

Yonca (*Medicago sativa* L.)'da Somatik Embriyogenesis Aracılığıyla Bitki Rejenerasyonu

Semiha ERİŞEN¹

Geliş Tarihi: 16.05.2005

Öz: Dünya'da en çok yetiştirilen yem bitkisi olan yonca, geniş adaptasyon yeteneğine sahip, çiftlik hayvanları için lezzetli, beslenme ve sindirme değeri yüksek ot üreten önemli bir bitkidir. Bu araştırmada yoncanın yüksek rejenerasyon yeteneğine sahip "verco" çeşidinde eksplantların ve uygulanan farklı protokollerin somatik embriyogenesisine etkisi araştırılmıştır. Beş farklı eksplant (hipokotil, kotiledon, gövde, yaprak ve yaprak sapı) iki farklı protokol uygulanarak kültüre alınmıştır. Eksplant kaynağı ile uygulanan protokoller arasında anlamlı farklılığın bulunduğu tespit edilmiştir. I. protokolde eksplantlar ilk olarak 1 mg/l adenin, 1 mg/l 2,4-D, 0.2 mg/l kinetin içeren B5h besin ortamında kültüre alınmıştır. Bu ortamda gelişen kalluslar 21 gün sonra önce 11 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l kinetin içeren SH besin ortamına, daha sonra da Boi2y besin ortamına alınmıştır. Gelişen embriyo toplulukları MSO besin ortamında alt kültüre alınarak bitkicik gelişimi gözlenmiştir. Bu denemede en fazla eksplant başına somatik embriyo 78 adet ile hipokotil eksplantından elde edilmiştir. II. protokolde ise, ilk olarak 4 mg/l 2,4-D içeren B5h besin ortamında kültüre alınan eksplantlar 8 hafta sonra hormonsuz B5h besin ortamına aktarılmıştır. MSO besin ortamında alt kültüre alınan embriyolar bitkiye dönüşmüştür. Bu denemede ise en fazla eksplant başına somatik embriyo yaprak eksplantından (94 adet) elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Medicago sativa*, somatik embriyogenesis, bitki rejenerasyonu

Plant Regeneration Through Somatic Embryogenesis in Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Abstract: Alfalfa is one of the world's most productive forage crops and has wide adaptation because of highly nutritious fodder for farm animals. Regeneration capacity of various explants of cv. verco using various protocols was studied to evaluate their effects. Five explants (hypocotyl, cotyledon, stem, leaf and petiole) were cultured to evaluate two protocols. An interaction was observed between the source of explants and applied protocols. The explant were cultured on B5h medium containing 1 mg/l adenine, 1 mg/l 2,4-D and 0.2 mg/l kinetin in the first protocol. After 21 days the regenerating calli were first subcultured in SH medium containing 11 mg/l 2,4-D and 2 mg/l kinetin. Subsequently they were transferred to Boi2y medium. Developing embryonic clusters were transferred to MSO medium for recovery. The highest number of 78 somatic embryos were obtained from hypocotyl. In the 2nd protocol, the explants were cultured in B5h medium containing 4 mg/l 2,4-D for 8 weeks initially and then moved to plant growth regulator free B5h medium. The plants were recovered from embryos in MSO medium. The highest number of 94 embryos were obtained from leaf explants.

Key Words: *Medicago sativa*, somatic embryogenesis, plant regeneration

Giriş

Yonca, geniş adaptasyon yeteneğine sahip, çiftlik hayvanları için çok lezzetli, besleme ve sindirilme değeri yüksek ot üreten bir yem bitkisidir. Ayrıca baklagiller içerisinde *in vitro* rejenerasyon kabiliyeti nedeniyle doku kültürü ve genetik mühendisliği çalışmalarında model bitki olarak kullanılmasına karşın, rejenerasyon kabiliyeti genotipler arasında önemli farklılıklar gösterebilmektedir.

Doku kültürüyle bitki rejenerasyonu iki şekilde yapılmaktadır. Birincisi; hücre veya dokulardan değişimlere neden olacak uygulamalarla sürgün taslakları oluşturmak, ikincisi ise somatik embriyogenesisidir. Bu embriyolar somatik embriyo olarak adlandırılır ve zigotik embriyolar gibi gelişim gösterirler. Aralarındaki asıl farklılık elde edilmiş yöntemlerinden kaynaklanmaktadır. Zigotik embriyolar döllenmiş zigottan geliştikleri için elde edilen bitkiler açılım gösterirken somatik embriyolardan elde edilen bitkiler genetik olarak klon oluşturmaktadır.

Somatik embriyogenesisin başarısını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar genotip, besin ortamının içeriği ve eksplant kaynağı olarak sayılabilir. Somatik embriyogenesis için değişik bitki kısımları kullanılmakla birlikte, özellikle olgunlaşmamış zigotik embriyolar önemli bir kaynağı oluşturmaktadır. Çünkü zigotik embriyoların embriyonik gelişme için gerekli olan genleri aktif hale getirdiklerine inanılmaktadır. Bununla birlikte çiçek kısımları, anterler, polen ve endosperm dokularının somatik embriyogenesis için iyi bir başlangıç olduğu bildirilmiştir (Sharp ve ark. 1982, Pierik 1987).

Yonca ile yapılan somatik embriyogenesis çalışmalarında ise hipokotil, kotiledon, yaprak sapı, yaprak, gövde eksplantların kullanıldığı ve başarılı sonuçların alındığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Lupotto 1983, Chen ve Marowitch 1987, Sugino bu ve ark. 1991, Moursy ve ark. 1995). Bu

¹ MEB Yenimahalle İlçe Milli Eğitim Müdürlüğü-Ankara

araştırmada ise rejenerasyon kabiliyeti yüksek bir çeşit olan verco çeşidine ait 5 farklı eksplantın ve uygulanan iki farklı protokolün somatik embriyo oluşumuna etkisi araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Çalışmada kullanılan verco çeşidine ait tohumlar A.Ü. Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Suzan Altınok'dan sağlanmıştır. Tohumların yüzey sterilizasyonu %70'lik ticari çamaşır suyunda (Axion) 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 magentalarda 24 °C'de 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta çimlendirmeye alınmışlardır. Burada gelişen 15-20 günlük fidelerden alınan farklı eksplantlar (yaprak, yaprak sapı, gövde, kotiledon ve hipokotil) somatik embriyo gelişimi için iki farklı protokole kültüre alınmıştır (Çizelge 1). I. Protokol Brown ve ark. (1984) tarafından geliştirilmiştir.

Besin ortamının hazırlığında çift distile saf su kullanılmış ve besin ortamının pH'ı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5,8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında 121 °C'de 20 dakika tutularak sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Tüm kültürler beyaz floresan ışığı ($35 \mu \text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) altında 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda 24 °C sıcaklıkta tutulmuştur. Embriyo sayımları kültür başlangıcından 12 hafta sonra yapılırken, gelişen bitkiciklerin sayısı ise 18 hafta sonra yapılmıştır.

Denemeler her birinin içerisinde 10 adet eksplantın bulunduğu 100 x 10 mm'lik petri kutularında 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Elde edilen veriler bilgisayarda "SPSS for Windows" programı ile tesadüf parsellerinde bölünmüş parseller deneme desenine göre analiz edilmiştir. Duncan testi ile karşılaştırılmıştır. Yüzde değerleri istatistik analiz yapılmadan önce "arcsin transformasyon" una tabi tutulmuştur (Snedecor ve Cochran 1967).

Bulgular ve Tartışma

Yüksek oranda somatik embriyo gelişimi için Verco çeşidine ait eksplantlara iki farklı protokol uygulanmıştır.

I. Protokolde embriyogenik kallus oluşturma ortamına alınan eksplantlar bu ortamda 3 hafta süre ile kültüre

alınmıştır. Gelişen kallusların genellikle gevşek dokulu ve şeffaf oldukları gözlenmiştir. Bununla birlikte sıkı yapılı morfogenik yeşil kallusların da oluştuğu görülmüştür. Kalluslar daha sonra embriyo oluşumunu teşvik etmek amacıyla yüksek oranda 2,4-D (11 mg/l) içeren ortama alınmışlardır. 2-3 hafta sonra kallusların üzerinde embriyo oluşumları gözlenmiş ve 3. haftanın sonunda bu tip kalluslar embriyo gelişimi ortamına aktarılmıştır (Şekil 1a). Burada gelişen embriyolar 4-6 haftalık olunca MSO ortamında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 7-8 ay sonra bitkicik gelişimi gözlenmiştir (Şekil 1e).

II. protokolde ise eksplantlar 8 hafta süre ile embriyogenik kallus gelişimi ortamında kültüre alınmıştır. Diğer denemede olduğu gibi bu denemede de kallusların genellikle gevşek dokulu ve şeffaf oldukları gözlenmiştir (Şekil 1b). Kalluslar üzerinde embriyo oluşumları 4. haftanın başında görülmüştür. I. Protokole göre daha erken bir gelişme olduğu saptanmıştır. 8. haftanın sonunda hormonsuz B5h ortamına aktarılan embriyolu kalluslar 6-8 hafta sonra MSO ortamına alınmıştır (Şekil 1c ve d). Bitkicik gelişimi ise yaklaşık 5 ay sonra olmuştur. Gelişen bitkiciklerin morfolojik olarak normal oldukları gözlenmiş ve saksılara aktarılmıştır (Şekil 1f).

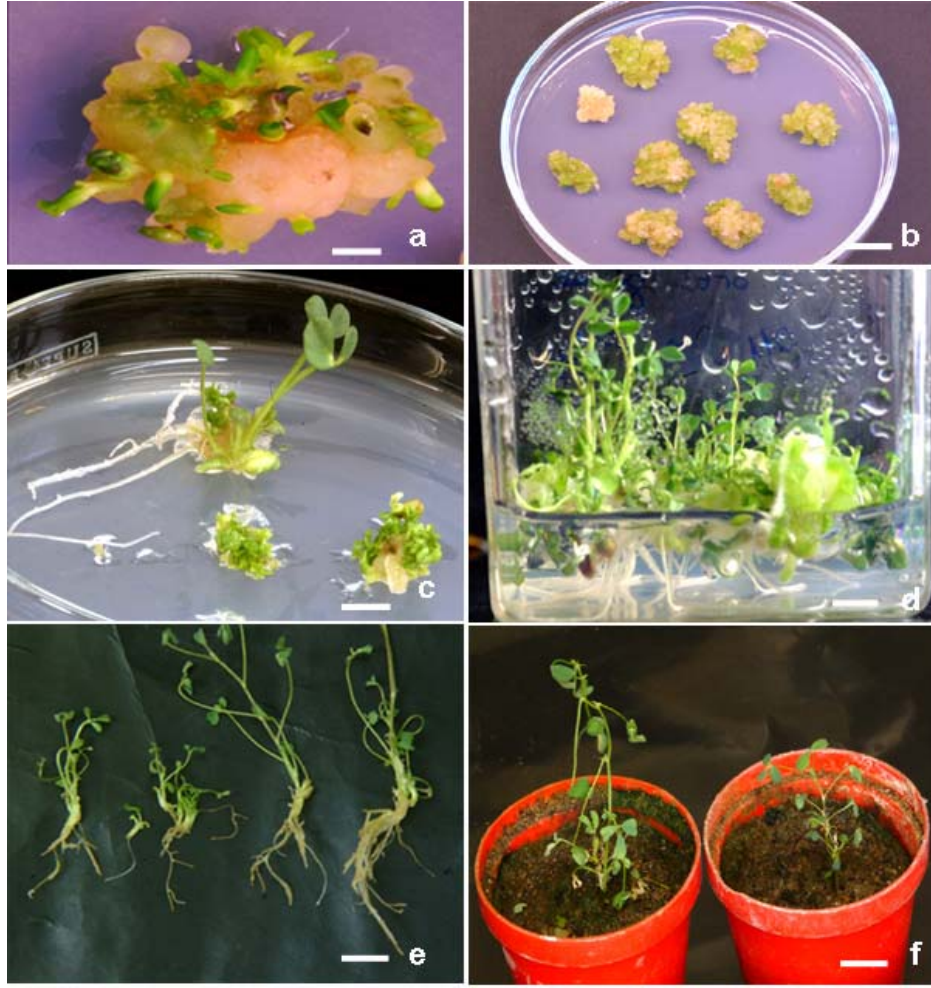
Embriyo oluşumu, gelişimi ve embriyoların bitkicik haline gelmeleri aşamalarının II. Protokolde daha kısa sürede gerçekleştiği gözlenmiştir. Yapılan varyans analizleri sonucunda embriyo oluşturan eksplant yüzdesine, eksplant başına embriyo ve bitkicik sayısına eksplantların etkisi 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Protokol x eksplantların etkisi ise embriyo oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısında 0,05 düzeyinde önemli iken eksplant başına embriyo sayısında 0,01 düzeyinde önemli olmuştur. Çizelge 2'de eksplantların ve protokollerin embriyo oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına embriyo ve bitkicik sayısına etkisine ait Duncan testi sonuçları verilmiştir.

Embriyo oluşturan eksplant yüzdesi bakımından I. protokolde en yüksek oran hipokotil (%27) ve yaprak (%23) eksplantlarından elde edilmiştir. Kotiledon (%20) ve gövde (%17) eksplantlarından da aynı düzeyde sonuçlar alınmıştır. II. protokolde ise yaprak (%33) ve yaprak sapı (%23) eksplantlarından en yüksek sonuçlar alınırken hipokotil (%20) eksplantının da aynı düzeyde embriyogenik kallus oluşturduğu saptanmıştır. Eksplant ortalamaları bakımında en yüksek oranı %28 ile yaprak eksplantından elde edilmiştir. I. protokolde embriyogenik kallus yüzdesi (%19) II. protokole (%18) göre daha yüksek olmuştur (Çizelge 2).

Çizelge 1. Uygulanan doku kültürü protokolleri

Uygulama:	I. protokol	II. protokol
Embriyogenik Kallus Oluşturma Ortamı	B5h* + 1 mg/l adenin + 1 mg/l 2,4-D + 0.2 mg/l kinetin (21 gün)	B5h + 4 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin (8 hafta)
Embriyo Oluşturma Ortamı	SH** + 11 mg/l 2,4-D + 2 mg/l kinetin (21 gün)	----
Embriyo Geliştirme Ortamı	Blaydes + 100 mg/l myoinositol + 2 gr/l yeast ekstrak (Boi2y)* (4-6 hafta)	B5hO (6-8 hafta)
Bitkicik Geliştirme Ortamı	MSO	MSO

* Atanassov ve Brown (1984) **Schenk ve Hildebrandt (1972)



Şekil 1. Yoncada yaprak eksplantından somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu.

- a) I. Protokolde yaprak eksplantından elde edilen kalluslar üzerinde gelişen somatik embriyolar (bar=1mm),
 b) II. Protokolde yaprak eksplantından elde edilen kalluslar (bar=1mm)
 c,d) II. Protokolde kalluslar üzerinde gelişen somatik embriyo ve bitkicik gelişimi (bar=8mm)
 e,f) somatik embriyolardan elde edilen bitkiler ve bitkilerin dış koşullara alıştırılması (bar=9mm, 20mm)

Çizelge 2. Vercu çeşidine ait farklı eksplant ve protokollerin embriyo oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına embriyo ve bitkicik sayısına etkisi

Eksplantlar	Embriyo oluşturan eksplant yüzdesi (%)			Eksplant başına embriyo sayısı ¹ (adet)			Eksplant başına bitkicik sayısı ¹ (adet)		
	Protokol I	Protokol II	Eks. Ort.	Protokol I	Protokol II	Eks. Ort.	Protokol I	Protokol II	Eks. Ort.
Yaprak	23 a	33 a	28	60 ab	94 a	77	15 ab	35 a	25
Yaprak sapı	10 b	23 a	17	6 c	80 ab	43	0 b	31 ab	16
Gövde	17 ab	10 bc	14	30 bc	11 d	21	9 ab	6 c	8
Kotiledon	20 ab	7 c	14	11 c	31 cd	21	5 ab	17 bc	11
Hipokotil	27 a	20 ab	24	78 a	55 bc	67	17 a	30 ab	24
Ortalama	19	18		37	54		9	24	

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

¹Embriyo oluşturan eksplant başına embriyo veya bitkicik sayısı

I. protokolde eksplant başına en fazla embriyo oluşumu 78 adet ile hipokotil eksplantından elde edilirken yaprak eksplantı da aynı düzeyde (60 adet) embriyo oluşturmuştur. II. protokolde ise yaprak eksplantı 94 adet ile en yüksek sonucu vermiştir. Yaprak sapı eksplantından da 80 adet embriyo ile aynı düzeyde sonuç elde edilmiştir. Her iki protokolden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde en fazla embriyo oluşturan eksplant yaprak eksplantı olmuştur (77 adet). Protokollerin ortalamasına bakıldığında eksplant başına 54 adet embriyo II. protokolden, 37 adet embriyo I. protokolden elde edilmiştir (Çizelge 2).

Embriyolardan meydana gelen bitkicik sayıları değerlendirildiğinde ise I. protokolde yine hipokotil eksplantından (17 adet) en iyi sonuç alınmıştır. Fakat yaprak (15 adet), gövde (9 adet) ve kotiledon (5 adet) eksplantlarından alınan sonuçlar da hipokotil eksplantı ile aynı gruba girmiştir. Yaprak sapı eksplantlarından elde edilen az sayıdaki embriyolarda bitkicik gelişimi gözlenmemiştir. II. protokolde ise yaprak eksplantı (35 adet) en iyi sonucu verirken gövde ve hipokotil eksplantları da sırasıyla 31 ve 30 adet bitkicik sayısı ile aynı grupta yer almışlardır. Eksplant ortalamalarında yaprak (25 adet) ve hipokotil (24 adet) eksplantları diğer eksplantlara göre daha yüksek sonuç vermiştir. Protokollere ait sonuçlara bakıldığında I. protokolde ortalama 9 adet bitkicik elde edilmiştir. II. protokolde ise bitkicik sayısının ortalaması 24 adet ile daha fazla olduğu görülmüştür (Çizelge 2).

Somatik embriyogenesis bitki doku kültürü çalışmalarında adventif sürgün rejenerasyonu yanı sıra yapay tohum üretimi için de önemlidir. Rejenerasyonun büyük oranda genotipe bağlı olduğu (Sorensen ve ark., 1989; Reisch ve Bingham, 1980) bilinmekle birlikte, kullanılan protokoller ve eksplant seçimi embriyo oluşumunda etkili olmaktadır. Nitekim, Brown ve ark. (1984) yaptıkları çalışmada kullandıkları protokolün yüksek rejenerasyon yeteneğine sahip kültürler için en iyi sonucu veren yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Meijer ve Brown, (1985) diploid yonca ekotipleri ile Brown ve arkadaşlarının geliştirdikleri protokolü de kullanarak iki farklı protokolde somatik embriyogenesis çalışması yapmışlardır. Sonuç olarak iki protokol arasında anlamlı farklılık bulunmamasına rağmen kendilerinin geliştirdikleri protokolden daha iyi sonuçlar aldıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da kullanılan. I. protokol Brown ve arkadaşlarının geliştirdikleri protokoldür. II. protokolden I. protokole göre daha yüksek oranda embriyo elde edilmiştir. Kullanılan protokollerin embriyo oluşumunda etkili olduğunu farklı araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Moursy ve ark.,1995; Hammad ve ark.,1993; McKenzie ve Walton, 1985).

Yapılan denemelerde eksplant kaynağı ile uygulanan yöntem arasında anlamlı farklılığın bulunduğu tespit edilmiştir. I. protokolde en iyi eksplant hipokotil eksplantı iken II. protokolde yaprak eksplantı en iyi sonuçları vermiştir. Sugino ve ark. (1991)'da somatik embriyo oluşumunda ortam ve eksplant arasındaki etkileşimin önemli olduğunu bildirmişlerdir. Yine farklı protokollerin uygulandığı çalışmalarda Scarpa ve ark. (1993) eksplant kaynağının etkili olduğunu ve en iyi sonucu hipokotil

eksplantından, Okumura ve ark. (1993) eksplantlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olmasa da en iyi sonucu gövde eksplantından elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Somatik embriyo oluşumunda genotip yanında eksplant kaynağı, kullanılan büyüme düzenleyiciler, besin ortamları ve uygulanan protokoller gibi birçok faktör etkili olmaktadır. Bu nedenle rejenerasyon yeteneği yüksek genotipler üzerinde çalışmaların çok yönlü olarak ele alınması ve özelliklerin belirlenmesi büyük yarar sağlayacaktır. Bu çalışmada da eksplant kaynağının ve uygulanan protokollerin veriminde somatik embriyo oluşumuna etkisi belirlenerek, yüksek oranda bitki rejenerasyonu sağlanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar rejenerasyon yeteneği düşük olan diğer çeşitlere de uygulanabileceği gibi gen aktarımı ve sentetik tohum üretimi çalışmalarında da kullanılabilir.

Teşekkür

Bu çalışmadaki desteklerinden dolayı Prof. Dr. Orhan Arslan ve Doç. Dr. Semra Mirici'ye teşekkür ederim. Bu çalışma Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarında yürütülmüştür.

Kaynaklar

- Atanassov, A. I. ve D. C. W. Brown. 1984. Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L. *Plant Cell Tiss. Org. Cul.*, 3: 149-162.
- Brown, D. C. W., LA. Frost, EM. Koehl and AI. Atanassov. 1984. 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.
- Chen, T. H. H. and J. Marowitch. 1987. Screening of *Medicago falcata* germplasm for *in vitro* regeneration. *J. Plant Physiol.* 128: 271-277.
- Hammad, A. H. A., E. Piccioni and A. Standardi. 1993. Effect of explant type and media composition on callus production and somatic embryogenesis in two alfalfa varieties. *Agricoltura-Mediterranean* 123 (3): 231-235.
- Lupotto, E. 1983. Propagation of an embryogenic culture of *Medicago sativa* L. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd.111: 95-104.
- McKenzie, P. J. S. and P. D. Walton, 1985. Embryogenesis and plant regeneration of *Medicago* spp. in tissue culture. *Plant Cell Rep.* 5: 77-80.
- Meijer, E. G. M. and D. C. W. Brown. 1985. Screening of diploid *M. sativa* germplasm for somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 4: 285-288.
- Moursy, H. A., M. E. A. Haggag, S. A. Ghanem and M.R. Rady. 1995. Callus induction and plant regeneration of alfalfa. *Egyptian Journal of Agronomy* 20 (1-2): 179-189.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

- Okumura, K., K. Oosawa and T. Takai. 1993. Effect of explant sources on somatic embryogenesis in alfalfa. Bulletin of the National Grassland Research Institute No: 47: 23-28.
- Pierik, R. L. M. 1987. In vitro culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers, MTP Press Limited, Hingham USA. 697-792.
- Reisch B. and E. T. Bingham. 1980. The genetic control of bud formation from callus cultures of diploid alfalfa. Plant Science Lett. 20: 71-77.
- Scarpa, G. M., F. Pupilli, F. Damiani and S. Arcionib. 1993. Plant regeneration from callus and protoplasts in *Medicago polymorpha*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 35: 49-57.
- Schenk, B. U. and A. C. Hildebrandt. 1972. Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Culture. Can J. Bot., 50:199-204.
- Sharp, W., D. A. Evans and M. R. Sondahl. 1982. 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, Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo, 759-762.
- Snedecor, G. W. and W. G. Cochran. 1967. Statistical Methods. The Iowa State University Pess, Iowa, USA.
- Sorenses, E. L., H. Liu, Y. Wan and G. H. Liang. 1989. Registration of KS206 alfalfa germplasm with high in vitro regeneration of plants. Crop Science 29 (6): 1576-1577.
- Suginobu, K. I., T. Takamizo, H. Hayashi ve S. Abe. 1991. Effects of genotype medium and nature of the eksplant on the formation of callus and somatic embryos in alfalfa. Journal of Japenese Society of Grassland Science 36 (4): 390-403.

İletişim adresi:

Semiha ERİŞEN
MEB Yenimahalle İlçe Milli Eğitim Müdürlüğü-Ankara