%12,22) embriyo oluşmuştur.

Eksplant başına embriyo sayısı ve sürgün sayısına ait Duncan Testi sonuçlarının bulunduğu Çizelge 4.9 incelendiğinde eksplant başına embriyo sayısı bakımından 1 mg/l adenin, 0,2 mg/l kinetin ve 1 mg/l 2,4-D içeren ortamda tüm eksplant tipleri embriyo oluşturmuştur. Embriyo sayısı bakımından en iyi eksplantın 24,17 adet ile yaprak eksplantı olduğu görülmektedir. Embriyo sayısının kotiledon eksplantında 13,00 adet ve yaprak sapı eksplantında 4,17 adet olduğu belirlenmiştir. Bsh temel besin ortamında ise embriyo oluşumunun sadece 2 mg/l adenin, 0,2 mg/l kinetin ve 1 mg/l 2,4-D içeren ortamda, yaprak ve kotiledon eksplantlarında meydana geldiği görülmüştür. Yaprak eksplantında eksplant başına embriyo sayısı 39,93 adet, kotiledon eksplantında ise 14,10 adet olmuştur. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından da aynı sonuçlar elde edilmiştir. MS temel besin ortamında en çok sürgün veren eksplant olan yaprak eksplantında sürgün sayısı 7,93 adet olurken en az sürgün veren yaprak sapı eksplantında 1,50 adet sürgün oluşmuştur. Bsh temel besin ortamında ise 7,33 adetle en iyi sonucu yine yaprak eksplantı vermiştir.

Somatik embriyogenesis için besin ortamında bulunan büyümeyi düzenleyicilerin yanında kullanılan mineral ve vitaminler de önemlidir. Yapılan literatür taramasında farklı mineral ve vitamin içeriğine sahip ortamların kullanılarak başarılı sonuçlar elde edildiği tespit edilmiştir (76, 86, 93, 94). Suginobu et al., (93) ise farklı mineral ve vitamin içeriğine sahip MS ve B5 ortamlarını kullanarak yaptığı denemede ortamlar arasında önemli farklılık bulunmadığını tespit etmişlerdir. Eksplant kaynağının, eksplant x ortam arasındaki etkileşimin önemli olduğunu bildirmişlerdir. Yine birçok araştırmacı eksplant kaynağının ve ortam içeriğinin somatik embriyo oluşumunda etkili olduğunu belirtmiştir (78, 87, 88). Benzer sonuçlar bu çalışmada da elde edilmiştir. MS ve Bsh temel besin ortamları arasında farklı hormon içeriklerinde sonuç alınırken eksplantlar ve eksplant x ortam etkileşimi arasında önemli farklılık bulunmuştur. Hatta somatik embriyo oluşumunda farklı mineral ve vitamin içeriğine sahip ortamlarda ve farklı hormon kombinasyonlarından sadece birinden sonuç alınabilecek kadar önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.9. Verco çeşidinde farklı eksplantların MS ve Bsh temel besin ortamlarında adenin, kinetin ve 2,4-D'nin farklı dozlarının eksplant başına embriyo sayısı ve eksplant başına sürgün sayısına etkisine ait Duncan Testi sonuçları.

Ortamlar (mg/l)			Eksplant Başına Embriyo Sayısı ¹ (adet)						Eksplant Başına Sürgün Sayısı ¹ (adet)					
Adenin	Kinetin	2,4 D	MS			Bsh			MS			Bsh		
			Kotiledon	Yaprak	Yaprak sapı	Kotiledon	Yaprak	Yaprak sapı	Kotiledon	Yaprak	Yaprak sapı	Kotiledon	Yaprak	Yaprak sapı
1	0,2	1	13,00 aB	24,16 aA	4,16 aC	0,00 bC	0,00 bC	0,00 C	2,83 aB	7,93 aA	1,50 aBC	0,00 bC	0,00 bC	0,00 C
1	0,2	4	0,00 b	0,00 b	0,000a	0,00 b	0,00 b	0,00	0,00 b	0,00 b	0,00 a	0,00 b	0,00 b	0,00
1	0,4	1	0,00 b	0,00 b	0,00 a	0,00 b	0,00 b	0,00	0,00 b	0,00 b	0,00 a	0,00 b	0,00 b	0,00
1	0,4	4	0,00 b	0,00 b	0,000a	0,00 b	0,00 b	0,00	0,00 b	0,00 b	0,00 a	0,00 b	0,00 b	0,00
2	0,2	1	0,00 bC	0,00 bC	0,00 aC	14,100 B	39,93 aA	0,00 C	0,00 bC	0,00 bC	0,00 aC	5,07 aB	7,33 aA	0,00 C
2	0,2	4	0,00 b	0,000b	0,00 a	0,00 b	0,00 b	0,00	0,00 b	0,00 b	0,00 a	0,00 b	0,00 b	0,00
2	0,4	1	0,00 b	0,00 b	0,00 a	0,00 b	0,00 b	0,00	0,00 b	0,00 b	0,00 a	0,00 b	0,00 b	0,00
2	0,4	4	0,00 b	0,000b	0,00 a	0,00 b	0,00 b	0,00	0,00 b	0,00 b	0,00 a	0,00 b	0,00 b	0,00

LSD=8,12

LSD=1,94

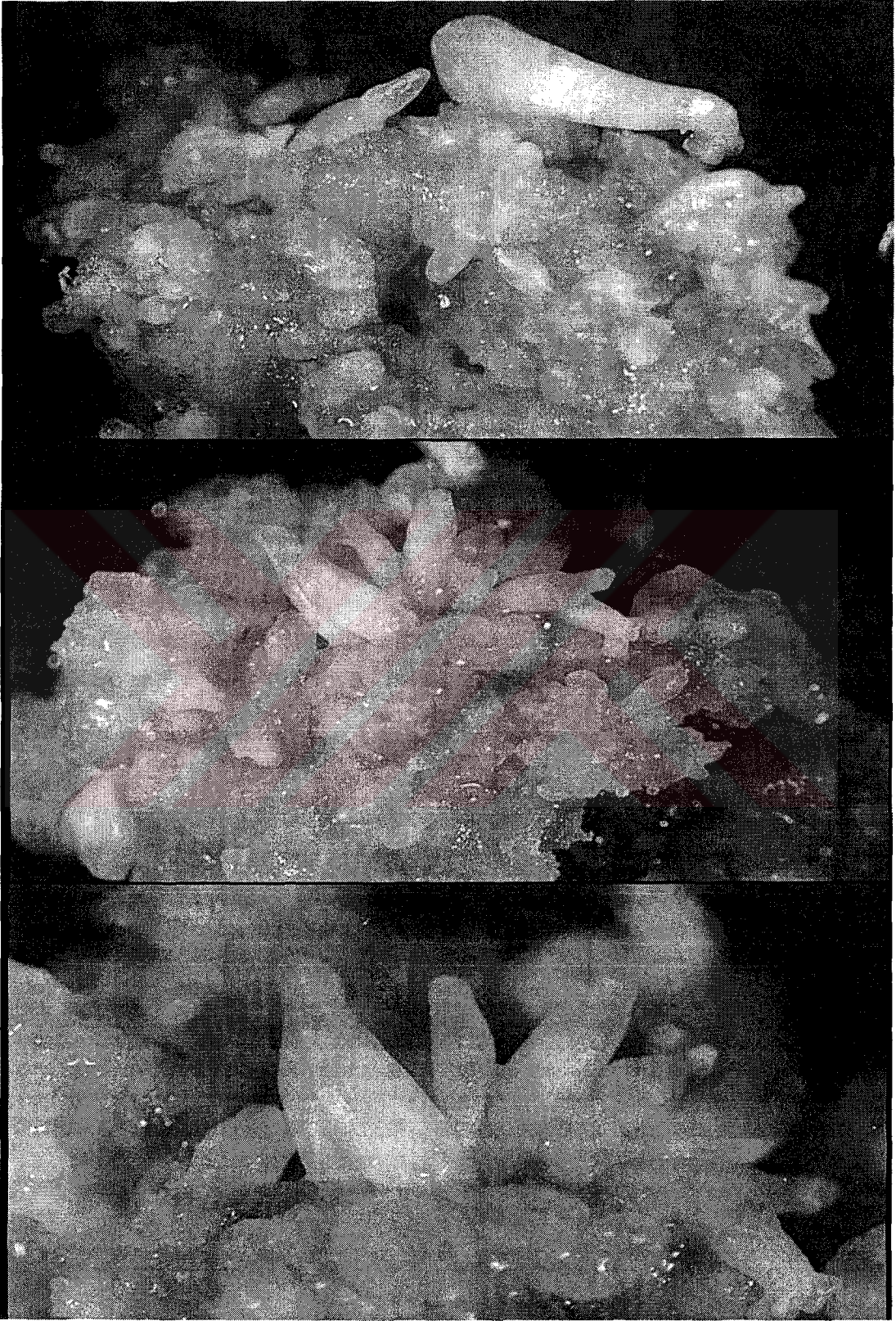
Aynı sütun içerisinde küçük harflerle, aynı satır içerisinde büyük harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.

¹ Embriyo ve sürgün oluşturan eksplant başına embriyo ve sürgün sayısı

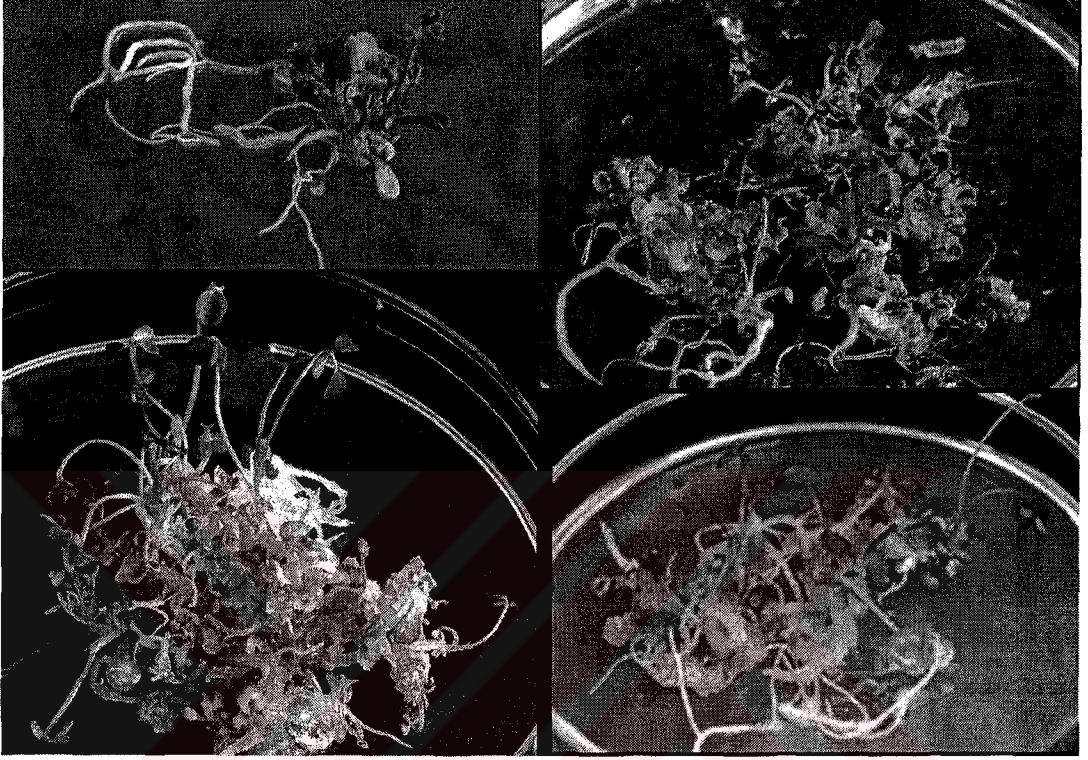
4.1.4. Verco çeşidinde MS, Bsh ve SH temel besin ortamlarında 2,4-D, kinetin ve BAP'ün somatik embriyogenesis aracılığıyla adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi

Somatik embriyogenezinin başarısında besin ortamının iyi optimize edilmesi gerektiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (54, 75, 60). Somatik embriyo oluşumunu teşvik eden ve en çok kullanılan büyümeyi düzenleyici 2,4-D olarak bilinmektedir. Bu nedenle 2,4-D'nin farklı konsantrasyonlarında somatik embriyo oluşumu ve sürgün rejenerasyonunu belirlemek amacıyla denemeler kurulmuştur. Somatik embriyogenesis için Murashige ve Skoog (117) tarafından geliştirilen MS besin ortamı yaygın olarak kullanılmakla birlikte B₅, SH ve N₆ ortamları da birçok bitki türünde başarılı sonuçlar vermektedir (60). Yonca ile yapılan çalışmalarda MS ortamının yanı sıra B₅, SH ortamları da sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan denemelerde kullanılan besin ortamlarının farklı sonuçlar vermesi nedeniyle bu denemede MS, Bsh ve SH temel besin ortamlarının üçü de kullanılmıştır.

In vitro şartlarda yetiştirilen fidelerden alınan yaprak ve yaprak sapı eksplantları ilk olarak 1, 2 ve 4 mg/l 2,4-D ile 1 mg/l BAP veya 1 mg/l kinetin içeren ortamda kültüre alınmışlardır. Kültür başlangıcından 7 gün sonra eksplantlar kallus oluşturmaya başlamış ve 21 sonra 1 mg/l kinetin içeren ortamdan gelen eksplantların yarısı 0,1 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP içeren, diğer yarısı hormon içermeyen ortamlara aktarılırken 1mg/l BAP içeren ortamdan gelen eksplantların yarısı 0,1 mg/l NAA içeren ve diğer yarısı ise hormon içermeyen ortamlara aktarılmıştır. Bu ortamlarda embriyo oluşumu 10-12 hafta sonra gözlenmiş ve embriyonik kalluslar MS₀ ortamında alt kültüre alınmış ve 6-8 hafta sonra embriyolardan bitkicik gelişimi gözlenmiştir (Resim 4. 4-5.). Kallus oluşturan eksplant yüzdesi, kallus ağırlığı, embriyo oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına embriyo sayısı ve sürgün sayısına ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4. 10.'da verilmiştir.



Resim 4.4. Kültür başlangıcından 10-12 hafta sonra Verco çeşidine ait yaprak eksplantlarından somatik embriyo oluşumu



Resim 4.5. Vercos çeşidinde yaprak eksplantında somatik embriyolardan B₅hO ortamında gelişen bitkicikler

Çizelge 4.10’da görüldüğü gibi kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından kullanılan eksplantların etkisi 0,05 düzeyinde, temel besin ortamlarının ve ortamların etkisi 0,01 düzeyinde önemli bulunurken TBO x ortam, TBO x eksplant, ortam x eksplant ve TBO x ortam x eksplant etkileşimleri 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Kallus ağırlığı bakımından ise temel besin ortamlarının ve ortamların tek başına etkisi 0,01 düzeyinde önemli çıkarken eksplantların tek başına etkisi önemli çıkmamıştır. TBO x ortam x eksplant etkileşimi istatistiksel olarak önemli bulunmamasına rağmen TBO x ortam, TBO x eksplant, ortam x eksplant etkileşimleri 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Embriyo oluşturan eksplant yüzdesi incelendiğinde temel besin ortamlarının ve eksplantların etkisi 0,01 düzeyinde önemli çıkarken, ortamların etkisi önemli bulunmamıştır. TBO x ortam x eksplant, TBO x ortam, TBO x eksplant ve ortam x eksplant etkileşimleri 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Kullanılan eksplant, ortam ve temel besin ortamlarının eksplant başına embriyo sayısına etkisi incelendiğinde de ortamların etkisi 0,05 düzeyinde önemli çıkarken eksplant ve temel besin ortamlarının etkisi ile TBO x ortam, TBO x eksplant, ortam x eksplant etkileşimleri 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Eksplant başına sürgün sayısı incelendiğinde yine ortamların etkisi ile ortam x eksplant etkileşimi 0,05 düzeyinde önemli bulunurken eksplant ve temel besin ortamlarının etkisi ile TBO x ortam, TBO x eksplant, etkileşimlerinin 0,01 düzeyinde önemli olduğu görülmüştür. TBO x ortam x eksplant etkileşimi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Bu farklılıklar arasındaki önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan Testi sonuçları Çizelge 4.11-18’de verilmiştir.

Çizelge 4.11’de kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından kullanılan temel besin ortamlarının, eksplantların ve ortamların birlikte etkisine ait Duncan Testi sonuçları verilmiştir. MS temel besin ortamında yaprak eksplantında 1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortam ile 1, 2, 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren ortamlarda %100 olurken yaprak sapı eksplantının tüm ortamlarda kallus oluşturduğu (%100) görülmüştür. Bsh temel besin ortamında hem yaprak hem de yaprak sapı eksplantları tüm ortamlarda kallus oluşturmıştır. SH temel besin ortamında ise yaprak eksplantı tüm ortamlarda %100 oranında kallus oluştururken, yaprak sapı eksplantı 4 mg/l

Çizelge 4.10. Vero çeşidinde yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında MS, Bsh ve SH temel besin ortamlarında 2,4-D, kinetin ve BAP'ün kallus oluşumu ve somatik embriyogenesis aracılığıyla adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)		Kallus Ağırlığı (g)		S.D.	Embriyo Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)		Eksplant Başına Embriyo Sayısı (adet)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	
		K.O.	F.	K.O.	F.		K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.
Genel	216					216						
Anaortam	2	312,228	7,389**	0,668	29,573**	2	481,169	7,078**	393,531	12,791**	142,416	12,218**
Ortam	5	271,286	6,420**	0,456	20,182**	11	122,714	1,805	69,791	2,268*	26,696	2,290*
Eksplant	1	171,854	4,067*	0,050	2,521	1	1823,309	26,822**	702,362	22,828**	261,580	22,448**
AnaortamxOrtam	10	170,337	4,031**	0,189	8,376**	22	209,517	3,082**	86,555	2,813**	32,595	2,796**
AnaortamxEksplant	2	592,976	14,032**	0,253	11,211**	2	612,096	9,004**	286,571	9,314**	104,957	9,004**
Ortamx Eksplant	5	136,687	3,235**	0,172	7,633**	11	164,723	2,423**	61,912	2,014*	24,306	2,085*
Anaortam x Ortam x Eksplant	10	237,636	5,624**	0,033	1,494	22	133,436	1,963**	47,614	1,548	17,453	1,497
Hata	180	42,258		0,022		144	67,979		30,767		11,656	

** p<0.01 düzeyinde önemli

* p<0.05 düzeyinde önemli

2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamlar 1-2-4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren ortamlarda % 100 kallus oluşturmuştur.

Çizelge 4.11. Vercı çeşidinde yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında MS, B5h ve SH temel besin ortamlarında 2,4-D, kinetin ve BAP'ün TBO x ortam x eksplant etkileşiminin kallus oluşturan eksplant yüzdesine etkisine ait Duncan Testi sonuçları

Ortamlar (mg/l)		Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)					
		MS		B5h		SH	
2,4-D	Kinetin / BAP	Yaprak	Yaprak Sapı	Yaprak	Yaprak Sapı	Yaprak	Yaprak Sapı
1	1 Kinetin	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a	91,66 b
2	1 Kinetin	63,33 c	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a	91,66 b
4	1 Kinetin	86,66 b	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a
1	1 BAP	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a
2	1 BAP	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a
4	1 BAP	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a

Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.
LSD=7,40

TBO x ortam etkileşimi kallus ağırlığına etkisine ait Duncan Testi sonuçlarının yer aldığı Çizelge 4.12 incelendiğinde MS temel besin ortamında en iyi sonucu 1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren ortam (0,89 g) verirken 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortam da en az kallus ağırlığı (0,31 g)'nı vermiştir. B5h temel besin ortamında da yine 1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren ortam 0,75 g ile en iyi sonucu verirken en düşük değer 0,40 g ile 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilmiştir. SH temel besin ortamında ise elde edilen tüm değerler istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir. Kallus ağırlıkları 0,43 g ile 0,35 g arasında olmuştur.

Çizelge 4.12. Verc0 çeşidinde yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında MS, Bsh ve SH temel besin ortamlarında 2,4-D, kinetin ve BAP'ün TBO x ortam etkileşiminin kallus ağırlığına etkisine ait Duncan Testi sonuçları

Ortamlar (mg/l)		Kallus Ağırlığı (g)		
2,4-D	Kinetin/ BAP	MS	Bsh	SH
1	1 Kinetin	0,47 c	0,40 c	0,40 a
2	1 Kinetin	0,42 cd	0,40 c	0,43 a
4	1 Kinetin	0,31 d	0,51 bc	0,43 a
1	1 BAP	0,89 a	0,75 a	0,43 a
2	1 BAP	0,72 b	0,61 b	0,35 a
4	1 BAP	0,75 b	0,58 b	0,41 a

Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.
LSD=0,12

Çizelge 4.13'de görüldüğü gibi yaprak eksplantında kallus ağırlığı bakımından en iyi temel besin ortamı 0,67 g ile MS temel besin ortamı olurken Bsh temel besin ortamında 0,55 g ve SH temel besin ortamında 0,37 g olmuştur. Yaprak sapı eksplantında ise temel besin ortamları bakımından önemli farklılık olmadığından elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir. Kallus ağırlıkları 0,45 g ile 0,54 g arasında olmuştur.

Çizelge 4.13. Verc0 çeşidinde yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında MS, Bsh ve SH temel besin ortamlarında 2,4-D, kinetin ve BAP'ün TBO x eksplant etkileşiminin kallus ağırlığına etkisine ait Duncan Testi sonuçları

Eksplantlar	Kallus Ağırlığı (g)		
	MS	Bsh	SH
Yaprak	0,67 a	0,55 b	0,37 c
Yaprak Sapı	0,51 a	0,54 a	0,45 a
Temel Besin Ortamların Ortalaması	0,59	0,54	0,41

Aynı satır içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.
LSD= 0,07

Çizelge 4.14 incelendiğinde ise kallus ağırlığı bakımından yaprak eksplantında en iyi sonuçlar 0,59 g- 0,62 g- 0,68 g ile 1 mg/l BAP ve 1,2,4 mg/l 2,4-D içeren ortamlardan elde edilmiştir. Yaprak sapı eksplantında ise kallus ağırlığı bakımından en iyi ortam 1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren ortam olmuştur.

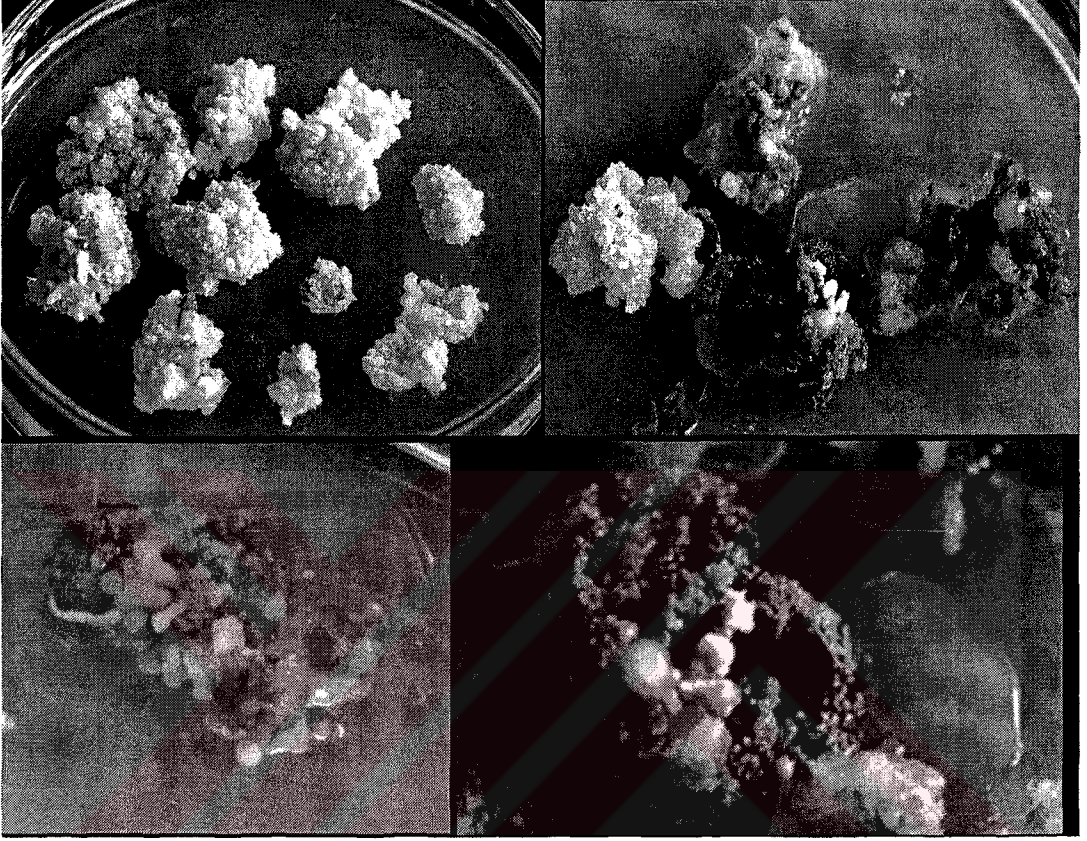
Çizelge 4.14. Vercı çeşidinde yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında MS, Bsh ve SH temel besin ortamlarında 2,4-D, kinetin ve BAP'ün eksplant x ortam etkileşiminin kallus ağırlığına etkisine ait Duncan Testi sonuçları

Ortamlar (mg/l)		Kallus Ağırlığı (g)	
2,4-D	Kinetin / BAP	Yaprak	Yaprak Sapı
1	1 Kinetin	0,44 b	0,40 bc
2	1 Kinetin	0,45 b	0,39 c
4	1 Kinetin	0,41 b	0,43 bc
1	1 BAP	0,59 a	0,79 a
2	1 BAP	0,62 a	0,50 b
4	1 BAP	0,68 a	0,48 bc

Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir. LSD=0,10

Genellikle yeşil renkli kalluslardan embriyo gelişimi gözlenirken kararmaya başlayan kalluslar üzerinde de embriyo gelişimi tespit edilmiştir (Resim 4. 6.).

Embriyo oluşturan eksplant yüzdesi bakımından TBO x ortam x eksplant etkileşiminin yer aldığı Duncan Testi sonuçları Çizelge 4.15'de verilmiştir. MS temel besin ortamında yaprak eksplantı bakımından en iyi sonuç 1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilen kallusların aktarıldığı (hormonlu) 0,01 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP içeren ortamından (%23,33) elde edilmiştir. Diğer ortamlardan elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak ikinci gruba girmesine rağmen sadece 1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonsuz ortam ile 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin. içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonlu ortamlarda embriyo oluşumu görülmüştür.



Resim 4.6. Vercò çeşidine ait yaprak sapı eksplantlarında 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren MS ortamında somatik embriyo oluşumu

Çizelge 4.15. Vercı çeşidinde yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında MS, Bsh ve SH temel besin ortamlarında 2,4-D, kinetin ve BAP'ün embriyo oluşturan eksplant yüzdesine etkisine ait Duncan Testi sonuçları

Ortamlar (mg/l)			Embriyo Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)					
			MS		Bsh		SH	
			Yaprak	Yaprak Sapi	Yaprak	Yaprak Sapi	Yaprak	Yaprak Sapi
Kinetin	2,4-D	Hormonsuz	3,33 b	0,00 b	3,33 cd	0,00 a	0,00 c	0,00 a
1	1	Hormonlu	23,33 a	0,00 b	6,67 bcd	0,00 a	0,00 c	0,00 a
Kinetin	2,4-D	Hormonsuz	0,00 b	0,00 b	16,67 a	0,00 a	0,00 c	3,70 a
1	2	Hormonlu	0,00 b	0,00 b	13,33abc	10,00 a	3,33 bc	3,33 a
Kinetin	2,4-D	Hormonsuz	0,00 b	0,00 b	26,67 a	10,00 a	13,33 ab	3,33 a
1	4	Hormonlu	11,11 b	0,00 b	20,00 a	0,00 a	3,33 bc	0,00 a
BAP	2,4-D	Hormonsuz	0,00 b	0,00 b	20,00 a	0,00 a	0,00 c	0,00 a
1	4	Hormonlu	0,00 b	0,00 b	16,67 a	0,00 a	0,00 c	0,00 a
BAP	2,4-D	Hormonsuz	0,00 b	3,33 b	3,33 cd	0,00 a	20,00 a	3,33 a
1	2	Hormonlu	0,00 b	20,00 a	0,00 d	0,00 a	0,00 c	3,33 a
BAP	2,4-D	Hormonsuz	0,00 b	0,00 b	3,33 cd	0,00 a	3,33 bc	0,00 a
1	4	Hormonlu	0,00 b	0,00 b	0,00 d	0,00 a	10,00 abc	0,00 a

Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.
LSD=13,31

Yaprak sapı eksplantında ise %20 oranıyla en iyi sonucu 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren ortamdan elde edilen kallusların aktarıldığı 0,01 NAA içeren ortam (hormonlu) vermiştir. Yine aynı ortamdan gelen fakat hormonsuz ortama aktarılan kalluslarda ise %3,33 oranında embriyo oluşumu görülürken diğer ortamlarda embriyo oluşumu gözlenmemiştir. Bsh temel besin ortamında ise yaprak eksplantında 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortama ait kallusların aktarıldığı hormonlu ve hormonsuz ortamlarda (%20 ile %26,67), 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonsuz ve hormonlu ortamlarda (%16,67 ile %13,33) ve 1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren

ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonlu ve hormonsuz (%16,67 ve %20) ortamlarda en iyi embriyo oluşturan eksplant yüzdeleri elde edilmiştir. Yaprak sapı eksplantında sadece 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonlu ortam ile 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonsuz ortamda (%10) embriyo oluşturan eksplant bulunmasına karşın embriyo elde edilemeyen diğer ortamlarla istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir. SH temel besin ortamında ise yaprak eksplantında en iyi sonuç %20 ile 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonsuz ortamdan elde edilirken 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonsuz ortam ile 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonlu ortamdan elde edilen sonuçlarda aynı gruba girmiştir. Yaprak sapı eksplantında tüm ortamlarda embriyo oluşturan eksplant yüzdesi bakımından elde edilen sonuçlar aynı gruba girmiştir. Embriyo oluşturan eksplant oranı %0 ile % 3,70 arasında bulunmuştur.

Çizelge 4.16 incelendiğinde eksplant başına embriyo sayısı bakımından MS temel besin ortamında en iyi sonuç 8,22 adet ile 1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilen kallusların aktarıldığı hormonlu ortamdan elde edilmiştir. Ayrıca 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonlu ortamlar 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonlu ortamlardan elde edilen sonuçlar da istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir. Bsh temel besin ortamında eksplant başına 18,45 adet embriyo oluşumu ile en iyi ortam 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilen kallusların aktarıldığı hormonsuz ortam olmuştur. Yine 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonlu ortamdan elde edilen sonuçlar da istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir. SH temel besin ortamında ise elde edilen değerler (%0 ile % 4,17) aynı gruba girmelerine rağmen 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonsuz ortamdan 4,17 adet ile en yüksek sonuç elde edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından Çizelge 4.16 incelendiğinde MS ortamında yine 1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilen kallusların aktarıldığı hormonlu

Çizelge 4.16. Verc0 çeşidinde yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında MS, Bsh ve SH temel besin ortamlarında 2,4-D, kinetin ve BAP'ün TBO x ortam etkileşiminin eksplant başına embriyo ve sürgün sayısına etkisine ait Duncan Testi sonuçları

Ortamlar (mg/l)			Eksplant Başına Embriyo Sayısı (adet)			Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		
			MS	Bsh	SH	MS	Bsh	SH
1	1	Hormonsuz	1,17 b	3,00 cd	0,00 a	0,83 b	2,00 c	0,00 a
2,4-D	Kinetin	Hormonlu	8,22 a	2,67 cd	0,00 a	5,30 a	1,75 c	0,00 a
2	1	Hormonsuz	0,00 b	4,58 cd	0,17 a	0,00 b	3,17 bc	0,17 a
2,4-D	Kinetin	Hormonlu	0,00 b	13,33 ab	1,67 a	0,00 b	8,83 a	1,00 a
4	1	Hormonsuz	0,00 b	18,45 a	2,75 a	0,00 b	10,28 a	2,17 a
2,4-D	Kinetin	Hormonlu	3,45 ab	9,05 bc	0,50 a	2,05 ab	6,38 ab	0,50 a
1	1	Hormonsuz	0,00 b	6,83 bcd	0,00 a	0,00 b	4,00 bc	0,00 a
2,4-D	BAP	Hormonlu	0,00 b	2,63 cd	0,00 a	0,00 b	1,58 c	0,00 a
2	1	Hormonsuz	1,00 b	0,50 d	4,17 a	1,33 ab	0,17 c	2,95 a
2,4-D	BAP	Hormonlu	2,83 ab	0,00 d	1,33 a	1,78 ab	0,00 c	1,00 a
4	1	Hormonsuz	0,00 b	3,00 cd	2,50 a	0,00 b	1,67 c	1,67 a
2,4-D	BAP	Hormonlu	0,00 b	0,00 d	1,25 a	0,00 b	0,00 c	0,50 a

Aynı sütunda içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.

LSD=6,32

LSD=3,89

ortamın 5,30 adet sürgün sayısı ile en iyi ortam olduğu aynı zamanda 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilen kallusların aktarıldığı hormonlu, 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren ortamdan elde edilen kallusların aktarıldığı hormonlu ve hormonsuz ortamlardan elde edilen değerlerin de aynı gruba girdiği görülmüştür. Bsh temel besin ortamında ise sürgün sayısı bakımından en iyi sonuçlar 10,28 adet sürgün sayısı ile 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonsuz ortamdan ve 8,83 adet sürgün sayısı ile 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilen kallusların aktarıldığı hormonlu ortamdan elde edilmiş ve 6,38 adet sürgün sayısı ile 4 mg/l

2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilen kallusların aktarıldığı hormonlu ortamdan elde edilen değerler aynı gruba girmiştir. SH temel besin ortamında sürgün sayısı bakımından elde edilen değerler aynı gruba girmelerine rağmen yine en iyi sonuç 2,95 adet sürgün sayısı ile 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonsuz ortamdan elde edilmiştir.

Çizelge 4.17’de ise eksplant başına embriyo sayısı bakımından yaprak eksplantında en iyi sonuç 9,44 adet ile Bsh temel besin ortamından elde edilirken MS temel besin ortamında 2,14 adet ve SH temel besin ortamında 1,75 adet embriyo elde edilmiştir. Yaprak sapı eksplantında elde edilen değerler istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir. Eksplant başına embriyo sayısı MS ve SH temel besin ortamlarında 0,64 adet Bsh temel besin ortamında 1,21 adet olmuştur. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından en iyi sonuç Bsh temel besin ortamından elde edilirken (5,81 adet), MS temel besin ortamından 1,36 adet ve SH temel besin ortamından 1,21 adet sürgün elde edilmiştir. Yaprak sapında ise sürgün sayısı bakımından istatistiksel olarak temel besin ortamları arasında fark bulunmadığından değerler aynı gruba girmiştir. Bsh temel besin ortamından 0,83 adet, MS temel besin ortamından 0,52 adet ve SH temel besin ortamından 0,44 adet sürgün elde edilmiştir.

Çizelge 4.17. Vercı çeşidinde yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında MS, Bsh ve SH temel besin ortamlarında 2,4-D, kinetin ve BAP’ün eksplant x TBO etkileşiminin eksplant başına embriyo ve sürgün sayısına etkisine ait Duncan Testi sonuçları

Eksplantlar	Eksplant Başına Embriyo Sayısı (adet)			Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		
	MS	Bsh	SH	MS	Bsh	SH
Yaprak	2,14 b	9,44 a	1,750 b	1,36 b	5,81 a	1,21 b
Yaprak Sapı	0,64 a	1,21 a	0,64 a	0,52 a	0,83 a	0,44 a
Temel Besin Ortamları Ortalaması	1,39	5,34	1,94	0,94	3,32	0,83

Aynı satır içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.

LSD=2,58

LSD=1,59

Çizelge 4.18 incelendiğinde yaprak eksplantında eksplant başına embriyo sayısı bakımından 12,39 adet embriyo sayısı ile 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilen kallusların aktarıldığı hormonsuz ortamdan en iyi sonuç alınırken 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonlu ortam ile 1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonlu ortamlardan elde edilen sonuçlar da aynı gruba girmiştir. Yaprak sapı eksplantında embriyo sayısı bakımından elde edilen veriler aynı gruba girmesine rağmen en fazla embriyo oluşturan (4,19 adet) ortam 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilen kallusların aktarıldığı hormonlu ortam olmuştur. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından da yaprak eksplantında yine 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilen kallusların aktarıldığı hormonsuz ortamdan 7,08 adet ile en iyi sonuç elde edilmiştir. Ayrıca, 1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonlu ortamdan, 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonlu ortamdan ve 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonlu ortamlardan elde edilen sonuçlar da istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir. Yaprak sapı eksplantında ise 2,74 adet sürgün sayısı ile en iyi sonuç 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonlu ortamdan alınmasına rağmen tüm ortamlardan elde edilen değerler aynı gruba girmiştir.

Yonca ile yapılan çeşitli doku kültürü çalışmalarında somatik embriyogenesi etkileyen faktörler araştırılmıştır. Suginobu et al., (83) yonca'da somatik embriyo oluşumunu incelemek için kullandığı besin ortamlarında MS'de BO ortamına oranla kallusların daha büyük olduğunu ama Bs ortamıyla aralarında önemli farklılık bulunmadığını tespit etmiş ve en fazla embriyoyu MS temel besin ortamından elde etmişlerdir. Takamizo et al., (84) ise dört farklı besin ortamıyla (B2, Bsh, UM, SH) yaptığı çalışmada sadece UM ortamında embriyo gelişimi olduğunu gözlemlemişler ve 4 mg/l 2,4-D içeren ortamda embriyo miktarının diğer ortamlara oranla 4 kez daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Birçok araştırmacı da somatik embriyo oluşumu için eksplantları ilk olarak yüksek oranda oksin içeren

Çizelge 4.18. Verc0 çeşidinde yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında MS, Bsh ve SH temel besin ortamlarında 2,4-D, kinetin ve BAP'ün eksplant x ortam etkileşiminin eksplant başına embriyo ve sürgün sayısına etkisine ait Duncan Testi sonuçları

Ortamlar (mg/l)			Eksplant Başına Embriyo Sayısı (adet)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	
			Yaprak	Yaprak Sapı	Yaprak	Yaprak Sapı
1	1	Hormonsuz	2,78 bcd	0,00 a	1,89 cde	0,00 a
2,4-D	Kinetin	Hormonlu	7,56 abc	0,00 a	4,70 abc	0,00 a
2	1	Hormonsuz	3,06bcd	0,11 a	2,11 cde	0,11 a
2,4-D	Kinetin	Hormonlu	5,81 bcd	4,19 a	3,81 abcd	2,74 a
4	1	Hormonsuz	12,39 a	1,74 a	7,08 a	1,22 a
2,4-D	Kinetin	Hormonlu	8,67 ab	0,00 a	5,96 ab	0,00 a
1	1	Hormonsuz	4,56 bcd	0,00 a	2,67 bcde	0,00 a
2,4-D	BAP	Hormonlu	1,76 cd	0,00 a	1,06 cde	0,00 a
2	1	Hormonsuz	2,26 cd	1,22 a	1,74 cde	1,22 a
2,4-D	BAP	Hormonlu	0,00 d	2,78 a	0,00 e	1,86 a
4	1	Hormonsuz	3,67 bcd	0,00 a	2,22 cde	0,00 a
2,4-D	BAP	Hormonlu	0,833 d	0,000 a	0,33 de	0,00 a

Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p < 0,05$ düzeyinde önemlidir.

LSD=5,16

LSD=3,18

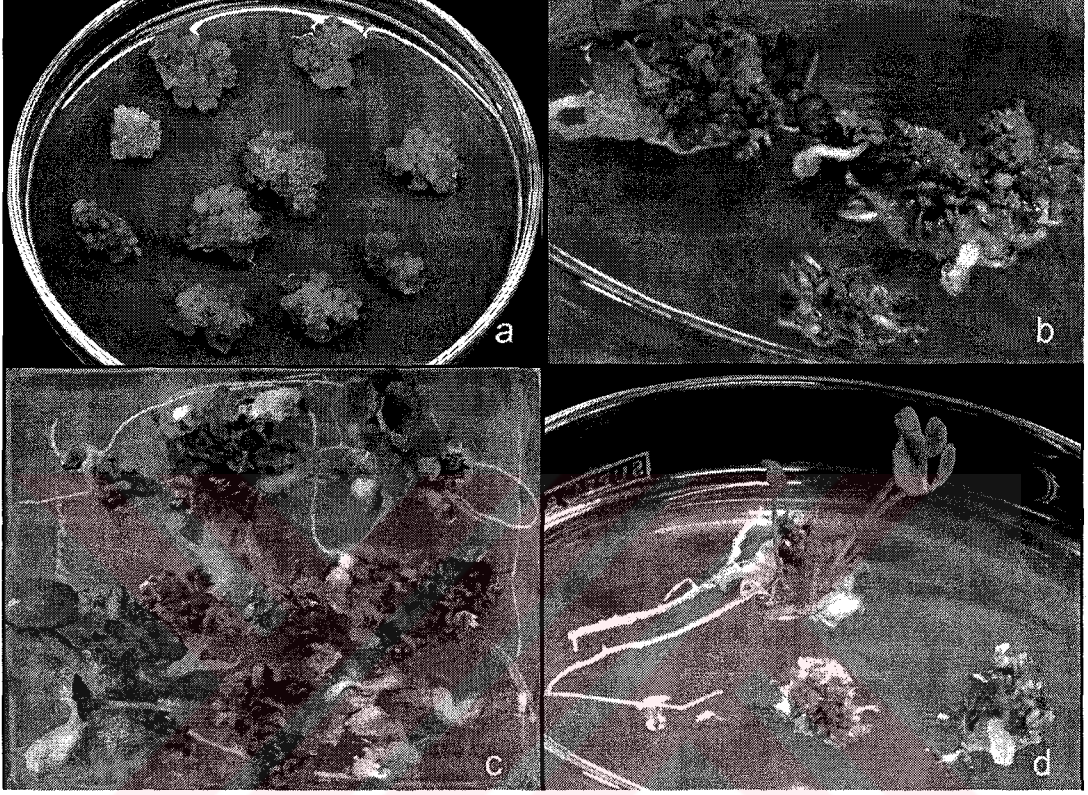
ortamda kültüre aldıktan sonra gelişen kallusları embriyo gelişimi için hormon içermeyen ortama aktarmışlar ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir (74, 75, 81, 86, 94). Bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. MS ve Bsh ortamları arasında kallus büyüklüğü bakımından MS ve Bsh önemli bir farklılık bulunmamasına rağmen MS ortamından elde edilen kalluslar daha büyük olmuştur. Embriyo oluşumu bakımından ise Bsh temel besin ortamında en iyi sonuç 4 mg/l 2,4-D içeren ortamdan gelen ve hormonsuz ortama aktarılan kalluslardan elde edilmiştir. Atanassov and Brown, (76) yaptıkları çalışmada embriyo oluşumunda kinetinin BAP, 2İP, ve zeatine göre daha etkili sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada da kinetin içeren ortamlar BAP içeren ortamlara oranla daha iyi sonuçlar vermiştir. Ayrıca kallus gelişiminde kinetinin kullanıldığı ve daha sonra hormomlu ve hormonsuz ortamlara aktarılan kalluslarda 2,4-D konsantrasyonuna bağlı olarak embriyo oluşumunda farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Yani, 2,4-D konsantrasyonu arttıkça hormonsuz ortamlarda embriyo oluşumu artış gösterirken, hormon içeren ortamlarda bu oranın azaldığı belirlenmiştir. Kallus gelişiminde BAP'ün kullanıldığı ortamlarda ise 2,4-D konsantrasyonuna bağlı olmaksızın embriyo gelişiminin hormonsuz ortamlarda daha fazla olduğu görülmüştür.

4.1.5. Verco çeşidinin farklı eksplantlarından somatik embriyogenesis yoluyla adventif sürgün eldesi

MS, Bsh ve SH temel besin ortamlarında farklı konsantrasyonlarda 2,4-D ile kinetin ve BAP bitki büyüme düzenleyicilerinin adventif sürgün rejenerasyonuna etkisinin incelendiği denemede adventif sürgün rejenerasyonunun 4 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin içeren Bsh ortamının iyi sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Somatik embriyogenezisin başarısını etkileyen faktörlerden biri de eksplant seçimidir (60). Bu nedenle Verco çeşidine ait 6 eksplantın (tek yaprak, üçlü yaprak, yaprak sapı, gövde, kotiledon, hipokotil) somatik embriyo gelişimi ve sürgün rejenerasyonu kabiliyetini değerlendirmek amacıyla bir deneme kurulmuştur. Eksplantlar 4 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin içeren Bsh ortamında 8 hafta süreyle kültüre alındıktan sonra embriyo gelişimi için hormonsuz Bsh ortamına alınmıştır. Gelişen embriyolar, bitkicik elde etmek için MSO ortamında alt kültüre alınmıştır. Eksplantlar kültüre alındıktan yaklaşık 7-8 gün sonra kallus oluşumu ve 10 hafta sonra da kalluslar üzerinde embriyo oluşumu gözlenmiştir (Resim 4.7). Embriyolardan bitkicik gelişimi ise 4-5 ay kadar bir süre almıştır. Gelişen bitkiciklerin morfolojik olarak normal oldukları gözlenmiş ve saksılara aktarılmıştır (Resim 4. 8). Bu denemeye ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.19'da verilmiştir.

Denemeye alınan eksplantların tümü kallus oluşturmuş ve eksplantlar arasında kallus ağırlığı bakımından istatistiksel bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Embriyo oluşturan eksplant yüzdesi bakımından 0.05 düzeyinde önemli farklılık bulunurken

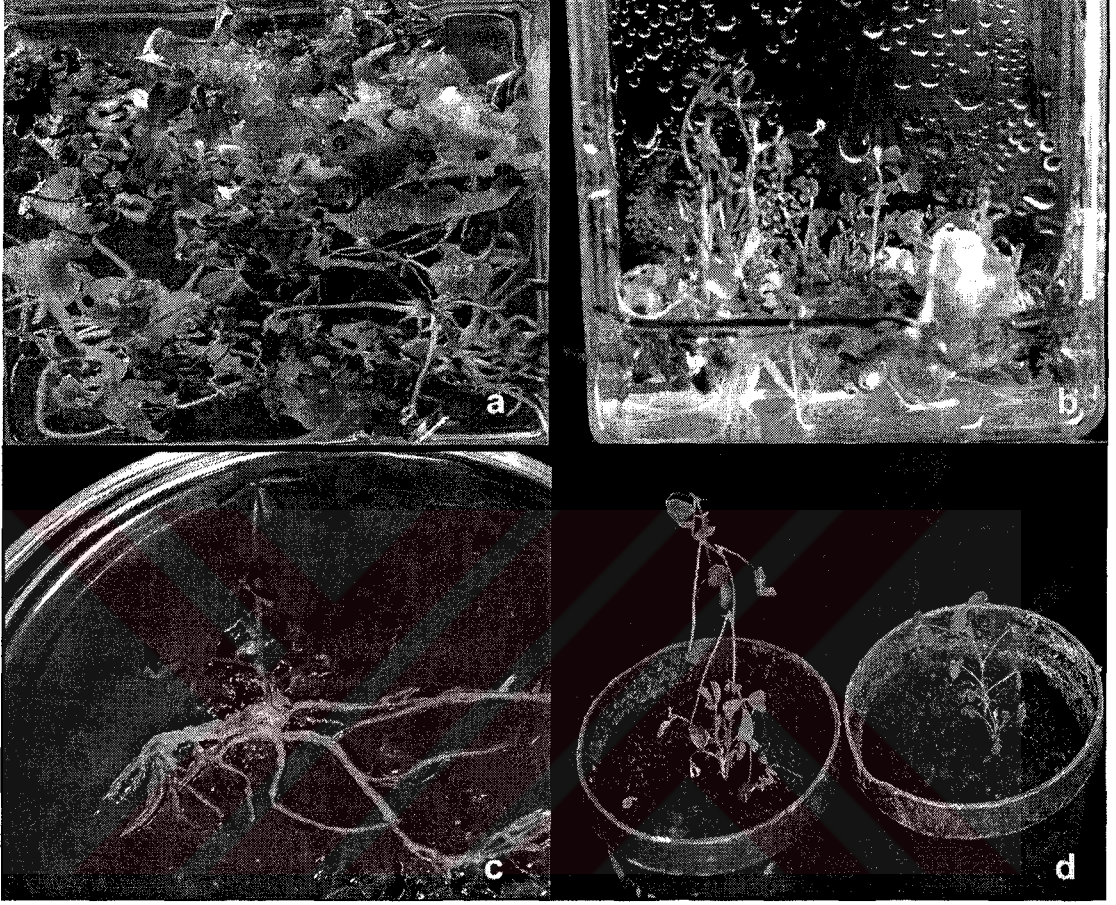


Resim 4.7. Vercò çeşidine ait yaprak eksplantlarında kallus oluşumu ve somatik embriyo gelişimi

(a) kültür başlangıcından 8 hafta sonra 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren B₅h ortamında kallus oluşumu

(b) kültür başlangıcından 12 hafta sonra B₅hO ortamında kalluslar üzerinde oluşan somatik embriyolar

(c,d) kültür başlangıcından 15-16 hafta sonra B₅hO ortamında somatik embriyo gelişimi



Resim 4.8. Vercı çeşidinin yaprak eksplantlarında somatik embriyolardan bitkicik gelişimi

(a,b) kültür başlangıcından 18-20 hafta sonra B₅H₀ ortamında somatik embriyolardan gelişen bitkicikler

(c) B₅H₀ ortamında gelişen bitkiciklerde kök ve gövde gelişimi

(d) bitkiciklerin saksılarda dış ortama alıştırılması

eksplant başına embriyo sayısı ve petri başına sürgün sayısı bakımından farklılığın önem düzeyi 0.01 olmuştur. Eksplant başına sürgün sayısı incelendiğinde ise önemli bir farklılık bulunamamıştır (Çizelge 4.19.). Eksplantlar arasında görülen farklılıkların önem düzeyini belirlemek için yapılan Duncan Testi sonuçları Çizelge 4. 20’de verilmiştir.

Çizelge 4. 19. Vercı çeşidinin farklı eksplantlarının kallus oluşumu ve somatik embriyogenesis yoluyla adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	Kallus Ağırlığı (g)		Embriyo Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)		Eksplant Başına Embriyo Sayısı (adet)		EksplantBaşına Sürgün Sayısı (adet)		Petri Başına Sürgün Sayısı (adet)	
		K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.
Genel	18										
Eksplant	5	0,055	1,281	224,530	3,350*	2985,792	9,368**	369,473	2,919	4804,456	7,901**
Hata	12	0,043		67,027		318,712		126,583		608,111	

** p<0.01 düzeyinde önemli

* p<0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4. 20 incelendiğinde kallus ağırlığı bakımından eksplantlar arasında istatistiksel olarak bir farklılık bulunmadığından tüm eksplantlar aynı gruba girmiştir. En düşük kallus ağırlığı 1,04 g ile kotiledon eksplantında, en yüksek kallus ağırlığı ise 1,43 g ile gövde eksplantından elde edilmiştir. Embriyo oluşturan eksplant yüzdesi incelendiğinde %33.33 en iyi eksplantın üçlü yaprak olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte yaprak sapı (%23,33), hipokotil (%20) ve tek yaprak (%13,33) eksplantlarından elde edilen sonuçlar da en iyi sonuçla aynı grupta yer almıştır. Eksplant başına embriyo sayısı bakımından da yine üçlü yaprak eksplantı 94,66 adet ile en iyi sonucu verirken 79,33 adet ile yaprak sapı eksplantından elde edilen sonuç üçlü yaprak eksplantı ile aynı gruba girmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı açısından üçlü yaprak, yaprak sapı, kotiledon, hipokotil ve tek yaprak eksplantları aynı gruba girmekle birlikte 34,86 adet ile en iyi sonuç yine üçlü yapraktan elde edilmiştir. Petri başına sürgün sayısı bakımından

113 adet sürgün ile üçlü yaprak en iyi sonucu verirken 6,66 adet sayısı ile en az sürgün gövde eksplantından elde edilmiştir.

Çizelge 4. 20. Vercı çeşidinin farklı eksplantlarının kallus oluşumu ve somatik embriyogenesis yoluyla adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait Duncan Testi sonuçları

Eksplantlar	Kallus Ağırlığı (g)	Embriyo Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)	Eksplant Başına Embriyo Sayısı ¹ (adet)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı ¹ (adet)	Petri Başına Sürgün Sayısı (adet)
Üçlü yaprak	1,08 a	33,33 a	94,66 a	34,86 a	113,00 a
Yaprak sapı	1,17 a	23,33 ab	79,33 ab	30,50 a	67,67 b
Gövde	1,43 a	10,00 bc	10,66 d	5,33 b	6,66 d
Kotiledon	1,04 a	6,66 c	31,33 cd	16,66 ab	16,66 cd
Hipokotil	1,23 a	20,00 abc	54,60 bc	29,66 a	58,67 bc
Tek yaprak	1,23 a	13,33 abc	35,50 cd	18,16 ab	23,56 bcd

Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.

McKenzie and Walton, (78) *Medicago sativa* ve *M. media* türlerine ait kültür ve ıslah hatlarına ait hipokotil ve kök eksplantları ile yaptıkları çalışmada eksplant ve embriyo oluşumu arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamasına rağmen gözlemlerinde eksplantlar arasında farklılık tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Yine, Okumura et al., (89) eksplant kaynağının somatik embriyo oluşumuna etkisini araştırmışlar 7 eksplant kaynağında oluşan somatik embriyo sayısı bakımından istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmadığını bildirmişler fakat yaprak, kök ve kök ucu eksplantlarında bireysel olarak %80 üzerinde embriyo oluşumu olduğunu rapor etmişlerdir. Suginobu et al., (83) yoncada genotipin, ortamın ve eksplantın kallus ve somatik embriyo oluşumuna etkisini incelemişler, hipokotil eksplantının en geniş kallusları oluşturduğunu, embriyo oluşum frekansının en iyi gövde eksplantından elde ettiklerini belirtmişlerdir. Scarpa et al., (87) *M. polymorpha* yabani türleri ile yaptıkları doku kültürü çalışmasında eksplant kaynağının etkili olduğunu bildirmişlerdir. Hammad et al., (88) yoncanın iki varyatesinde 6 farklı ortam da kültüre aldıkları eksplantlardan yaprak eksplantının

her zaman en iyi sonucu verdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada da kallus ağırlığı bakımından eksplantlar arasında istatistiksel farklılıklar bulunmamasına rağmen gövde eksplantından en ağır kalluslar elde edilmiştir. Somatik embriyo oluşumu en iyi yaprak eksplantından elde edilmiş ve eksplant kaynağının somatik embriyo oluşumunda etkili olduğu saptanmıştır.

4.1.6. Yonca çeşitlerine ait üçlü yaprak eksplantından somatik embriyogenesis yöntemiyle adventif sürgün eldesi

Somatik embriyogenezin başarısını etkileyen en önemli faktör bitkinin genotipidir (62,65). Embriyo oluşumunda genotip ile ortam arasında da önemli farklılıklar bulunmaktadır (78). Daha önce Verco ve diğer çeşitlerle yapılan somatik embriyogenesis denemesinde en iyi sonuçlar Verco çeşidinden elde edilmesine rağmen besin ortamı içeriğinin de embriyo oluşumunda etkili olması ve bu denemede farklı içerikte besin ortamı kullanılması nedeniyle Verco çeşidiyle birlikte Elçi, Bitlis, Elçi:28-A, Hemedan, Kayseri, Elçi:13 ve Elçi:45 çeşitleri kullanılarak yeni bir deneme kurulmuştur. Eksplant olarak Verco çeşidine ait eksplant denemesinde en iyi sonuçların alındığı üçlü yaprak eksplantı kullanılmıştır.

Çeşitlere ait yaprak eksplantlarının tümü kültüre alındıkları Bsh + 4 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin ortamında 1 hafta içinde kallus oluşturmuşlardır. Kültür başlangıcından 8 hafta sonra eksplantlar üzerinde oluşan kallusların ağırlıkları alınmış ve kalluslar hormonsuz Bsh ortamına aktarılmışlardır. Bu ortamda 6-8 hafta içinde kalluslar üzerinde embriyo oluşumları gözlenmiştir. Embriyo oluşturan kalluslarla birlikte tüm kalluslar MSO ortamında kültüre alınmış ve bu ortama aktarıldıktan 4-6 hafta sonra embriyolardan sürgünlerin meydana geldiği tespit edilmiştir. Kültüre alınan çeşitler kallus ağırlığı, embriyo oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına embriyo sayısı ve sürgün sayısı bakımından incelenmiştir. Denemeye ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4. 21. 'de verilmiştir.

Çizelge 4.21.'de görüldüğü gibi kallus ağırlığı ve embriyo oluşturan eksplant yüzdesi açısından çeşitler arasında 0.05 düzeyinde önemli bir farklılık bulunurken, çeşitlerin eksplant başına embriyo ve sürgün sayısına etkisi 0.01 düzeyinde önemli olmuştur. Ele alınan özelliklerde görülen farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan Testi sonuçları Çizelge 4. 22'de verilmiştir.

Çizelge 4.21. Farklı yonca çeşitlerinin üçlü yaprak eksplantında kallus oluşumu ve somatik embriyogenesinin adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine

Varyasyon Kaynakları	S.D.	Kallus Ağırlığı (g)		Embriyo Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)		Eksplant Başına Embriyo Sayısı (adet)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	
		K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.
Genel	24								
Çeşit	7	0,091	2,929*	307,096	2,706*	2152,494	23,153**	445,977	34,088**
Hata	16	0,031		113,469		92,970		13,083	

ait varyans analizi

** p<0.01 düzeyinde önemli

* p<0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4. 22'de görüldüğü gibi, kallus ağırlığı bakımından Elçi-13 (1,34 g) ve Bitlis (1,32 g) çeşitleri ve bunlarla istatistiksel olarak aynı gruba giren Verco, Elçi, Elçi-45 ve Kayseri çeşitleri en iyi çeşitler olarak belirlenmiştir. Embriyo oluşturan eksplant yüzdesinde % 33,33 ile Verco çeşidi en yüksek değere sahipken % 13,33 ile Hemedan çeşidi de istatistiksel olarak Verco ile aynı gruba girmiştir. Eksplant başına embriyo sayısı (79,36 adet) ve eksplant başına sürgün sayısı (32,68 adet) yönünden en yüksek değerleri Verco çeşidi vermiştir. Verco dışındaki tüm çeşitler arasında eksplant başına embriyo sayısı (0,67-14,67 adet) ve sürgün sayısı (0-2,67 adet) bakımından istatistiksel bir fark bulunmadığı için aynı gruba girmişlerdir. Hemedan çeşidi diğer çeşitler arasında eksplant başına 14,67 adet embriyo ve 2,67 adet sürgün sayısı ile en yüksek değerleri vermiştir.

Çizelge 4. 22. Farklı yonca çeşitlerinin üçlü yaprak eksplantında kallus oluşumu ve somatik embriyogenesinin adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait Duncan Testi sonuçları.

Çeşitler	Kallus Ağırlığı (g)	Embriyo Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)	Eksplant Başına Embriyo Sayısı ¹ (adet)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı ¹ (adet)
Verco	1,08 ab	33,33 a	79,36 a	32,68 a
Elçi	1,14 ab	6,67 b	3,17 b	0,33 b
Elçi-13	1,34 a	3,33 b	1,00 b	0,33 b
Elçi-45	1,17 ab	3,33 b	0,67 b	0,00 b
Bitlis	1,32 a	3,33 b	2,33 b	0,00 b
Elçi:28-A	0,87 b	10,00 b	3,17b	0,00 b
Hemedan	0,92 b	13,33 ab	14,67 b	2,67 b
Kayseri	1,09 ab	6,67 b	8,00 b	0,00 b

Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.

¹ Embriyo ve sürgün oluşturan eksplant başına embriyo ve sürgün sayısı

Chen and Marowitch, (79) yaptıkları çalışmada in vitro rejenerasyon yeteneği ile genotip arasında önemli ilişki bulunduğunu bildirmişlerdir. Yine Sorenses et al., (82) in vitro rejenerasyon yeteneğinin genetik kontrol altında ve yüksek oranda kalıtsal olduğunu belirtmiştir. Suginobu et al., (83) yoncada genotip, ortam ve eksplant çeşidinin kallus ve somatik embriyo oluşumuna etkisini incelemişler ve sonuç olarak somatik embriyo oluşumunda genotipik geçmişin ortam, eksplant kaynağı gibi faktörlere oranla çok daha kritik bir faktör olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da kullanılan çeşitlerin somatik embriyo oluşumuna etkisi 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Çeşitler arasında Verco'nun diğer çeşitlere oranla oldukça yüksek rejenerasyon kabiliyetine sahip olduğu belirlenmiştir. Diğer çeşitlerde embriyo oluşumunun az olmasını genotipe bağlayabiliriz.

4.1. 7. Verco çeşidinde TDZ'un adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi

Test edilen çeşitler içerisinde istatistiksel gruplandırma da en iyi sonuçları veren Verco çeşidinde Thidiazuronun (TDZ) değişik dozlarının kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonuna etkisi araştırılmıştır. TDZ'nun, *in vitro* kültürlerde sitokinin kaynağı olarak kullanılan ve sürgün rejenerasyonunun teşvik eden bir büyümeyi düzenleyici olduğu değişik araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (27).

TDZ'nun 0,01 mg/l ile 2,0 mg/l arasındaki dozlarında kültüre alınan Verco çeşidinin yaprak, kotiledon ve hipokotil eksplantları 10 gün içinde kallus oluşturmuşlardır. Kallus kültürleri 8 hafta sonra MSO ortamına aktarılmış ve bu ortamda 6-8 haftada bir alt kültüre alınmışlardır. Embriyo oluşumu kültür başlangıcından 7-8 ay sonra meydana gelmiştir. Kallus oluşumu ve adventif sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4. 23.'de verilmiştir.

Çizelge 4.23.'de de görüldüğü gibi ortamların ve eksplantların kallus oluşturan eksplant yüzdesine etkisi istatistiksel olarak önemli çıkmazken ortam x eksplant etkileşimi 0.05 düzeyinde önemli çıkmıştır. Kallus ağırlığı bakımından ise ortam x eksplant etkileşimi ile ortamların ve eksplantların tek başına etkisi 0.01 düzeyinde önemli olmuştur. Embriyo oluşturan eksplant yüzdesi yönünden ortamların etkisi 0.01 düzeyinde önemli çıkarken ortam x eksplant etkileşimi 0.05 düzeyinde önemli olmuştur. Kullanılan eksplantların eksplant başına embriyo sayısına etkisi 0.05 düzeyinde önemli bulunurken, ortamların etkisi 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Ortam x eksplant etkileşiminin eksplant başına embriyo sayısına etkisinin ise yine 0,05 düzeyinde önemli olduğu görülmüştür. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından incelendiğinde ortamların etkisi 0,01 düzeyinde önemli çıkarken, ortam x eksplant etkileşiminin etkisi 0,05 düzeyinde önemli olmuştur. Farklılıklar arasındaki önem düzeyini belirlemek için Duncan Testi yapılmıştır (Çizelge 4.24, 25).

Çizelge 4. 23 . Farklı TDZ dozlarının Vercı çeşidinin yaprak, kotiledon ve hipokotil eksplantlarında kallus oluşumu ve adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)		Kallus Ağırlığı (g)		Embriyo Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)		Eksplant Başına Embriyo Sayısı (adet)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	
		K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.
Genel	45										
Ortam	4	617,616	1,028	0,033	4,664**	26,854	4,756**	431,533	6,282**	74,278	5,618**
Eksplant	2	293,003	0,487	0,050	7,107**	14,027	2,484	250,756	3,651*	38,600	2,919
Ortam x Eksplant	8	1437,459	2,392*	0,038	5,445**	15,441	2,735*	186,867	2,720*	35,878	2,713*
Hata	30	601,040		0,007		5,646		68,689		13,222	

** p<0.01 düzeyinde önemli

* p<0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.24 incelendiğinde, kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından yaprak ve kotiledon eksplantlarında tüm ortamlar istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir. Yaprak eksplantında 0,5 ve 1,0 mg/l TDZ içeren ortamlarda, kotiledon eksplantında 0,01, 1,0 ve 2,0 mg/l TDZ içeren ortamlarda kallus oluşturan eksplant yüzdesi % 100 olmuştur. Hipokotil eksplantında ise 2 mg/l TDZ içeren ortam hariç diğer ortamlardan elde edilen sonuçlar (%100, %93,33 ve %73,33) istatistiksel olarak birinci grupta yer almıştır. Kallus ağırlığı bakımından ise yaprak eksplantı 0,37 g ile 1,0 mg/l TDZ içeren ortamdan 0,41 g ile 2,0 mg/l TDZ ve 0,2 mg/l TDZ içeren ortamda 0,32 g ile en yüksek kallus ağırlığını oluşturduğu görülmektedir. Yaprak eksplantında en düşük kallus ağırlığı 0,14 g ile 0,01 mg/l TDZ içeren ortamda olmuştur. Kotiledon eksplantında ise elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir. Kallus ağırlıkları 0,23 g ile 0,16 g arasında olmuştur. Hipokotil eksplantında kallus ağırlığı bakımından en iyi sonuç 0,2 mg/l TDZ içeren ortamda 0,42 g olurken 0,01 ve 2,0 mg/l TDZ içeren ortamlarda 0,01 g olmuştur.

Çizelge 4. 24. Farklı TDZ dozlarının Vercosunun yaprak, kotiledon ve hipokotil eksplantlarında kallus oluşumuna etkisine ait Duncan Testi sonuçları

Ortamlar (mg/l)	Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)				Kallus Ağırlığı (g)			
	Yaprak	Kotiledon	Hipokotil	Ortam Ort.	Yaprak	Kotiledon	Hipokotil	Ortam Ort.
0,01	83,33 a	100,00 a	100,00 a	94,44	0,14 c	0,18 a	0,01 c	0,13
0,2	90,00 a	56,66 a	100,00 a	82,22	0,32 ab	0,16 a	0,42 a	0,30
0,5	100,00 a	66,66 a	73,33 ab	80,00	0,22 bc	0,16 a	0,28 b	0,22
1,0	100,00 a	100,00 a	93,33 a	97,77	0,37 a	0,21 a	0,13 c	0,23
2,0	90,00 a	100,00 a	33,33 b	74,44	0,41 a	0,23 a	0,01 c	0,23
Eksplant Ort.	92,66	84,66	80,00		0,29	0,19	0,19	

Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.
LSD=40, 88

LSD=0,14

Çizelge 4. 25. incelendiğinde yaprak eksplantında embriyo oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına embriyo ve sürgün sayısı bakımından sadece 2 mg/l TDZ içeren ortamdan sonuç elde edilmiştir. Fakat elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak hiç embriyo vermeyen ortamlarla aynı gruba girmiştir. Kotiledon eksplantında embriyo oluşturan eksplant yüzdesi bakımından 0,01-0,2-0,5 mg/l TDZ içeren, hipokotil eksplantında ise 0,2 mg/l TDZ içeren ortamlardan en yüksek sonuçlar alınmıştır. Eksplant başına embriyo sayısı bakımından kotiledon eksplantında en iyi sonuç 0,2 mg/l TDZ içeren ortamdan elde edilirken 0,01 ve 0,5 mg/l TDZ içeren ortamlardan elde edilen sonuçlar da istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır. Bu ortamlarda eksplant başına 2,33 ile 15,33 adet embriyo elde edilirken 1,0 ve 2,0 mg/l TDZ içeren ortamlarda embriyo oluşumu görülmemiştir. Hipokotil eksplantında ise yine 0,2 mg/l TDZ içeren ortamdan (34,66 adet) en iyi sonuç elde edilmiştir. 0,01 mg/l TDZ içeren ortamda eksplant başına 7,00 adet embriyo oluşurken diğer ortamlarda embriyo oluşumu gözlenmemiştir. Eksplant başına sürgün sayısında ise kotiledon eksplantında sonuçlar aynı gruba girmekle beraber 0,2 mg/l TDZ içeren ortamda 5,33 adet sürgün oluşumu gözlenirken 0,01-1,0-2,0 mg/l TDZ içeren ortamlarda sürgün oluşumu görülmemiştir. Hipokotil eksplantında yine en iyi sonuç 0,2 mg/l içeren ortamdan elde edilmiştir. Bu ortamda eksplant başına sürgün sayısı 15 adettir.

Yoncaya TDZ sitokinin etkisi ile ilgili yapılan literatür taramasında sadece diploid tek yıllık yoncalarla yapılan bir çalışmaya rastlanmış olup bu çalışmada TDZ'un yüksek oranda somatik embriyo oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir (97). Bu çalışmada ise yüksek oranda somatik embriyo oluşumu gözlenmemesine rağmen hipokotil eksplantından iyi sonuçlar elde edilmiştir. Bu eksplantta en iyi sonuçların alındığı 0,01 mg/l (7,00 adet) ve 0,2 mg/l (34,66 adet) dozları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılığın çıktığı görülmektedir. Sonuç olarak, TDZ dozlarındaki küçük değişikliklerin bile embriyo oluşumunda etkili olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.25. Farklı TDZ dozlarının Vercı çeşidinin yaprak, kotiledon ve hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait Duncan Testi sonuçları

Ortamlar (mg/l)	Embriyo Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)					Eksplant Başına Embriyo Sayısı ¹ (adet)					Eksplant Başına Sürgün Sayısı ¹ (adet)				
	Yaprak	Kotiledon	Hipokotil	Ortamların Ortalaması		Yaprak	Kotiledon	Hipokotil	Ortamların Ortalaması		Yaprak	Kotiledon	Hipokotil	Ortamların Ortalaması	
TDZ															
0,01	0,00 a*	0,33 ab	0,33 b	0,22		0,00 a	2,33 ab	7,00 b	3,11		0,00 a	0,00 a	1,66 b	0,55	
0,2	0,00 a	1,00 a	2,33 a	1,11		0,00 a	15,33 a	34,66 a	16,66		0,00 a	5,33 a	15,00 a	6,77	
0,5	0,00 a	1,00 a	0,00 b	0,33		0,00 a	7,33 ab	0,00 b	2,44		0,00 a	2,33 a	0,00 b	0,77	
1,0	0,00 a	0,00 b	0,00 b	0,00		0,00 a	0,00 b	0,00 b	0,00		0,00 a	0,00 a	0,00 b	0,00	
2,0	0,33 a	0,00 b	0,00 b	0,11		1,00 a	0,00 b	0,00 b	0,33		0,66 a	0,00 a	0,00 b	0,22	
Eksplantlar Ortalaması	0,01	0,46	0,53			0,20	5,00	8,33			0,13	1,53	3,33		

LSD=3,96

LSD= 13,82

LSD=6,06

Aynı sütun içerisinde küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.

¹ Embriyo ve sürgün oluşturan eksplant başına embriyo ve sürgün sayısı

4.2. *A. tumefaciens* Aracılığıyla Yoncaya Gen Aktarımı

4.2.1. Farklı *A. tumefaciens* hatları ile Verco çeşidinin yaprak eksplantına gen aktarımı

Verco çeşidine ait yaprak eksplantları GV2260, LBA4404 ve EHA105 bakteri hatları ile 1/50 inokulumda 30 dk. süre ile inoküle edilmiş, ardından eksplantlar 2-5 gün süreyle katı veya sıvı ortamda ko-kültüvasyona tabi tutulmuştur. Eksplantlar daha sonra seçici rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Yapılan uygulamalara ait değerlendirmeler Çizelge 4. 26'da verilmiştir.

Çizelge 4. 26. Farklı *A. tumefaciens* hatları ile Verco çeşidinin yaprak eksplantına gen aktarımı

Ko-kültüvasyon Ortamı	Bakteri Hattı	Ko- kültüvasyon Süresi (gün)											
		Kültüre Alınan Eksplant Sayısı				Seçici Antibiyotik veya Herbisite Dayanıklı Eksplant Oranı (%)				GUS Pozitif Embriyo Veren Eksplant* Oranı (%)			
		2	3	4	5	2	3	4	5	2	3	4	5
Katı	GV2260	350	300	160	130	81,7	62,0	33,1	18,4	0	2,68	0	0
	LBA4404	120	100	100	80	12,5	12,0	0	0	0	0	0	0
	EHA 105	160	150	120	90	78,1	56,0	12,5	0	0	0	0	0
Sıvı	GV2260	220	190	-	-	45,4	50,5	-	-	0	0	0	0
	LBA4404	160	140	-	-	28,1	0	-	-	0	0	0	0
	EHA 105	180	150	-	-	38,3	35,3	-	-	0	0	0	0

*Dayanıklı eksplantlardan elde edilen Gus pozitif embriyo veren eksplantlar

Çizelge 4.26 incelendiğinde uygulanan katı ko-kültüvasyon ortamında kullanılan dayanıklı eksplant oranı bakımından en yüksek değer GV2260 bakteri hattından elde edilmiştir. Bu hat ile yapılan 2 günlük ko-kültüvasyon süresi uygulamasında dayanıklı eksplant oranı % 81,7 olurken EHA105 hattında bu oran %78,1 olmuştur. Diğer sürelerde yapılan ko-kültüvasyon uygulamalarında da yine GV2260 hattı 3 günlük uygulamada %62,4 günlük uygulamada %33,1 ve 5 günlük uygulamada % 18,4 ile en yüksek değerleri vermiştir. LBA4404 hattı ile 4 ve

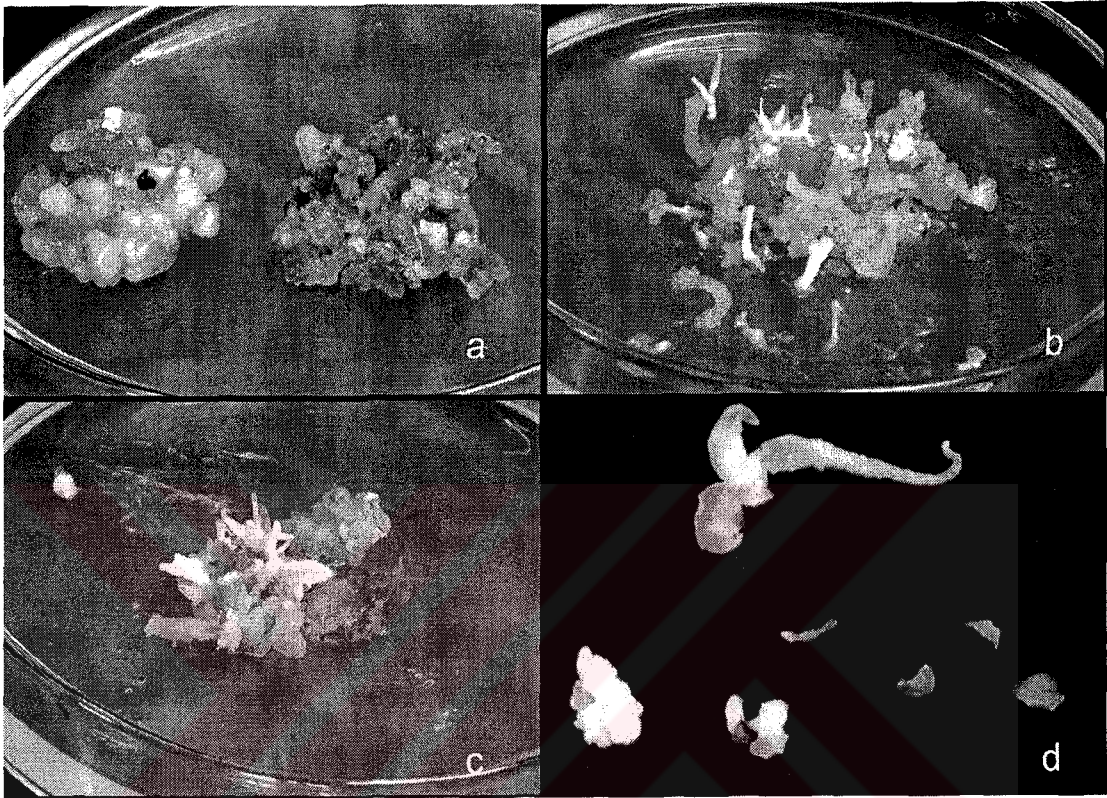
5 günlük yapılan ko-kültürasyon uygulamalarında ve EHA105 hattı ile yapılan 5 günlük ko-kültürasyon uygulamalarında dayanıklı eksplant oluşumu gözlenmemiştir. Sıvı ko-kültürasyon uygulamalarında yine GV2260 hattından 2 günlük uygulamalarda %45,5 ko-kültürasyon süresinin 3 gün olduğu uygulamada da %50,5 oranında dayanıklı eksplant elde edilmiştir.

GUS pozitif embriyo veren eksplant oranı bakımından Çizelge 4.26 incelendiğinde ise sadece GV2260 hattı ile yapılan katı ko-kültürasyon ortamının kullanıldığı ve ko-kültürasyon süresinin 3 gün olduğu gen aktarımı uygulamasından %2,68 oranında GUS pozitif embriyo veren eksplant elde edilmiştir. GUS pozitif embriyo veren kallusların yeşil renkli kalluslardan geliştiği gözlenmiştir. Bu kalluslardan gelişen embriyolardan bazıları yeşil renkli iken bazılarının kanamisin etkisiyle beyazlaştığı görülmüştür. Yeşil renkli embriyolar kanamisine dayanıklı transgenik aday embriyolar olarak belirlenmiş ve gus pozitif uygulamadan olumlu sonuçlar alınmıştır. Yeşil renkli olmayan kalluslardan da embriyo geliştiği belirlenmesine rağmen bu kalluslardan gelişen embriyoların kanamisin etkisiyle beyazlaştığı görülmüştür (Resim 4.9) .

4.2.2. Farklı *A. tumefaciens* hatları ile Verco çeşidinin yaprak sapı eksplantına gen aktarımı

Verco çeşidine ait yaprak sapı eksplantları 3 bakteri hattı ile 1/ 50 inokulumda 30 dk. süre ile inoküle edilmiş, ardından eksplantlar 2 ve 3 gün süreyle katı veya sıvı ortamda ko-kültürasyona tabi tutulmuştur. Eksplantlar daha sonra seçici rejenerasyon ortamına aktarılarak gelişimleri gözlenmiş ve (kanamisin-fosfonitrisin) dayanıklı eksplant oranı ve GUS pozitif embriyo veren eksplant oranı bakımından değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.27.'de verilmiştir.

Çizelge 4.27'de görüldüğü gibi dayanıklı eksplant oranı bakımından katı ko-kültürasyon ortamında EHA105 hattı 2 ve 3 günlük ko-kültürasyon sürelerinde %58,5 ve %38,0 ile en yüksek sonuçları vermiştir. GV2260 hattı ile yapılan denemelerde ise 2 günlük ko-kültürasyon uygulamasında dayanıklı eksplant oranı



Resim 4. 9. Vero çeşidine ait yaprak eksplantına GV2260 bakteri hattı ile gen aktarımı ve histokimyasal GUS analizi
 (a) kanamisine dayanıklı ve dayanıksız kallus oluşumu
 (b) inokulasyondan 10 hafta sonra kanamisin içeren besin ortamında beyaz somatik embriyo gelişimi
 (c) inokulasyondan 10 hafta sonra kanamisin içeren besin ortamında kanamisine dayanıklı ve dayanıksız somatik embriyo gelişimi
 (d) aday transgenik embriyolarda yapılan GUS analizi sonucunda elde edilen GUS pozitif embriyo kısımları

%33,3 3 günlük uygulamada %32,3 ile ikinci en iyi sonuç alınmıştır. LBA4404 hattında ise 3 günlük uygulamada dayanıklı eksplant oluşmazken 2 günlük uygulamada oran % 12,5 olmuştur. Yaprak sapı eksplantında katı ve sıvı ko-kültüvasyon ortamlarında uygulanan farklı ko-kültüvasyon süreleri sonucunda GUS pozitif embriyo veren eksplant elde edilememiştir

Çizelge 4.27. Farklı *A. tumefaciens* hatları ile Verco çeşidinin yaprak sapı eksplantına gen aktarımı

Ko-kültüvasyon Ortamı	Bakteri Hattı	Ko-kültüvasyon Süresi (gün)					
		Kültüre Alınan Eksplant Sayısı		Seçici Antibiyotik veya Herbisite Dayanıklı Eksplant Oranı (%)		GUS Pozitif Embriyo Veren Eksplant* Oranı (%)	
		2	3	2	3	2	3
Katı	GV2260	150	130	33,3	32,3	0	0
	LBA4404	40	40	12,5	0	0	0
	EHA 105	120	100	58,3	38,0	0	0
Sıvı	GV2260	120	100	37,5	28,0	0	0
	LBA4404	50	40	16,0	0	0	0
	EHA 105	120	100	41,6	39,0	0	0

* Dayanıklı eksplantlardan elde edilen Gus pozitif eksplantlar

D' Halluin et al., (11) *A. tumefaciens* aracılığıyla *M. sativa*'nın RA-3 hattına yaptığı gen aktarım çalışmasında katı ko-kültüvasyon ortamını kullanmış ve 2-3 günlük ko-kültüvasyon süresi sonunda eksplantları rejenerasyon ortamına aktarmışlardır. Sonuçta herbisitlere dayanıklı transgenik bitkiler elde etmişlerdir. Hill et al., (101) yaprak eksplantında ve 3 günlük katı ko-kültüvasyon ortamı kullanarak yaptıkları çalışmalarda yonca mozaik virüsüne dayanıklı 100'den fazla transgenik yonca bitkisi elde ettiklerini bildirmişlerdir. Pezotti et al., (102) 2 gün ko-kültüvasyon uygulamasında kanamisine dayanıklı kallus elde etmişlerdir. LBA4404 hattı ile *M. truncatula*'nın 3 genotipine gen aktarım çalışmasında yaprak ve yaprak sapı eksplantlarını katı ortamda 3 günlük ko-kültüvasyona tabi tutmuşlar ve transgenik bitkiler elde etmişlerdir (110). Yine Trieu and Harrison aynı bakteri hattı ve yonca türü ile yaptıkları çalışmada kotiledon eksplantlarını 5 gün süreyle ko-kültüvasyon

işlemine tabi tutmuş ve transgenik bitkiler elde ettiklerini bildirmişlerdir (111). Trinh et al., (19) ise diploid *Medicago* hatlarına ait yaprak eksplantlarını sıvı ko-kültüvasyon ortamında 3 saat süreyle tuttuktan sonra katı ko-kültüvasyon ortamında 3 gün süreyle bekletmiş ve gen aktarım frekansının %2-3 oranında olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca Kamate et al., (112) aynı protokolü kullanarak çiçek kısımları ile yaptıkları gen aktarım çalışmasında transgenik bitkiler elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Desgagnes et al., (106) *M. sativa*'nın rejenerasyon yeteneği yüksek üç genotipinden elde edilen 11 ıslah hattı ile gen aktarım çalışması yapmışlardır. Çalışmalarında C58, A281, LBA4404 *Agrobacterium* hatlarını kullanmışlardır. Deneme sonucunda üç genotipten de transgenik kallus ve transgenik bitki elde ettiklerini rapor etmişlerdir. İyi bir transformasyon için genotip-bakteri ırkı-vektör kombinasyonunun önemli olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, kanamisin transgenik olmayan materyalin elimine edilmesinde oldukça etkili olduğunu bildirmişlerdir. Samac (107)'da *A. tumefaciens* aracılığıyla *M. sativa*'nın 9 farklı kaynaktan gelen ticari çeşitleri ile transformasyon çalışması yapmıştır. Çalışmasında GUS ve NPTII genini taşıyan ikili vektörleri içeren 3 hat ile A208, A348, A281, A136 yabancı bakteri ırklarını kullanmış ve transformasyonda bakteri ırkının yüksek oranda etkili olduğunu belirtmiştir. Söyler (98) ise yonca çeşitlerinin in vitro ortamda *A. tumefaciens*'e karşı duyarlılıklarını belirlemek için yaptığı çalışmada Yonca çeşitleri ile yapılacak gen aktarım çalışmalarında yaprak eksplantlarının kullanılmasını önermiştir.

Bu çalışmada eksplant tipi, bakteri hattı ve ko-kültüvasyon süresinin transformasyonda etkili olduğu gözlenmiştir. Yaprak eksplantından GV2260 hattında katı ko-kültüvasyon ortamında 3 günlük süreyle yapılan uygulamadan %2,68 oranında transgenik embriyo oluşturan eksplant elde edilmiştir. Transgenik materyalin belirlenmesinde embriyolar kullanıldığından transgenik bitki gelişimi gözlenememiştir. Bu embriyoların gelişimine izin verildiğinde transgenik bitkilerin elde edilebileceği açıktır. Ancak, transgenik embriyo veren eksplant oranının düşük olması bitki genotipinden, bakteri ırkından veya kullanılan vektörlerden

kaynaklanabilir, değişik inokölasyon sürelerinin denenmesi, asetosiringon kullanımı ve kullanılan seçici antibiyotiklerin dozunun azaltılması gibi faktörler gen aktarım frekansının artmasını sağlayabilir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5. 1. Yoncada Adventif Sürgün Rejenerasyonu

Doku kültürü çalışmalarında kullanılan eksplantların sterilizasyonu önemli bir sorundur. Bu sorunu gidermek için çalışmalarda *in vitro*' da steril yetiştirilen fideler kullanılmıştır. Sterilizasyon işlemi için tohumlar %70'lik çamaşır suyunda 30d süreyle muameleye tabi tutulmuştur.

Bilindiği gibi etkili bir gen aktarım sisteminde adventif sürgün rejenerasyonu kapasitesi oldukça önemlidir. Bu nedenle ilk olarak yoncada adventif sürgün rejenerasyon kapasitesini arttırmaya yönelik çalışmalar yapılmıştır. Farklı besin ortamlarında çeşitli büyümeyi düzenleyiciler ve onların değişik kombinasyonları öncelikle Verco çeşidinde denenmiştir.

Verco çeşidinde MS besin ortamında BAP ve NAA'in adventif sürgün rejenerasyonuna etkisini belirlemek için yapılan denemede yaprak, yaprak sapı ve hipokotil eksplantları kullanılmıştır. Kallus oluşturma yüzdesi bakımından yaprak sapı eksplantında en yüksek değer % 100 ile 1mg/l BAP- 0.25 mg/l NAA içeren ortam ile 1-2-4 1mg/l BAP ve 0,50 1mg/l NAA içeren ortamlardan elde edilmiştir. Yaprak eksplantında ise en yüksek değer yine %100 ile 1mg/l BAP- 0,10 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilirken 2 mg/l BAP - 0,25 mg/l NAA içeren ortam da %96,66 ile aynı gruba girmiştir. Hipokotil eksplantında da kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından en iyi sonuçlar 1-2 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA içeren ortamlardan (%83,33 ve %93,33) elde edilmiştir. Kallus ağırlığı bakımından ise en iyi ortam (0,71g) 2 mg/l BAP - 0,50 mg/l NAA içeren ortam olurken hipokotil eksplantı (0,63 g) en iyi eksplant olarak belirlenmiştir. Adventif sürgün rejenerasyonu bakımından ise sadece yaprak eksplantında 4 mg/l BAP ve 0,10 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu tespit edilmiştir. Kalluslar üzerinde önce embriyo gelişimi görülmüştür. Daha sonra embriyolardan sürgün gelişimi oluşmuştur. Sürgün oluşturan eksplant sayısı 3, petri başına sürgün sayısı ise 229 adet olmuştur. Fakat sürgün gelişimi oldukça uzun (9 ay) bir süre almıştır.

BAP/ NAA denemesinde embriyo gelişiminin belirlenmesi nedeniyle Verco ile birlikte diğer çeşitlerin somatik embriyo oluşumuna verdiği cevabı belirlemek amacıyla bir deneme kurulmuştur. Denemelerde çeşitlere ait gövde, yaprak, yaprak sapı ve hipokotil eksplantları kullanılmıştır. Bu deneme sonucunda kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından çeşitler arasında önemli bir farklılık olmamakla birlikte en yüksek değerler Hemedan ve Elçi çeşitlerinde (%91,66) görülmüştür. Eksplantlar bakımından ise ortalamaların %99,58 ile %62,91 arasında olduğu, hipokotil eksplantının en iyi sonucu verdiği görülmüştür. Kallus ağırlığı bakımından ise gövde eksplantı için en iyi çeşit Peru (3.28g), yaprak eksplantı için en iyi çeşitler Hemedan ve Peru (1,67g-1,64g), yaprak sapı eksplantında Bitlis ve Nitro alfalfa (1,50g-1,40g) çeşitleri olmuştur. Hipokotil eksplantı için çeşitlerden elde edilen değerler aynı gruba girmiştir. Çeşitler bakımından eksplantların durumu incelendiğinde Verco, Kayseri, Hemedan ve Elçi çeşitlerinde kallus ağırlığı bakımından eksplantlar arasında önemli farklılık bulunmadığından hepsi aynı gruba girmiştir. Nitro alfalfa çeşidinde yaprak eksplantı dışındaki eksplantlar aynı gruba girmelerine rağmen 1,57 g ile en iyi sonuç gövde eksplantından elde edilmiştir. Peru çeşidinde gövde eksplantı (3,28 g), Bitlis çeşidinde yaprak sapı (1,50 g), Kalender çeşidinde ise hipokotil eksplantı (1,80 g) kallus ağırlığı bakımından en iyi eksplantlar olarak tespit edilmiştir. Kallusların bazıları gevşek dokulu ve şeffaf görüntülü olduğu, diğerlerinin biraz daha sıkı dokulu ve yeşil renkte olduğu görülmüştür. Şeffaf ve gevşek dokulu kalluslarda embriyo gelişiminin daha erken olduğu belirlenmiştir. Embriyo oluşturan eksplant yüzdesi bakımından en iyi çeşit Verco (%14,16) olmuştur. Eksplantlar arasında her ne kadar istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmasa da en iyi eksplant (%8,75) yaprak olarak belirlenmiştir. Eksplant başına embriyo sayısında Verco çeşidinin gövde eksplantında 30,50 adet, yaprak eksplantında 93,56 adet ve hipokotil eksplantında 34,00 adet embriyo sayısı ile en iyi çeşit olduğu belirlenmiştir. Yaprak sapı eksplantında ise çeşitler arasında önemli bir farklılık bulunmamakla birlikte 5,66 adet ile Hemedan çeşidi en iyi sonucu vermiştir. Çeşitlere göre eksplantların etkisi incelendiğinde Verco çeşidinde 93,56 adet ile en iyi sonuç yaprak eksplantından elde edilirken yaprak sapı eksplantında embriyo oluşumu görülmemiştir. Verco çeşidi dışındaki çeşitlerde kullanılan eksplantlar bakımından her hangi bir farklılık tespit edilmemiştir. Kullanılan çeşitlerin ve

eksplantların eksplant başına sürgün sayısına etkisi incelendiğinde ise yine Verco çeşidinin en iyi çeşit olduğu ve Verco çeşidinde de yaprak eksplantının (15,66 adet) en iyi eksplant olduğu belirlenmiştir. Kayseri, Hemedan ve Peru çeşitlerinde sadece hipokotil eksplantında düşük oranda sürgün oluşumu görülürken Elçi, Nitro alfalfa, Bitlis ve Kalender çeşitlerinde ise sürgün oluşumu gözlemlenmemiştir. Sürgün gelişimi 8 ay sürmüştür. BAP / NAA denemesine oranla embriyo oluşturan eksplant yüzdesi, embriyo ve sürgün oluşumu süresi bakımından daha iyi sonuçlar elde edilmesine rağmen sürgün sayısı bakımından BAP / NAA denemesinden daha iyi sonuç alınmıştır.

Yonca çeşitleri ile yapılan somatik embriyogenesis denemesinden embriyo oluşumu ve sürgün gelişim süresi bakımından olumlu sonuçlar elde edilmesi nedeniyle çalışmalarda bu yolla adventif sürgün elde edilmesi amacıyla farklı denemeler kurulmuştur. Çeşitler içinde en iyi sonuçların alındığı Verco çeşidi kullanılmıştır. Denemede yaprak, yaprak sapı, kotiledon eksplantları ile adenin, kinetin ve 2,4-D büyümeyi düzenleyicilerin farklı dozları kullanılmıştır. Kullanılan B5h ve MS temel besin ortamlarında farklı hormon dozlarında embriyo oluşumu tespit edilmiştir. B5h temel besin ortamında 2 mg/l adenin-0,2 mg/l kinetin ve 1 mg/l 2,4-D içeren ortamda kotiledon ve yaprak eksplantlarında sırasıyla 14,10 adet ve 39,93 adet embriyo elde edilmiştir. Bu embriyolardan sırasıyla 5,06 ve 7,33 adet sürgün gelişimi belirlenmiştir. MS temel besin ortamında kotiledon, yaprak, yaprak sapı eksplantlarında 1 mg/l adenin-0,2 mg/l kinetin ve 1 mg/l 2,4-D içeren ortamda 13,00 adet, 26,16 adet ve 4,16 adet embriyo oluşmuştur. Embriyolardan elde edilen sürgün sayıları sırasıyla 2,83- 7,93 ve 1-50 adet olmuştur. Her iki ortamda da en iyi sonuç yaprak eksplantından alınırken yaprak sapı en düşük değerleri vermiştir. Embriyo oluşumu 4-5 ay sürmüş ve embriyolardan sürgün gelişimi oldukça düşük olmuştur.

Adventif sürgün rejenerasyonu oranını yükseltmek ve sürgün oluşum süresini kısaltmak amacıyla farklı dozlarda oksin (2,4-D) ve farklı sitokininler (BAP-Kinetin) MS, B5h ve SH besin ortamlarında denenmiştir. Denemelerde yaprak ve yaprak sapı eksplantları kullanılmıştır. Genel olarak kallus oluşturma yüzdesi ve kallus ağırlığı bakımından BAP içeren ortamlardan daha yüksek sonuçlar elde

edilmesine rağmen embriyo oluşumu bakımından kinetin içeren ortamların daha iyi sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Bsh temel besin ortamında her iki eksplantta tüm ortamlarda % 100 oranında kallus oluşturmıştır. Kallus ağırlığı bakımından ise en yüksek değerler MS temel besin ortamından elde edilmiştir. Embriyo oluşturan eksplant yüzdesi bakımından MS temel besin ortamında yaprak eksplantında en iyi sonuç 1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilen kallusların aktarıldığı hormon içeren ortamdan (%23,33) elde edilmiştir. Yaprak sapı eksplantında ise %20 oranıyla en iyi sonucu 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren ortamdan elde edilen kallusların aktarıldığı hormon içeren ortam vermiştir. Bsh temel besin ortamında ise yaprak eksplantında 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortama ait kallusların aktarıldığı hormonlu ve hormonsuz ortamlarda (%20 ile %26,66), 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonsuz ortamda (%16,66) ve 1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonlu ve hormonsuz (%16,66 ve %20) ortamda en iyi embriyo oluşturan eksplant yüzdeleri elde edilmiştir. Yaprak sapı eksplantında sadece 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonlu ortam ile 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonsuz ortamda (% 10) embriyo oluşumu gözlenmiştir. SH temel besin ortamında ise yaprak eksplantında en iyi sonuç %20 ile 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonsuz ortamdan elde edilirken yaprak sapı eksplantında embriyo oluşturan eksplant yüzdesi %3,70 ile % 0 arasında bulunmuştur. Eksplant başına oluşan embriyo sayısı ve sürgün sayısı incelendiğinde ise MS temel besin ortamında en fazla embriyo 8,22 adet ile 1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilen kallusların aktarıldığı hormonlu ortamdan elde edilmiştir. MS ortamında yine aynı ortamın 5,33 adet sürgün sayısı ile en iyi ortam olduğu görülmektedir. Bsh temel besin ortamında eksplant başına 18,45 adet embriyo oluşumu ile en iyi ortam 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilen kallusların aktarıldığı hormonsuz ortam olmuştur. Bsh temel besin ortamında aynı ortamda sürgün sayısı 10,28 adet olmuştur. SH temel besin ortamında 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonsuz ortamdan 4,17 adet ile en yüksek sonuç elde edilmiştir. SH temel besin ortamında sürgün sayısı ise 2,95 adet olarak

belirlenmiştir. Eksplantlar bakımından temel besin ortamlarının durumunu değerlendirdiğimizde en iyi sonucun 9,44 adet ile Bsh temel besin ortamında olduğu MS temel besin ortamında 2,14 adet ve SH temel besin ortamında 1,75 adet embriyo olduğu tespit edilmiştir. Yaprak sapı eksplantında eksplant başına embriyo sayısı MS ve SH temel besin ortamlarında 0,64 adet Bsh temel besin ortamında 1,21 adet olmuştur. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından yaprak eksplantında en iyi sonuç temel besin ortamından elde edilirken (5,81 adet), MS temel besin ortamında 1,36 adet ve SH temel besin ortamında 1,21 adet sürgün elde edilmiştir. Yaprak sapında ise Bsh temel besin ortamından 0,82 adet, MS temel besin ortamından 0,52 adet ve SH temel besin ortamından 0,44 adet sürgün elde edilmiştir. Eksplantlarla ortamlar arasındaki etkileşimi değerlendirdiğimizde ise yaprak eksplantında eksplant başına embriyo sayısı bakımından 12,39 adet embriyo sayısı ile 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilen kallusların aktarıldığı hormonsuz ortamdan en iyi sonuç alınırken yaprak sapı eksplantında embriyo sayısı bakımından elde edilen veriler aynı gruba girmesine rağmen en fazla embriyo oluşturan (4,19 adet) ortam 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilen kallusların aktarıldığı hormonlu ortam olmuştur. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından da yaprak eksplantında yine 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilen kallusların aktarıldığı hormonsuz ortamda 7,08 adet ile en iyi sonuç alınmıştır. Yaprak sapı eksplantında ise 2,74 adet sürgün sayısı ile en iyi sonuç 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren ortamdan gelen kallusların aktarıldığı hormonlu ortamdan alınmıştır. Bu değerlendirmeler ışığında en iyi sonuçlar Bsh temel besin ortamında 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilen kallusların aktarıldığı hormonsuz ortamdan ve yaprak eksplantında elde edilmiştir. Embriyo sayısı bakımından diğer iki denemeye oranla daha düşük değerler elde edilmesine rağmen embriyolardan sürgün gelişimi yüksek oranda olmuştur. Ayrıca sürgün gelişimi toplam 5-6 ay sürerek diğer denemelere oranla daha kısa sürede gerçekleşmiştir.

Somatik embriyogenesinin başarısını etkileyen faktörlerden biriside eksplant seçimi olduğu için en iyi sonucun alındığı 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren Bsh ortamında Verco çeşidine ait tek yaprak, üçlü yaprak, gövde, kotiledon ve hipokotil

eksplantları ile yeni bir deneme kurulmuştur. Denemeler sonucunda kallus oluşumu ve ağırlığı bakımından eksplantlar arasında farklılıklar tespit edilmemiştir. Embriyo oluşturan eksplant oranı üçlü yaprak eksplantında %33,3 ile en yüksek değeri vermiştir. Embriyo sayısı ile ilgili verileri değerlendirdiğimizde 94,6 adet ile en iyi eksplantın yine üçlü yaprak olduğu tespit edilmiştir. Bunun dışındaki eksplantlarda ise embriyo sayısı 79,3 adet ile 10,6 adet arasında bir değer göstermiştir. Eksplant başına sürgün sayısı açısından üçlü yaprak, yaprak sapı ve hipokotil eksplantları aynı gruba girmekle birlikte 34,86 adet ile en iyi sonuç yine üçlü yapraktan elde edilmiştir. Bu eksplantta petri başına sürgün sayısı 113 adet olarak belirlenmiştir. Yapılan denemeler içerisinde sürgün sayısı ve sürgün gelişim süresi bakımından en iyi sonuçlar bu denemeden elde edilmiştir.

Diğer yonca çeşitlerinin somatik embriyo oluşumuna verdiği cevapları belirlemek amacıyla Verco çeşidine ait farklı eksplantlar ile yapılan denemenin aynısı sadece üçlü yaprak eksplantı kullanılarak tekrarlanmıştır. Deneme sonucunda kallus ağırlığı bakımından Elçi-13 (1,34 g) ve Bitlis (1,32 g) çeşitlerinin en iyi çeşitler olduğu belirlenmesine rağmen embriyo oluşturan eksplant yüzdesinde % 33,33 ile Verco çeşidi ve % 13,33 ile Hemedan çeşidi en iyi çeşitler olmuştur. Eksplant başına embriyo sayısı ve eksplant başına sürgün sayısı yönünden en yüksek değerleri yine Verco çeşidi vermiştir. Verco dışındaki tüm çeşitlerden elde edilen değerler aynı gruba girmiştir. Verco çeşidinde eksplant başına 79,36 adet embriyo, Hemedan çeşidinde ise 14,66 adet embriyo olduğu belirlenmiştir. Sürgün sayısı bakımından da aynı sonuçlar elde edilmiştir. Verco çeşidinde eksplant başına sürgün sayısı 32,67 adet, Hemedan çeşidinde ise sadece 2,66 adet olmuştur.

Verco çeşidinde TDZ'in etkisini belirlemek, adventif sürgün rejenerasyon oranını arttırmak ve sürgün oluşum süresini daha da kısaltmak amacıyla yeni bir deneme kurulmuştur. Denemede yaprak, kotiledon ve hipokotil eksplantları kullanılmıştır. Yaprak eksplantında 0,5 ve 1,0 mg/l TDZ içeren ortamlarda, kotiledon eksplantında 0,01, 1,0 ve 2,0 mg/l TDZ içeren ortamlarda hipokotil eksplantında 0,01 mg/l TDZ içeren ortamda kallus oluşturan eksplant yüzdesi % 100 olarak belirlenmiştir. Kallus ağırlığına etkisi incelendiğinde ise yaprak eksplantı 0,37 g ile 1,0 mg/l TDZ içeren

ortamda 0,41 g ile 2,0 mg/l TDZ içeren ortamda en yüksek kallus ağırlığını oluşturduğu görülmüştür. Kotiledon eksplantında ise elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir. Kallus ağırlıkları 0,23 g ile 0,16 g arasında olmuştur. Hipokotil eksplantında kallus ağırlığı bakımından en iyi sonuç 0,2 mg/l TDZ içeren ortamda 0,42 g olarak tespit edilmiştir. Yaprak eksplantında embriyo oluşumu sadece 2 mg/l TDZ içeren ortamda belirlenmiştir. Kotiledon eksplantında embriyo oluşumu 0,01-0,2-0,5 mg/l TDZ içeren, hipokotil eksplantında ise 0,01-0,2 mg/l TDZ içeren ortamlarda belirlenmiştir. Kotiledon ve hipokotil eksplantlarında en iyi sonuçlar 0,2 mg/l TDZ içeren ortamdan alınmıştır. Bu ortamda kotiledon eksplantında eksplant başına embriyo sayısı 15,33 adet olurken hipokotil eksplantında 34,66 adet olarak tespit edilmiştir. Kotiledon eksplantında embriyolardan oluşan sürgün sayısı 5,33 adet hipokotil eksplantında ise 15 adet olmuştur. Sürgün sayısı bakımından Bsh + 4 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin ortamına oranla (34,86 adet) daha düşük sonuçlar alınmıştır.

Bu araştırma da kullanılan çeşitlere göre yoncada somatik embriyo oluşumunda kallus oluşumu ile embriyo oluşumu arasında bir ilişki gözlenmemekle birlikte genellikle açık renkli ve şeffaf yapılı kalluslarda embriyo oluşumunun daha erken ve çok sayıda olduğu görülmüştür. Bu tür kallus yapısının oluşumu ile embriyo oluşumu ve gelişiminde kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri arasında ise 2,4-D ve kinetin daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle somatik embriyo elde etmek amacıyla yapılacak çalışmalarında 2,4-D ve kinetin kullanılabilir. Ayrıca mineral ve vitamin içeriğindeki farklılıklarında embriyo oluşumu ve gelişiminde etkili olması nedeniyle bunların değişik kombinasyonları ve değişik ortamlar denenebilir. Yine, TDZ dozlarındaki küçük değişikliklerin embriyo oluşumuna etkisi nedeniyle de TDZ'nin farklı dozlarının etkisi araştırılabilir.

5. 2. *A. tumefaciens* Aracılığıyla Yoncaya Gen Aktarımı

Yapılan adventif sürgün rejenerasyonu çalışmalarında diğer çeşitlere göre daha başarılı sonuçların alındığı Verco çeşidi ile gen aktarım çalışmaları yapılmıştır.

Çalışmalarda adventif sürgün rejenerasyon kapasitesinin en iyi olduğu yaprak ve yaprak sapı eksplantları kullanılmıştır.

Gen aktarım çalışmalarında üç bakteri hattı (EHA105, GV2260 ve LBA4404) ile katı ve sıvı ko-kültüvasyon ortamları ile değişik ko-kültüvasyon süreleri (2-5 gün) denenmiştir.

Yaprak eksplantı ile yapılan denemelerde katı ko-kültüvasyon ortamının kullanıldığı gen aktarımda değişik ko-kültüvasyon süreleri açısından seçici antibiyotik veya herbisite dayanıklı eksplant oranı en yüksek GV2260 hattı ile yapılan denemelerden elde edilmiştir. En yüksek oranın elde edildiği 2 günlük ko-kültüvasyon süresi denemesine oran %81,7 iken en düşük oran % 18,4 ile 5 günlük denemeden elde edilmiştir. EHA105 hattı ile yapılan denemelerde dayanıklı eksplant yüzdesi 2 günlük ko-kültüvasyon denemesinde % 78,1 olurken 5 günlük denemede dayanıklı eksplant elde edilememiştir. LBA4404 hattı ile yapılan denemelerde ise sadece 2 ve 3 günlük ko-kültüvasyon sürelerinde %12 oranında dayanıklı eksplant elde edilebilmiştir. Sıvı ko-kültüvasyon ortamında ise 2 ve 3 günlük ko-kültüvasyon sürelerinde yine en yüksek dayanıklı eksplant oranı GV2260 hattı ile yapılan denemelerden (%45,4 ve %50,5) elde edilmiştir. GUS pozitif embriyo veren eksplantlar sadece GV2260 hattı ve katı ko-kültüvasyon ortamında 2 günlük ko-kültüvasyon süresi ile yapılan denemelerden elde edilebilmiştir. GUS pozitif embriyo veren eksplant oranı %2,68 olarak belirlenmiştir.

Yaprak sapı eksplantı ile yapılan denemelerde ko-kültüvasyon süresi olarak 2 ve 3 günlük süreler denenmiştir. Katı ko-kültüvasyon ortamında dayanıklı eksplant oranı bakımından EHA105 hattı en yüksek değerleri vermiştir. 2 günlük ko-kültüvasyon süresi uygulamasında %58,3 olurken 3 günlük uygulamada %38,0 olmuştur. GV2260 hattı ile yapılan denemede bu oranlar yaklaşık %33 civarında bulunmuştur. LBA4404 hattı ile yapılan uygulamada ise %12,5 ve %0 olmuştur. Sıvı ko-kültüvasyon ortamının kullanıldığı uygulamalarda da en yüksek oranda dayanıklı eksplantlar EHA 105 hattından elde edilmiştir. 2 günlük uygulamada % 41,6 oranında 3 günlük uygulamada ise %39 oranında dayanıklı eksplant elde edilmiştir.

GV2260 hattında %37,5 ve %28 oranlarında dayanıklı eksplant elde edilirken LBA4404 hattında sadece 2 günlük uygulamada %16 oranında dayanıklı eksplant elde edilmiştir. Yaprak sapı ile yapılan denemelerde GUS pozitif embriyo veren eksplant elde edilememiştir.

Bu tez çalışması sonucunda somatik embriyo oluşumu bakımından kullanılan çeşitler içerisinde en iyi çeşidin Verco olduğu belirlenerek bu çeşit ile yapılan denemeler ile somatik embriyo ve bu embriyolardan bitkicik gelişim oranı artırılmıştır. Verco çeşidinde *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarım çalışmasında GV2260 hattı ile yapılan denemelerden düşük oranda da olsa transgenik embriyolar elde edilmiştir. Bu embriyolar gus pozitif denemelerde kullanıldığından bitki gelişimi gözlenememiştir. Fakat embriyoların gelişimine izin verildiği takdirde transgenik bitkilerin elde edilebileceği açıktır. *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarım çalışmalarında transgenik bitki elde edilmesi ve yüksek oranda transgenik yonca bitkilerinin üretilmesi için farklı bitki genotiplerinin ve bakteri hatlarının kullanılması olumlu sonuçlar elde edilmesini sağlayabilir. Yapılan değişik araştırmalarda farklı çeşit ve bakteri hatlarında transgenik bitkiler elde edildiği bildirilmiştir. Gen aktarım frekansını arttırmak için farklı inokülasyon süreleri, asetosiringon kullanımı, değişik bakteri yoğunlukları ve besin ortamına eklenen antibiyotik ve herbisitlerin değişik oranlarının test edilmesi gen aktarım frekansını artırabilir.

KAYNAKLAR

1. Açıkgöz, E., "Yem Bitkileri, 3. Baskı", Uludağ Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü, *U.Ü. Güçlendirme Vakfı Yayını No:182*, Bursa, 41-66 (2001).
2. Anonim, "Türkiye'de yem bitkileri ekiliş ve üretimi", *Tarım Hedefleri Simpozyumu*, Türk Ziraat Yüksek Mühendisleri Birliği, Ankara, (2001).
3. DİE, "Tarım İstatistikleri Özeti", *DİE Yayını*, Ankara, (2001).
4. Hanson, C.H., "Alfalfa Science and Technology", *Amer. Soc. Agro. Wisconsin, USA*, 1-85, (1972).
5. Davis, P.H., "Flora of Turkey", , *Edinburg Univ. Press.*, Edinburg, Vol.3, 483-511, (1969).
6. Manga, İ., Acar, Z. ve Ayan, İ., "Baklagil Yem Bitkileri", *19 Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notu No: 7*, Samsun, 31-108, (1995).
7. İnternet: North American Alfalfa Improvement Conference Online. <http://www.naaic.org /Alfalfa/Importance.html> (14.01.2003).
8. Özcan, S., Özgen, M., "Bitki genetik mühendisliği", *Kükem Dergisi*, 1: 69-95, (1996).
9. Murakami, T., Anzai, H., Imai, S., Satoh, A., Nagaoka K., Thompson, C.J., "The bialophos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: molecularcloning and characterization of the gene cluster", *Mol. Gen. Genet.*, 205: 42-50, (1986).
10. De Greef, W., Delon, R., De Block, M., Leemans, J., Botterman, J., "Evaluation of herbicide resistance in transgenic crops under field conditions", *Bio/Technology*, 7: 61-64, (1989).
11. D' Halluin, K., Botterman, J., De Greef, E., Engineering of herbicide-resistant alfalfa and evaluation under field conditions, *Crop, Sci.*, 30: 866-871, (1990).
12. Delennay, X., Lavalley, B.J., Proksch, R.K., Fuchs, R.L., Sims, S.R., Greenplate, J.T., Marrone, P.G., Dodson, R.B., Augustine, J.J., Layton, J.G., Fischhoff, D.A., "Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus trungiensis* var. kustaki insect control protein", *Bio/ Tecnologia*, 7: 1265-1269, (1989).
13. Kozeil, M.G., Beland, G.L., Bowman, C., Carrozzi, N. B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadwell, S., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., McPherson, K., Meghji, M. R., Merlin, E., Rhodes, R., Warren, G. W., Wright, M., Evola, S. V., "Field performance of elite

transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*", *Bio/Tecnology*, 11: 194-199, (1993).

14. Abel, P.P., Nelson, R.S., De Grew, B., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T., Beachy, R.N., "Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene", *Science*, 232: 738-743 (1986).
15. Reavy, B., and Mayo, M.A., "Genetic engineering of virus resistance, In: Plant genetic manipulation for Crop Protection", A.M.R. Gatehouse, V.A. Hilder and D. Boulter (Eds) C.A.B. *International Oxon*, U.K. 183-214, (1992).
16. Hamilton, A.J., Lycett, G.W., Grierson, D., "Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants", *Nature*, 328: 799-802 (1990).
17. Redenbaugh, K., Fujii, J.A., Slade, D., "Synthetic Seed Technology", In Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, I.K. Vasil ed, *Academic Press*, New York., Vol 8: 35-74 (1991).
18. McKersie, B.D. and Bowley S.R., "Synthetic Seeds in Alfalfa", In Synseeds Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement, K. Redenbaugh ed, *CRC Press*, Boca Raton, Chapter 14: 231-255, (1992).
19. Trinh T.H. et al., "Rapid and efficient transformation of diploid *M. truncatula* and *M. sativa* ssp. *falcata* lines improved in somatic embryogenesis", *Plant Cell Rep.*, 17: 345-355, (1998).
20. Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rodgers, S. G. and Fraley, R. T., "A simple and general method for transferring genes into plants", *Science*, 227: 29-31, (1985).
21. Özcan, S., Uranbey, S., Sancak, C., vd., "Agrobacterium Aracılığıyla Gen Aktarımı", Bitki Biyoteknolojisi II Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, S. Özcan, E. Gürel, M. Babaoğlu ed, *S.Ü. Vakfı Yayınları* Bölüm 15: 112-159, (2001).
22. Schell, J., "Plant Cell Transformations and Genetic Engineering", *Plant Imp., and Som. Cell Genet.*, Academic Press, Inc. Orlando, Florida, 255-276, (1982).
23. Potrykus, T., "Gene Transfer to Cereals", An Assessment, *Bio/Technology*, 8: 535-542, (1990).
24. Tingay, S., McElroy, D., Kalla, R., Fieg, S., Wang, M., Thornton, S., Brettel, R., "Agrobacterium tumefaciens- mediated barley transformation", *Plant. J.*, 11: 1369-1376, (1997).

25. Zhang, W. and Wu, R., "Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants", *Theor. and Appl. Genet.*, 76: 835-840, (1988).
26. Ishida, Y., Saito, H., Ohto, S., Hiei, Y., Komari, T., Kumashiro, T., "High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*", *Nature Biotechnology*, 14: 745-750, (1996).
27. Mirici, S., "Kolzada Adventif Sürğün Rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı", Doktora Tezi, *G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (2000)
28. Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton, M.-D., Nester, E.W., "Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*", *J. Bacteriol.*, 123: 255-264, (1975).
29. Wang, K, Herrera-Estrella, Van Montagu, M. Zambryski, P., "Right 25 bp terminus sequence of nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome", *Cell*, 38: 455-462, (1984).
30. Leemans, J., Longenakens, J. De Greve, H. Deblaere, R. Van Montagu, M. Schell, J. Broad., "Host range cloning vectors derived from the W- plasmids", *Gene*, 19: 361-364, (1982).
31. Schell, J., Van Montagu, M., "The plasmids as natural and as practical gene vectors for plants", *Bio/Technology*, 1-75, (1983).
32. Joos, H., Inze, D., Caplan, A., Sormann, M., Van Montagu, M. and Schell, J., "Genetic analysis of T-DNA transcripts in nopaline grown galls", *Cell*, 32: 1057-1067, (1983).
33. Stachel, S., Nester, E., "The genetic and transcriptional organization of the *Vir* region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*", *EMBO J.*, 5: 1445-1454, (1986).
34. Zambryski, P.C., "Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story", *Annu. Rev. Plant Physiol.*, *Plant Mol. Biol.*, 43: 465-490, (1992).
35. Douglas, C.J., Staneloni, R.j., Rubin, R.A., Nester, E.W., "Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region", *J. Bact.*, 161: 850-860, (1985).
36. Nester, E.W., Gordon, M., "Early events in transformation of higher plants by *Agrobacterium*", *Physiology and Biochemistry of Plant-Microbiol Interactions*, Keen, N.T., Kosuge, T., Walling, L., *Ame. Soc. of Plant Physiol.*, 1-10, (1988).

37. Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A., "The molecular genetics of crown gall tumorigenesis", In: Scandalios, J.G. and Caspari, E.W. eds., *Advances in Genetics, Mol. Genet. Plants*, 209-283, (1984).
38. Stachel, S.E., Messens, E., Van Montagu, M. and Zambryski, P., "Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*", *Nature*, 318: 624-629, (1985).
39. Leroux, B., Yanofsky, M.F., Winans, S.C., Ward, J.E., Ziegler, S.F. and Nester, E.W., "Characterization of the *virA* locus of *Agrobacterium tumefaciens*: a transcriptional regulator and host range determinant", *EMBO J.* 6: 849-856, (1987).
40. Draper, J., Scott, R., Hamil, J., "Transformation of Dicotyledonous Plant Cells Using the Ti Plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* and the Ri Plasmid of *A. rhizogenes*", *Plant Genetic Transformation and Gene Expression, A Laboratory manual*, Draper J., Scott, R., Armitage, P., Walden, R., *Blackwell Scientific Publishers*, Oxford, 71-160, (1988).
41. Özcan, S., "Tissue Culture in Pea and Engineering a Marker Gene for Specific Expression in Target Cells for Plant Transformation", Doktora Tezi, *Leicester University*, UK. (1993)
42. Klee, H.J., Rogers, S.G., "Plant gene vektors and genetic transformation: Plant transformation systems based on the use of *A. tumefaciens*", *Cell Cul. and Som. Cell Genet. of Plant*, 6: 1-23, (1989).
43. Hoekama, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A., "A binary vector strategy based on separation of *vir* and T-region of the *A. tumefaciens* Ti-plasmid", *Nature*, 303: 179-180, (1983).
44. Hiei, Y., Komari, T., Kubo, T., "Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*", *Plant. Mol. Biol.* 35: 205-218, (1997).
45. Gönülşen, N., *Bitki Doku Kültürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları*, Menemen-İzmir, 7-9, (1987),
46. Vasil, I.K., "Progress in the Regeneration and Genetic Manipulation of Cereal Crops", *Bio/Technology*, 6: 397-402, (1988).
47. Arı, Ş., "Doğrudan Gen Aktarım Teknikleri", *Bitki Biyoteknolojisi II Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları*, S. Özcan, E. Gürel, M. Babaoğlu ed, *S.Ü. Vakfı Yayınları*, Bölüm 16: 160-189, (2001).
48. Murasige, T., "Plant propagation through tissue culture", *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 25: 135-166, (1974).

49. Evans, D.A., Sharp, W.R. and Fich, C.E., "Growth and behaviour of cell cultures: embriyogenesis and organogenesis", Thorpe, T.A.(ed), *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture* Proceedings of UNESCO Symposium, Sao Paulo, Brasil, **Academic Press**, New York, 45-113, (1981).
50. Ammirato, P.V., "Embriyogenesis", In: *Handbook of Plant Cell Culture*, D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamato (e.d.s), **Macmillan**, Newyork, Vol.1: 82-123, (1983).
51. Miller, T., and Skoog, F., 1953, Pierik, R.L.M., "In vitro culture of higher plants", *Am. J. Bot.*, 40: 768-773, (1987).
52. Paulet, 1965, Pierik, R.L.M., "In vitro culture of higher plants", *Rev. Gen. Bot.*, 72: 697-792, (1987).
53. Nitsch, 1968, Pierik, R.L.M., "In vitro culture of higher plants", *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol.*, Veg. 9:1-92, (1987).
54. Gamborg, O.L. and Shyluk J.P., "In Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture", Thorpe, T.A. (ed), **Academic Press**, New York. 234-45, (1981).
55. Er, C. ve Canpolat, N., "Bitki Islahında Doku Kùltürleri", *T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı*, Ankara, (1992).
56. Khawar, K.M., "Mercimek'te Doku Kùltürü Çalışmaları ve *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı", Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2001).
57. Gürel, E. ve Türker, A.U. "Organogenesis", Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kùltürü ve Uygulamaları, Babaoğlu M., Gürel, E., Özcan S., ed. *S.Ü. Vakfı Yayınları*, Bölüm 2: 36-70, (2001).
58. Sharp, W., Evans, D.A. and Sondahl, M.R., "Application of somatic embriyogenesis to crop improvement", In: Fujiwara, A. (ed), *Plant Tissue Culture, 1983, Proceedings of the fifth International Congress of Plant Tissue Culture*, *Japan. Assoc. Plant Tis. Cul.*, Tokyo, 759-762, (1982).
59. Pierik, R.L.M., "In vitro culture of higher plants", **Kluwer Academic Publishers**, MTP Press Limited, Hingham USA. 697-792, (1987).
60. Özcan, S., Babaoğlu, M., Sancak, C., "Somatik Embriyogenesis", Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kùltürü ve Uygulamaları, Babaoğlu M., Gürel, E., Özcan S., ed. *S.Ü. Vakfı Yayınları*, Bölüm 3: 71-88, (2001).
61. Parrott, W.A., Williams, E.G., Hildebrand, D.F., and Collins G.B. and Williams, E.G., "Effect of genotype on somatic embriyogenesis from

- immature cotyledons of soybean plantcell", *Tis. and Org. Cul.*, 16: 15-21. (1989).
62. Green, C.E. and Phillips, R.L., "Plant regeneration from tissue cultures of maize", *Crop Science*, 15: 417-421, (1975).
 63. Beckert, M., and Qing, C.M., "Results of a diallel trial and a breeding experiment for in vitro aptitude in maize", *Theo. and Appl. Genet.*, 68: 247-251, (1984).
 64. Hanzel, J.J., Miller, J.P., Brinkman, M.A., Endos, E., "Genotype and media effects of callus formation and regeneration in barley", *Crop Science*, 25: 27-31, (1984).
 65. Sears, R.G., and Deckard, E.L., "Tissue culture variability in wheat, callus induction and plant regeneration", *Crop Science*, 22: 546-550, (1982).
 66. Trolinder, N.L. and Xhixian, C., "Genotype specificity of the somatic embryogenesis response in cotton", *Plant Cell Rep.*, 8: 133-136, (1989).
 67. Reisch B. and Bingham E.T., "The genetic control of bud formation from callus cultures of diploid alfalfa", *Plant Science Lett.*, 20: 71-77, (1980)
 68. Button, J., Kochba, J. and Bornman, C.H., "Fine structure of and embryoid development from embryogenic ovular callus of 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis* Osb.)", *J. Expt. Bot.*, 25: 446-57, (1974).
 69. Redenbaugh, K., "Synseeds: Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvoment", *CRC Press* Boca Raton, 147-167, (1993).
 70. Umbeck, P., Johnson, G., Barton, K and Swain, W., "Genetically transformed cotton (*Gossypium Hirsutum* L.)", *Bio/Technology*, 5: 263-266, (1987).
 71. Everett, N.P., Robinson, K.E.P. and Mascarenhas, D., "Genetic engineering of sunflower (*Helianthus annuus* L.)", *Bio/ Technology*, 5:1201-1204, (1987).
 72. Thomas, J.C., "Guiltinan, M. J., Bustos, S., Thomas, T. and Nessler, C., Corrot (*Dacus carota*) hypokotyl transformation using *Agrobacterium tumefaciens*", *Plant Cell Rep.*, 8: 354-357, (1989).
 73. Bingham, E.T., Hurley, L.V., Kaatz, D.M. and Saunders, J.W. "Breeding Alfalfa which regenerates from callus tissue in culture", *Crop Sci.*, Vol. 15: 719-721, (1975).
 74. Lupotto, E., "Propagation of an embryogenic culture of *Medicago sativa* L.", *Z. Pflanzenphysiol.*, Bd.111: 95-104, (1983).

75. Brown, D.C.W., Frost, L.A., Koehl, E.M. and Atanassov, A.I., "Germplasm determination of in vitro somatic embryogenesis in *Medicago*" ***International Symposium Plant Tissue and Cell Culture Application to Crop Improvement***, Czechoslovakia, 24-29 september, 137-138, (1984).
76. Atanassov, A.I. and Brown, D.C.W., "Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L.", ***Plant Cell Tiss. Org. Cul.***, 3: 149-162, (1984).
77. Meijer, E.G.M. and Brown, D.C.W., "Screening of diploid *M. sativa* germplasm for somatic embryogenesis", ***Plant Cell Rep.***, 4:285-288, (1985).
78. McKenzie, P.J.S. and Walton, P.D., "Embryogenesis and plant regeneration of *Medicago* spp. in tissue culture", ***Plant Cell Rep.***, 5: 77-80, (1985).
79. Chen, T.H.H. and Marowitch, J., "Screening of *Medicago falcata* germplasm for in vitro regeneration", ***J. Plant Physiol.***, 128: 271-277, (1987).
80. Ray, I.M. and Bingham, E.T., "Breeding diploid Alfalfa for regeneration from tissue culture", ***Crop Sci.***, 29: 1545-1548, (1989).
81. Hernandez, F. MM., "Inheritance of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.)", Abstract of thesis (University of Guelph, Canada). ***Forage Notes***, 34: 79, (1989).
82. Sorenses, EL., Liu, H., Wan, Y., Liang, GH., "Registration of KS206 alfalfa germplasm with high in vitro regeneration of plants", ***Crop Sci.***, 29: 6, 1576-1577, (1989).
83. Sugimoto, KI., Takamizo, T., Hayashi, H., Abe, S., "Effects of genotype medium and nature of the explant on the formation of callus and somatic embryos in alfalfa", ***J. Japen. Soc. Grassland Sci.***, 36: 4, 390-403, (1991).
84. Takamizo, T., Sugimoto, K., Ohsugi, R., "Somatic embryogenesis in a recalcitrant cultivar of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in an improved medium", ***Bull. Nat. Grassland Res. Ins.***, No. 44: 15-22, (1991).
85. Kielly, G.A. and Bowley, S.R., "Genetic control of somatic embryogenesis in alfalfa", ***Genome***, 35: 3, 474-477, (1992).
86. Parrott, W.A. and Bailey, M.A., "Characterization of recurrent somatic embryogenesis of alfalfa on auxin free medium", ***Plant Cell Tiss. and Org. Cul.***, 32: 69-76, (1993).
87. Scarpa, G.M., Pupilli, F., Damiani, F., Arcioni, S., "Plant regeneration from callus and protoplasts in *Medicago polymorpha*", ***Plant Cell Tiss. and Org. Cul.***, 35: 49-57, (1993).

88. Hammad, A.H.A., Piccioni, E., Standardi, A., "Effect of explant type and media composition on callus production and somatic embryogenesis in two alfalfa varieties", *Agricoltura-Mediterranean*, 123: 3, 231-235, (1993).
89. Okumura, K., Oosawa, K., Takai, T., "Effect of explant sources on somatic embryogenesis in alfalfa", *Bul. Nat. Grassland Res. Ins.*, No: 47, 23-28, (1993).
90. Lai, F.M. and McKersie, B.D., "Scale up of somatic embryogenesis in alfalfa (*M. sativa* L.) I Subculture and indirect secondary somatic embryogenesis", *Plant Cell Tis. and Org. Cul.*, 37: 151-158, (1994).
91. Kraic, J., Uzik, M., Hauptvogel, P., "Plant rejueneration from callus cultures of alfalfa", *Biologia-Bratislava*, 49: 1, 59-63, (1994).
92. Ivanova A., Velcheva M. et al., "Endogenous hormone levels during direct somatic embryogenesis in *M. falcata*", *Physiologia-Plantarum*, 92:1, 85-89, (1994)
93. Moursy, H.A., Haggag, M.E.A., Ghanem, S.A., Rady, M.R., "Callus induction and plant regeneration of alfalfa", *Egypt. J. Agrono.*, 20:1-2, 179-189, (1995).
94. Romagnoli, M.V., Ortiz, J.P.A., Cervigni, G.D., et al., "High Frequency somatic embryogenesis with a pampeana-derived genotype of alfalfa", *Euphytica*, 90: 1, 89-93, (1996).
95. Özgen, M., Altınok, S., Özcan, S., Sevimay, C., "In vitro micropropagation of alfalfa cultivars", *Turkish J. Bot.*, 21:5, 275-278, (1997).
96. Kepczynski, J., Florek, I., Ellis, R.H., Black, M., Murdoch, A.J., "The influence of JA-Me and ABA on induction of somatic embryogenesis in *M. sativa* L.tissue cultures", *Curr. Plant Sci. and Biotech. Agricul.*, No. 30, (1997).
97. Iantcheva, A., Vlhova, M. et al., "Regeneration of diploid annual medics via direct somatic embriyogenesis promoted by thidiazuron and benzylaminopurine", *Plant Cell Rep.*, 8: 904-910, (1999).
98. Söyler, G., "Farklı yonca çeşitlerinin *A. tumefaciens*'e karşı olan duyarlılıklarının *in vitro* kültürde belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2001).
99. Deak, M., Kiss, G.M., Koncz, C., Dudits, D., "Transformation of *Medicago* by *Agrobacterium* mediated gene transfer", *Plant Cell Rep.*, 5: 97-100, (1986).

100. Damiani, F., Pupilli, F., Pezzotti, M. and Arcioni, S., "Agrobacterium mediated transformation in forage legumes", *Plant Breed. and Genet.*, 425-429, (1989).
101. Hill, K.K., Jarvis-Eagan, N. et al., "The development of virus-resistant Alfalfa, *M. sativa* L.", *Bio/ Technology*, Vol. 9: 373-377, (1991).
102. Pezzotti, M., Pupilli, F., Damiani, F. and Arcioni, S., "Transformation of *M.sativa* L. Using a Ti plasmid derived vector", *Plant Breed.*, 106: 39-46, (1991).
103. Thomas, M.R., Rose, R.J. and Nolan, K.E., "Genetic transformation of *Medicago truncatula* using *Agrobacterium* with genetically modified Ri and disarmed Ti plasmids", *Plant Cell Rep.*, 11: 113-117, (1992).
104. Masoud, S., Lamb, C.J., Dixon, R.A., "Analysis of transgenic alfalfa plants which express genes coding for a rice chitinase and alfalfa glucanase", *Phytopathology*, 84 (10): 11-47, (1994).
105. Du, S., Erickson, L., Bowley, S., "Effect of plant genotype on the transformation of cultivated alfalfa (*Medicago sativa*) by *A. tumefaciens*", *Plant Cell Rep.*, 13: 330-334, (1994).
106. Desgagnes, R., Laberge, S. et al., "Genetic transformation of commercial breeding lines of alfalfa (*Medicago sativa*)", *Plant Cell Tiss. and Org. Cul.*, 42: 129-140, (1995).
107. Samac, D.A., "Strain specificity in transformation of alfalfa by *A. tumefaciens*", *Plant Cell Tiss. and Org. Cul.*, 43: 271-277, (1995).
108. Pereira, L.F. and Erickson, L., "Stable transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by particle bombardment", *Plant Cell Rep.*, 14: 290-293, (1995).
109. Ninkovic, S., Miljus-Djukic, J., Neskovic, M., "Genetic transformation of alfalfa somatic embryos and their clonal propagation through repetitive somatic embryogenesis", *Plant Cell Tiss. and Org. Cul.*, 42: 3, 255-260, (1995).
110. Chabaud, M., Larssonneau, C., Marmouget, C. and Huguet, T., "Transformation of barrel medic by *A. tumefaciens* and regeneration via somatic embryogenesis of transgenic plants with the MtENOD12 nodulin promoter fused to the *gus* reporter gene", *Plant Cell Rep.*, 15: 305-310, (1996).
111. Trieu, A.T. and Harrison, M.J., "Rapid transformation of *M. truncatula*: regeneration via shoot organogenesis", *Plant Cell Rep.*, 16: 6-11, (1996).

112. Kamate, K. et al., "Transformation of floral organs with GFT in *M. truncatula*", *Plant Cell Rep.*, 19: 647-653, (2000).
113. Shao, C.Y., Russinova, E., et al., "Rapid transformation and regeneration of alfalfa via direkt somatik embryogenesis", *Plant Growth Reg.*, 31:3, 155-166, (2000).
114. Farago, J., Kraic, J., Faragova, N., Kudela, O., "Engineering of nutritional quality and disease resistance in alfalfa by *Agrobacterium*-mediated genetic transformation", *5th International Symposium in the Series Recent Advances in Plant Biotechnology*, September 7-13, High Tatras, Slovak Republic, (2003).
115. Becker, D., Kemper, E., Schell, J., and Masterson, R., "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border", *Plant Mol. Biol.*, 20: 1195-1197, (1992).
116. Özcan, S., Firek, S., and Draper, J., "Selectable marker genes engineered for spesific expression in target cells for plant transformation", *Bio/ Tecnology*, 11: 218-221, (1993).
117. Murashige, T., and Skoog F., "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", *Physiol. Plant.*, 15: 473-497, (1962).
118. Schenk, B.U. and Hildebrandt, A.C., "Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Culture", *Can J. Bot.*, 50:199-204, (1972).
119. Jefferson, R.A., "Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system", *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5: 387-405, (1987).
120. Snedecor, G.W., and Cochran, W.G., "Statistical Methods," *The Iowa State University Pess*, Iowa, USA, (1967).



EKLER

EK-1: Yoncanın önemi hakkında internetten alınan bilgi

IMPORTANCE OF ALFALFA

Alfalfa, called the "Queen of the Forages," is the fourth most widely grown crop in the United States behind corn, wheat and soybeans and double the cotton acreage. Although there is no published value for alfalfa hay the estimated value is \$8.1 billion. There are 23.6 million acres of alfalfa cut for hay with an average yield of 3.35 tons per acre. The estimated value of alfalfa hay is \$102.50 per ton. Alfalfa meal and cubes are exported to other countries with a value of \$49.4 million to the U.S. economy. Alfalfa is sometimes grown in mixtures with forage grasses and other legumes. The acreage of all hay harvested including alfalfa per year is 60.8 million with an estimated value of \$13.4 billion. When the value of alfalfa as a mixture with other forages is considered the acreage and value of hay is approximately equal to wheat and soybeans.

Alfalfa seed is primarily grown in the northwestern areas of the U.S. primarily in the states of California, Idaho, Nevada, Oregon, Wyoming, and Washington. The approximate yield of alfalfa seed in 1999 for the U.S. is 115 million pounds, with average price of \$190 per 100 pounds of seed, thus the estimated value of alfalfa seed is \$218.5 million. A fringe benefit to the production of alfalfa seed is the production of honey from bees. In the U.S., \$147.7 million dollars worth of honey is produced each year.

Alfalfa is also important due to its high biomass production. The record yield of one acre of alfalfa is 10 tons/acre (22 Mg/ha) without irrigation and 24 tons/acre (54Mg/ha) with irrigation. Alfalfa is a widely adapted crop, energy-efficient and an important source of biological nitrogen fixation. The average acre of alfalfa will fix about 200 kg of nitrogen per year, thus reducing the need to apply expensive nitrogen fertilizers.

One of the most important characteristics of alfalfa is its high nutritional quality as animal feed. Alfalfa contains between 15 to 22% crude protein as well as an excellent source of vitamins and minerals. Specifically, alfalfa contains vitamins A, D, E, K, U, C, B1, B2, B6, B12, Niacin, Panthothanic acid, Inocitole, Biotin, and Folic acid. Alfalfa also contains the following minerals: Phosphorus, Calcium, Potassium, Sodium, Chlorine, Sulfur, Magnesium, Copper, Manganese, Iron, Cobalt, Boron, and Molybdenum and trace elements such as Nickel, Lead, Strontium and Palladium. Alfalfa is also directly consumed by humans in the form of alfalfa sprouts. According to the International Sprout Growers there are approximately \$250 million dollars worth of sprouts sold in North America. Alfalfa juice is used in some health food products. Alfalfa is useful in the treatment of arthritis, urinary tract, kidney and bladder infections, as well as prostate disorders. Alfalfa alkalizes and detoxifies the body, especially the liver.

Studies have shown that alfalfa has inhibited the growth of viruses such as herpes simplex. L-canaverine, a non-protein amino acid, found in alfalfa leaves and roots, has been shown in animal studies to have anti-viral properties and be effective in controlling leukemia and cancer cells.

Alfalfa hay is used primarily as animal feed for dairy cows but also for horses, beef cattle, sheep, chickens, turkeys and other farm animals. The value of milk, meat, wool and all other animal products is \$132 billion, thus the total value of animal products plus the value of hay reach the \$145 billion level. This far exceeds the combined value of all other high value crops.

In addition to the traditional uses of alfalfa as an animal feed, alfalfa is beginning to be used as a bio-fuel for the production of electricity, bioremediation of soils with high levels of nitrogen, and as a factory for the production of industrial enzymes such as lignin peroxidase, alpha-amylase, cellulase, and phytase.

An excellent resource of information on alfalfa is the monograph entitled: Alfalfa and Alfalfa Improvement, edited by A.A. Hanson, D. K. Barnes and R.R. Hill, Jr. and published by The American Society of Agronomy, Monograph number 29, published in 1988. ISBN 0-89118-094-X

The statistics which are used were obtained from the 1998 USDA Agriculture Statistics at the website <http://www.usda.gov/nass/pubs/agr98/acro98.htm>

Last Updated: February 8, 2000

<http://www.naaic.org/Alfalfa/Importance.html> (14.01.2003 tarihinde alınmıştır)

ÖZGEÇMİŞ

Semiha ERİŞEN 1972 yılında Sakarya Hendek'te doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Akyazı'da tamamladı. 1993 yılında Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi, Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda lisans, 1998 yılında Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsünde Biyoloji Eğitimi alanında yüksek lisans programını tamamladı. 1995 yılında Milli Eğitim Bakanlığı tarafından öğretmen olarak atandı. Halen Ankara Yenimahalle İlçe Milli Eğitim Müdürlüğüne bağlı Mobil Lisesinde Biyoloji öğretmeni olarak görev yapmaktadır. Evli ve bir kız çocuk annesi olup, ingilizce bilmektedir.

