



6-Benzilaminopurin ve Thidiazuron'un Bazı Yonca Çeşitlerinde İn Vitro Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi

Nilgün Ekinci¹, Satı Uzun^{2*}

¹ Erciyes Üniversitesi, Seyrani Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Kayseri, Türkiye (ORCID: 0000-0003-3148-6966)

² Erciyes Üniversitesi, Seyrani Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Kayseri, Türkiye (ORCID: 0000-0001-9919-3145)

(İlk Geliş Tarihi 23 Haziran 2020 ve Kabul Tarihi 31 Ocak 2021)

(DOI: 10.31590/ejosat.756805)

ATIF/REFERENCE: Ekinci, N. & Uzun, S. (2021). 6-Benzilaminopurin ve Thidiazuron'un Bazı Yonca Çeşitlerinde İn Vitro Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (21), 600-603.

Öz

Bu çalışmada Gea, Prosementi, Savaş ve Ömerbey yonca çeşitlerinde kotiledon boğum eksplantında farklı 6-benzilaminopurin (BAP) ve thidiazuron (TDZ) konsantrasyonlarının in vitro sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, Gea, Prosementi, Savaş ve Ömerbey yonca çeşitlerine ait kotiledon boğumlar, TDZ (0.3, 0.6 ve 1.2 mg/L) ve BAP (1, 2 ve 4 mg/L)'in farklı konsantrasyonları ile 0.5 mg/L α -naftalenasetik asit (NAA) ve 30 g/L sukroz içeren 8 g/L agarla katılaştırılmış 6 farklı Murashige ve Skoog (MS) temel besin ortamında kültüre alınmıştır. Denemeler 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 6 eksplant olacak şekilde tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme desenine göre yürütülmüştür. Araştırma sonucunda Prosementi ve Gea çeşitlerinde en yüksek sürgün rejenerasyonu frekansı 0.6 mg/L TDZ+0.5 mg/L NAA (%100 ve 77.78), Savaş çeşidinde 2 mg/L BAP+0.5 mg/L NAA (% 88.89) ve Ömerbey çeşidinde ise 0.3 mg/L TDZ+0.5 mg/L NAA (%88.89) içeren MS besin ortamlarından elde edilmiştir. Eksplant başına ortalama Prosementi çeşidinde 2.22, Gea çeşidinde 3.21, Savaş çeşidinde 1.67 ve Ömerbey çeşidinde ise 1.96 adet sürgün kaydedilmiştir

Anahtar Kelimeler: *Medicago sativa*, kotiledon boğum, sürgün rejenerasyonu

Effect of 6-Benzylaminopurine and Thidiazuron on in Vitro Shoot Regeneration of Alfalfa Cultivars

Abstract

The effects of 6-benzyl-aminopurine (BAP) and thidiazuron (TDZ) concentrations on in vitro shoot regeneration in Gea, Prosementi, Savaş and Ömerbey cultivars were investigated in this study. For this purpose cotyledon nodes of Gea, Prosementi, Savaş and Ömerbey cultivars were cultured on 6 different Murashige and Skoog (MS) basal media containing different concentration of TDZ (0.3, 0.6 and 1.2 mg/L) and BAP (1, 2 and 4 mg/L), 0.5 mg/L α -naphthalenacetic acid (NAA), 30 g/L sucrose solidified with 8 g/L agar. The research was carried out in a randomized plots-factorial experimental design with 3 replications and 6 explants per replication. As a result of research, the highest shoot regeneration frequency was obtained from the MS media containing 0.6 mg/LTDZ+0.5 mg/L NAA in Prosementi and Gea cultivars (100 and 77.78 %), and from 2 mg/L BAP+0.5 mg/L NAA in Savaş cultivar (88.89 %) and from 0.3 mg/LTDZ+ 0.5 mg/L NAA in Ömerbey cultivar 88.89 %). Average number of shoots per explant was 2.22 in Prosementi cultivar, 3.21 in Gea cultivar, 1.67 in Savaş and 1.96 in Ömerbey cultivars.

Keywords: *Medicago sativa*, cotyledonne node, shoot regeneration

* Sorumlu Yazar: Erciyes Üniversitesi, Seyrani Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Kayseri, Türkiye, ORCID: 0000-0001-9919-3145, scocu@erciyes.edu.tr

1. Giriş

Yonca (*Medicago sativa* L.) çok geniş adaptasyon yeteneğine sahip yeryüzünde en fazla tarımı yapılan bir yem bitkisidir. Bu bitki yüksek verim, adaptasyon yeteneği ve besin kalitesi nedeniyle yem bitkilerinin kraliçesi olarak adlandırılmakta ve dünya üzerinde yaklaşık 35 milyon ha alanda tarımı yapılmaktadır (Gökalp vd., 2017). Yonca otu %15-22 ham protein içermekte, vitaminler (A, B, C, D, E) ve mineral maddeler bakımından oldukça zengindir (Kumar, 2011). Dünyada en fazla yetiştirilen yem bitkisi olmasına rağmen hala yoncanın tarımında ve yem bitkisi olarak kullanımında düşük tohum verimi, yabancı otlar, hastalık ve zararlılar, antibesinsel faktörler, düşük sindirilebilirlik, yetersiz besin elementi kullanımı gibi bazı sorunlarla karşılaşmaktadır (Kumar 2011). Kendine uyumsuzluk, kendileme depresyonu ve yüksek heterozigotluk yonca ıslahı için en önemli sorunlar arasındadır. Yoncadaki bu genetik kompleks yapı önemli tarımsal karakterleri kontrol eden genleri belirlemenin önündeki en büyük engeldir (Kumar, 2011). Ancak son yıllarda alternatif bir teknik olarak transgenik bitki teknolojisi yonca ıslahında tarımsal özellikleri iyileştirmek için kullanılmaktadır. Transgenik bitki teknolojisinde ise doku kültürleri oldukça önemli bir yer tutmaktadır.

Farklı gen aktarım teknikleriyle tek bir bitki hücrelerine herhangi bir organizmadan izole edilen bir gen aktarılabilen ve bu hücreden bitkilerin elde edilmesi için uygun ve tekrarlanabilir rejenerasyon sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda; in vitro bitki rejenerasyonu genellikle somatik embriyogenesis yoluyla yapılmıştır (Moltrasio vd., 2004). Ancak yoncada yapılan somatik embriyogenesis çalışmalarında büyük ölçüde genotipe bağlı bir rejenerasyon görülmektedir (Brown ve Atanassov, 1985; Chen ve Marowitch, 1987; Moltrasio vd., 2004). Ayrıca yoncada in vitro direk organogenesis çalışmaları da ise sürgün ucu, boğum ve kotiledon boğum gibi eksplantlar kullanılmıştır (Pupilli vd., 1992; Li vd., 2009; Kumar vd., 2012; Nofouzi vd., 2019; Gökşin Bahar vd., 2020). Sürgün rejenerasyon frekansı gen aktarımı çalışmalarının başarısında önemli bir rol oynamaktadır. Başarılı gen aktarımı için verimli ve genotipten bağımsız bir rejenerasyon protokolü tercih edilmektedir. Kotiledon boğumlar son yıllarda genotipten bağımsız bir rejenerasyon protokolü için sıklıkla kullanılmaktadır (Li.vd., 2009; Kumar vd., 2012). Bu çalışmada da Türkiye’de tescilli bazı yonca çeşitlerinin vitro koşullarda kotiledon boğum eksplantlarının rejenerasyon frekansının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bitki materyali ve doku kültürü koşulları

Çalışmada; Prosementi Bologna, Gea, Savaş ve Ömerbey yonca çeşitleri denenmiştir. Çalışmada temel besi yeri olarak MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamı kullanılmıştır. Tüm ortamlara 30 g/L sukroz eklenmiş ve 8 g/L agar ile katılaştırılmıştır. Hazırlanan besin ortamlarının pH’sı 5.6 ile 5.8 (1N NaOH veya 1 N HCl ile) arasında ayarlanarak, besin ortamları otoklavda 121°C’de 20 dakika süreyle steril edilmiştir. Rejenerasyon denemelerinde Magenta kapları kullanılmıştır (Sigma-Aldrich, 77x77x 97; Şekil 1). Tüm kültürler 22±2°C’de, 16/8 saat aydınlık/karanlık fotoperiyotta, ve 3000 lüks ışık yoğunluğundaki iklim kabini içerisinde bekletilmiştir.

2.2. Tohum sterilizasyonu, eksplant izolasyonu ve kültürlerin oluşturulması

Çeşitlere ait tohumlar manyetik karıştırıcı kullanılarak %50 ticari çamaşır suyu içerisinde 15 dakika süre ile sterilize edildikten sonra; 3 defa 5’er dakika olmak üzere saf sudan geçirilip, 30 g/L sukroz, 8 g/L agar içeren MS besin ortamına ekilmiştir. Kültür başlangıcından 15-16 gün sonra kotiledon boğum eksplantları sürgün rejenerasyonu amacıyla TDZ veya BAP’ın farklı konsantrasyonlarını ve NAA ile kombinasyonlarını içeren 6 farklı MS besin ortamında kültüre alınmıştır. TDZ konsantrasyonları litreye 0.3-0.6 ve 1.2 mg, BAP konsantrasyonları ise litreye 1, 2 ve 4 mg olarak ayarlanmıştır. Ayrıca tüm ortamlara litreye 0.5 mg NAA eklenmiştir (Tablo 1). Kültür başlangıcında yaklaşık 2 ay sonra sürgün oluşturan eksplant yüzdeleri (%) ve eksplant başına sürgün sayıları (adet) belirlenmiştir.

2.3. Verilerin değerlendirilmesi

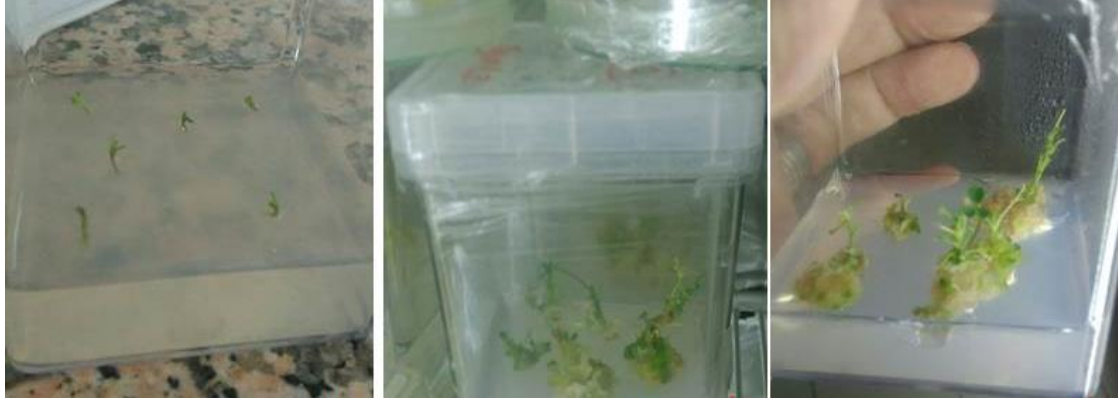
Deneme tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme desenine göre yürütülmüştür. Her uygulama 3 defa tekrarlanmış ve her tekrara 6 adet kotiledon boğum yerleştirilmiştir. Yüzde değerler varyans analizinden önce “arcsin” transformasyonuna tabi tutulmuştur. Ortalamalar arasındaki farklılık “Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi” ile belirlenmiştir.

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Araştırmada Prosementi, Gea, Savaş, Ömerbey çeşitlerine ait kotiledon boğum eksplantları çimlendirme başlangıcından 15 gün sonra 6 farklı ortamda 3 tekerrürlü olarak kültüre alınmışlardır. Kültür başlangıcından yaklaşık 2 ay sonra sürgün oluşturan eksplant yüzdeleri ve eksplant başına sürgün sayıları belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda sürgün oluşturan eksplant yüzdesinde çeşit, ortam ve çeşit × ortam interaksyonu istatistiksel olarak %1 düzeyinde önemli bulunurken, eksplant başına sürgün sayısında ise çeşit ve çeşit × ortam interaksyonu istatistiksel olarak %1 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Deneme sonucunda en yüksek sürgün oluşturan eksplant yüzdesi % 86.22 ile Prosementi çeşidinden elde edilmiş olup bunu sırasıyla %70.37, %64.81 ve %47.22 ile Ömerbey, Savaş ve Gea çeşitleri izlemiştir (Tablo 1). Ortamlar açısından tablo incelendiğinde, en yüksek sürgün oluşturan eksplant yüzdesi %80.56 ile 2 mg/L BAP içeren ortamdan elde edilmiş olup bunu sırasıyla 1 mg/L BAP, 0.6 mg/L TDZ, 4 mg/L BAP, 0.3 mg/L TDZ ve 1.2 mg/L TDZ içeren ortamlar izlemiştir. Çeşit × ortam interaksyonunda en yüksek sürgün rejenerasyonu %100 ile Prosementi çeşidinde 0.6 mg/L TDZ içeren ortamda, en düşük ise %27.78 ile Gea çeşidinde 0.3 ve 1.2 mg/L TDZ içeren ortamlarda kaydedilmiştir.

En yüksek eksplant başına ortalama sürgün sayısı 3.21 adet ile Gea çeşidinden, en düşük ise 1.67 adet ile Savaş çeşidinden elde edilmiştir (Tablo 2). Bitki büyüme düzenleyiciler ve dozlarının eksplant başına sürgün sayısına etkisi istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte en yüksek sürgün sayısı 1.2 mg/L TDZ dozunda belirlenmiştir. Çeşit × ortam interaksyonu açısından tablo değerlendirildiğinde en yüksek sürgün sayısı 5.11 adet ile Gea çeşidinin 1.2 mg/l TDZ dozunda kültüre alınması sonucunda, en düşük değer ise 1.13 adet ile Savaş çeşidinin 1 mg/l BAP içeren ortamda kültüre alınması sonucu tespit edilmiştir.



Şekil 1. Kotiledon boğum eksplantında sürgün rejenerasyonu

Tablo 1. Bazı yonca çeşitlerinin farklı TDZ ve BAP dozlarında sürgün oluşturan eksplant yüzdeleri (%)

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

*: "İtalik veya koyu farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemlidir" Parantez içleri transformasyon değerlerini göstermektedir.

Tüm ortamlarda 0.5 mg/L NAA bulunmaktadır

Tablo 2. Bazı yonca çeşitlerinin farklı TDZ ve BAP dozlarında eksplant başına sürgün sayıları (adet)

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

*: "İtalik veya koyu farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemlidir"

Tüm ortamlarda 0.5 mg/L NAA bulunmaktadır.

Prosementi, Gea, Savaş ve Ömerbey çeşitlerinde kotiledon boğum eksplantlarında sürgün rejenerasyonu amacıyla yürütülen deneme sonucunda sürgün rejenerasyonu frekansı ve eksplant başına sürgün sayılarında çeşit × ortam interaksyonunun önemli olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Nofouzi vd. (2019)'un elde ettikleri sonuçlarda benzerlik göstermektedir. Nofouzi vd (2019)'da genotip ve bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonlarının yoncada kotiledon boğum eksplantında rejenerasyon frekansı ve eksplant başına sürgün sayısında önemli olduğunu bildirmektedir. Benzer şekilde Ding vd. (2003), 16 farklı yonca çeşidinde TDZ ve NAA içeren ortamda sürgün

rejenerasyonu frekansının çeşitlere göre %33- 85 arasında değiştiğini, Kumar vd. (2012) ise 5 farklı yonca çeşidinde apikal meristemlerden in vitro direk sürgün rejenerasyonu üzerine TDZ ve BA'nın etkisini inceledikleri çalışmada sürgün rejenerasyonu frekansının çeşitlere göre ve bitki büyüme düzenleyicilere göre %67 ile 93 arasında değiştiğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada sürgün oluşturan eksplant yüzdesi %27.78 ile %100 arasında değişim göstermiş olup en yüksek Prosementi çeşidinde en düşük ise Gea çeşidinde tespit edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayıları ise 1.13-5.11 arasında değişim göstermiş olup, en yüksek eksplant başına sürgün sayısı Gea çeşidinde, en düşük ise Savaş çeşidinden

elde edilmiştir. Nofouzi vd. (2019) en fazla eksplant başına sürgün sayısını Nimet çeşidinde 5 ve 6.33 adet ile sırasıyla 0.25 mg/L BAP ve 0.55 mg/L TDZ, Savaş çeşidinde ise 8.50 ve 4.66 adet ile sırasıyla 0.4 mg/L BAP ve 0.15 mg/L TDZ içeren ortamlarda bildirmiştir. Li vd. (2009), 8 farklı yonca genotipinde kotiledon boğum eksplantında TDZ ve AgNO₃ içeren besin ortamlarında eksplant başına 2.8-5.9 adet sürgün elde ederken; Kumar vd. (2012) BAP, kinetin ve TDZ'nin farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarında eksplant başına 0.2-35 adet sürgün elde etmişlerdir. Çalışmalar arasındaki farklılıklar çeşitlerden veya kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerin farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarından kaynaklanmış olabilir. Nitekim Kumar vd. (2012), TDZ'nin BAP ya da kinetin ile kombinasyonlarının adventif sürgün sayısını artırdığını ve TDZ-BAP kombinasyonlarının TDZ-kinetin kombinasyonlarına göre daha iyi sinerjistik etki gösterdiğini bildirmektedir.

4. Sonuç

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

5. Teşekkür

Bu çalışma Nilgün EKINCI'nin yüksek lisans tezinden hazırlanmıştır.

Kaynakça

- Gökalp, S., Yazıcı, L., Çankata, N. & İspirli, K. (2017). Bazı yonca (*Medicago sativa* L.) çeşitlerinin Tokat-Kozova ekolojik koşullarında ot verimi ve kalite performanslarının belirlenmesi. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 34(3): 114-127.
- Gökşin Bahar, F., Bayraktar, M. & Gürel, A. (2020). 'Kalender' Yonca (*Medicago sativa* L.) Çeşidinin In vitro Çoğaltımı Üzerine Farklı Besin Ortamları, Sitokininler ve Eksplant Tiplerinin Etkisi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (19), 449- 459.
- Brown, D.C.W & Atanassov, A. (1985). Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 4:111-122.
- Chen, T.H.H. & Marowitch, J. (1987). Screening of *Medicago falcata* germplasm for in vitro rejeneration. *Journal Plant Physiology*, 128:271-277.
- Ding, Y.L., Aldao-Humble, G., Ludlow, E., Drayton, M., Lin, Y.H., Nagel, J., Dupal, M., Zhao, G., Pallaghy, C., Kalla, R. &

- Emmerling, M. (2003). Efficient plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Medicago* and *Trifolium* species. *Plant Science*, 165(6), pp.1419-1427.
- Kumar, S., Tiwari, R., Chandra, A., Sharma, A. V. & Bhatnagar, R. K. (2012). In vitro direct plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of lucerne (*Medicago sativa* L.). *Grass and Forage Science*, 68(3), 459-468.
- Kumar, S. (2011). Biotechnological advancements in alfalfa improvement. *Journal of applied genetics*, 52(2), pp.111-124.
- Li, J.J., Wu, Y.M., Wang, T., Liu, J.X., 2009. In vitro direct organogenesis and regeneration of *Medicago sativa*. *Biologia plantarum*, 53(2): 325-328.
- Moltrasio, R., Robredo, C. G., Gómez, M. C., Paleo, A. H. D., Díaz, D. G., Rios, R. D. & Franzone, P. M. (2004). Alfalfa (*Medicago sativa*) somatic embryogenesis: genetic control and introduction of favourable alleles into elite Argentinean germplasm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77(2), 119-124.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nofouzi, F., Oğuz, M. Ç., Khabbazi, S. D. & Ergül, A. (2019). Improvement of the in vitro regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Medicago sativa* L. *Turkish Journal of Agriculture & Forestry*, 43(1): 96-104.
- Pupilli, F., Damiani, F., Nenz, E. & Arcioni, S. (1992). *In Vitro* Propagation of *Medicago* and *Lotus* Species by Node Culture, *In Vitro Cellular Developmental Biology* 28: 167-171.