

kültürden elde edilen süspansiyon hücrelerinden petri başına 50 adet, 2 ve 1 mg/l 2,4-D içeren ortamdan gelen kalluslarla yapılan süspansiyon kültürüne ait I. alt kültürden elde edilen süspansiyon hücrelerinden ise sırasıyla 65 adet ve 60 adet ile aynı düzeyde embriyo olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 2). Petri başına bitkicik sayısı bakımından embriyo sayısı ile aynı sonuçlar alınmıştır. 4 mg/l 2,4-D içeren ortamdan gelen kalluslarla yapılan süspansiyon kültürüne ait III. alt kültürden elde edilen süspansiyon hücrelerinden oluşan embriyolardan 52 adet bitkicik, 4 mg/l , 2 mg/l ve 1 mg/l 2,4-D içeren ortamdan gelen kalluslarla yapılan süspansiyon kültürüne ait I. alt kültürden elde edilen süspansiyon hücrelerinden oluşan embriyolardan sırasıyla 24, 41 ve 34 adet bitkicik elde edilmiştir (Çizelge 3).

Hipokotil eksplantında ise 4 mg/l 2,4-D içeren ortamdan gelen kalluslarla yapılan süspansiyon kültürüne ait II. alt kültürden elde edilen süspansiyon hücrelerinden petri başına 90 adet ile en yüksek sonuç alınırken aynı ortamın I. alt kültüründen 14 adet embriyo elde edilmiştir. Diğer denemelerde embriyo oluşumu gözlenmemiştir (Çizelge 2). Bu embriyolardan sırasıyla 59 ve 11 adet bitkicik meydana gelmiştir (Çizelge 3).

II. protokole ait denemelerde ise I. protokoldeki uygulamaların aynısı yapılmıştır. Farklı olarak Çizelge 1'de gösterildiği gibi kullanılan besin ortamları büyüme düzenleyiciler ve konsantrasyonları farklılık göstermektedir. Fakat bu uygulamadan herhangi bir sonuç alınamamıştır. Bunun nedenleri embriyogenik kallus oluşumunda kullanılan büyüme düzenleyicilerinin farklı olması olabilir. Birçok araştırmacı somatik embriyogenesisi etkileyen faktörlerden birinin de kullanılan büyüme düzenleyiciler olduğunu ve oksin-sitokinin dengesinin rejenerasyonu etkileyen önemli bir faktör olduğunu bildirmişlerdir (Özcan ve ark.1993, Sharp ve ark. 1982, McKenzie ve Walton 1985). Ayrıca potasyum gibi inorganik ve prolin gibi organik bileşiklerin embriyogenesis ve kallus oluşumunda etkili olduğu belirtilmiştir (Shetty ve McKersie 1993, Lai ve McKersie 1994). Bu çalışmada da embriyogenik kallus aşamasında potasyum ve prolin eklenen protokolden yüksek oranda sonuç alınırken, bu bileşiklerin eklenmediği II protokolle hiç sonuç alınamamıştır.

Somatik embriyogenesis çalışmalarında genellikle ilk aşamada yüksek oranda oksin içeren ortamda kültüre alınan eksplantlar daha sonra hormonsuz ortamlara aktarılmaktadır. Bu çalışmada da en yüksek sonuçlar 4 mg/l 2,4-D içeren ortamlardan elde edilen kalluslardan alınmıştır. Aynı şekilde Takamizo ve ark. (1991) yaptıkları denemelerde 4 mg/l 2,4-D içeren ortamda embriyo miktarının 4 kat daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir.

Sonuç olarak, bu araştırmada yoncanın verco çeşidinde süspansiyon kültürüyle yüksek oranda (petri başına 150 adet) somatik embriyo ve bitkicik (petri başına 106 adet) elde edilmiştir. Yonca bitkisinden kütleli somatik embriyo ve bitki üretiminin arzulandığı durumlarda bu yöntemin kullanılması istenilen sonuçlara ulaşılmasını

sağlayacaktır. Ayrıca hücre süspansiyon yöntemi ile yapay tohum üretimi ve gen transferi gibi bitki biyoteknolojisi çalışmalarında bu sonuçlardan yararlanılabilecektir. Nitekim bir çok araştırmacı gen aktarım çalışmalarında (Deak ve ark. 1986, D'Halluin ve ark.. 1990, Pereira ve Erickson 1995, Chabaud ve ark.. 1996) doku kültürü yöntemi olarak süspansiyon kültürlerini kullanmışlardır.

Teşekkür

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarında yürütülmüştür.

Kaynaklar

- Atanassov, A.I. and DCW. Brown, 1984. Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 3: 149-162.
- Chabaud, M., C. Larssonneau, C. Marmouget and T. Huguet, 1996. Transformation of barrel medic by *A. tumefaciens* and regeneration via somatic embriyogenesis of transgenic plants with the MTENOD12 nodulin promoter fused to the *gus* reporter gene. Plant Cell Rep. 15: 305-310.
- Deak, M., G. M. Kiss, C. Koncz and D. Dudits, 1986. Transformation of *Medicago* by *Agrobacterium* mediated gene transfer. Plant Cell Rep. 5: 97-100.
- Gamborg, O., R. Miller and K. Ojima, 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res., 50:151-159.
- Lai, F. M. and B. D. McKersie, 1994. Scale up of somatic embriyogenesis in alfalfa (*M. sativa* L.) I Subculture and indirect secondary somatic embriyogenesis. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 37: 151-158.
- McKenzie, P. J. S. and P. D. Walton, 1985. Embriyogenesis and plant regeneration of *Medicago* spp. in tissue culture. Plant Cell Rep. 5: 77-80.
- McKersie, B. D. and S. R. Bowley. 1992. Synthetic Seeds in Alfalfa. In Synseeds Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement., K. Redenbaugh ed, CRC Press, Boca Raton, Chapter 14: 231-255.
- Murashige, T. and F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- Özcan, S., M. Barghch, S. Firek and J. Draper, 1993. Efficient adventitious shoot regeneration and somatic embriyogenesis in pea. Plant Cell Tiss. Org. Cult 34: 271-277.
- Pereira, L. F. and L. Erickson, 1995. Stable transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by particle bombardment. Plant Cell Rep. 14: 290-293..
- 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 embryogenesis to crop improvement. In: Fujiwara, A. (ed), Plant Tissue Culture, 1983, Proceedings of the fifth International Congress of Plant Tissue Culture, Japanese Ass. for Plant Tiss. Cult. Tokyo, 759-762.

Shetty, K. and B. D. McKersie, 1993. Proline, thioproline and potassium mediated stimulation of somatic embryogenesis in alfalfa. Plant Sci. 88:185-193

Snedecor, G. W. and W. G. Cochran, 1967. Statistical Methods. The Iowa State University Press, Iowa, USA.

Sökmen, A. ve E. Gürel, 2001. Sekonder Metabolit Üretimi. Bitki Biyoteknolojisi Doku Kültürü ve Uygulamaları, M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan ed, S.Ü. Vakfı Yayınları Bölüm 7: 223-224.

Takamizo, T., K. Sugino and R. Ohsugi, 1991. Somatic embryogenesis in a recalcitrant cultivar of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in an improved medium. Bulletin of the National Grassland Research Institute. No. 44: 15-22.

İletişim adresi:

Semiha ERIŞEN

MEB

Yenimahalle İlçe Milli Eğitim Müdürlüğü

Yenimahalle-Ankara