



Uzun Yapraklı Üçgülün (*Trifolium pannonicum* ssp. *elongatum*) Hipokotil ve Yaprak Sapı Eksplantından *in vitro* Çoğaltılması

Nurdan ŞAHİN DEMİRBAĞ¹

Hayrettin KENDİR¹

Geliş Tarihi:22.10.2008

Kabul Tarihi: 29.12.2009

Öz: Bu çalışmada, kinetin ve α - naftalin asetik asitin (NAA)'in farklı konsantrasyonlarının (kinetin ve 0.1+ 0.1, 0.2, 0.4 NAA mg/l), uzun yapraklı üçgül (*Trifolium pannonicum* ssp. *elongatum*) bitkisinin hipokotil ve kotiledon yaprak sapı eksplantlarından gelişen sürgün yüzdesi, sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Araştırmada, sürgün oluşturan eksplant yüzdesinin en yüksek oranda (% 91.7) hipokotil eksplantından ve Murashige and Skoog (MS) içinde 1 mg/l Kinetin + 0.4 mg/l NAA içeren ortamdan; en düşük sürgün yüzdesinin (% 25.0) hipokotil ve kotiledon yaprak sapı eksplantlarının her ikisinde de 1 mg/l Kinetin + 0.1 NAA içeren rejenerasyon ortamında geliştiği belirlenmiştir. Eksplant başına en fazla sürgün sayısı 11.2±1.3 adet ile 1 mg/l Kinetin+0.4 mg/l NAA içeren ortamdan, en düşük sürgün sayısı 2.5±0.6 adet ile 1 mg/l kinetin + 0.1 NAA uygulamasında gözlenmiştir. En uzun sürgün gelişimi 3.5±0.5 cm ile (1 mg/l kinetin+ 0,1 mg/L NAA) içeren MS ortamında, en kısa sürgün gelişimi ise 1.5±0.2 cm ile 1 mg/l kinetin + 0.4 NAA MS ortamında belirlenmiştir. *Trifolium pannonicum* JACQ. ssp. *elongatum* bitkisinden maksimum kök gelişimi % 95±2.9 ile 1 mg/l IBA uygulamasından elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Trifolium pannonicum* ssp. *elongatum*, hipokotil, kotiledon yaprak sapı, adventif sürgün rejenerasyonu, köklenme.

In vitro Propagation of Long Leaved Clover (*Trifolium pannonicum* ssp. *elongatum*) Using Hypocotyle and Petiole Explants

Abstract: The study reports effects of various concentrations of Kinetin and α - Naftalin asetik asit (NAA) (kinetin and 0.1+ 0.1, 0.2, 0.4 NAA mg/l) on shoot regeneration (percentage, number and length of shoot) of *Trifolium pannonicum* ssp. *elongatum* from hypocotyl and petiole of cotyledon leaf. The maximum (91.7%) shoot regeneration frequency (25%) was recorded on hypocotyl explant on Murashige and Skoog (MS) medium containing 1 mg/l Kinetin + 0.4 mg/l NAA; whereas, minimum shoot regeneration frequency (25%) was in medium containing 1 mg/l Kinetin + 0.1 NAA respectively, in both hypocotyl and petiole of cotyledon leaf explant. The highest number of 11.2±1.3 shoots per explant was recorded on MS medium containing 1 mg/l Kinetin+0.4 mg/l NAA and the lowest number of 2.5±0.6 was in medium containing 1 mg/l Kinetin+0.1 mg/l NAA respectively. The longest shoots (3.5±0.5 cm) were recorded on MS medium containing 1 mg/l kinetin+ 0,1 mg/L NAA, and the smallest shoots (1.5±0.2 cm) were recorded on MS medium containing 1 mg/l kinetin + 0.4 NAA. Maximum frequency of 95% roots was recorded on MS medium containing 1 mg/l IBA.

Key Words: *Trifolium pannonicum* ssp.*elongatum*, hypocotyl, petiole of cotyledon, adventitious shoot regeneration, rooting

Giriş

Yem bitkilerinden üçgül (*Trifolium* L.) cinsinin 274 türü (Zohary ve Heller 1984) her iki yarım kürenin tropik ve subtropik bölgelerinde dağılım göstermektedir (Bisby ve ark. 1994). Üçgül türleri en fazla yayılımını yaklaşık 150 tür ile Doğu Akdeniz bölgesinde göstermektedir (Zohary 1972). Bu bölge için endemik olan birçok üçgül türü bulunmaktadır. Akdeniz havzasına komşu olan birçok ülke bazı endemik üçgül türlerine sahip olmasına rağmen en fazla endemik tür Türkiye'de (100 tür) ve Bulgaristan'da (67 tür) bulunmaktadır (Pederson ve ark. 1999).

Türkiye'deki çayır-meralarda botanik kompozisyona giren ve hayvan besleme yönünden değerli olan üçgül türleri, aynı zamanda toprakların fiziksel ve kimyasal yapılarını iyileştirmede önemli bir role sahiptir (Açıkgöz 2001).

Bazı tek ve çok yıllık üçgül türleri, tarla tarımı içinde yetiştirildiğinde, önemli bir kaba yem kaynağı olarak öne çıkmaktadır. Türkiye tarımında eksikliği duyulan yem bitkisi çeşitlerinin geliştirilmesinde üzerinde durulması gereken türlerden biri de üçgül cinsine ait

¹Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Ankara, Türkiye

türlerdir. Özellikle, yerli bitki materyali arasından geliştirilecek yeni üçgül çeşitlerinin, iklim ve toprak yapısı farklı bölgelerde geliştirilen ithal çeşitlere göre başarı şansı daha yüksek olacaktır.

Türkiye florasında bulunan uzun yapraklı üçgül, (*Trifolium pannonicum* ssp. *elongatum*) çok yıllık, 20-40 cm boylanabilen ve gövdesi dik yada yarı dik gelişme gösteren endemik bir üçgüldür. Deniz seviyesinin 300-2300 m yüksekliklerine kadar bulunur (Tubives 2008).

Üçgül ıslahında, son yıllarda geleneksel ıslah programı içinde *in vitro* genetik manipülasyon metodları ile değişik tip streslere karşı dayanıklı bitkiler elde etmek için çalışmaların yapılmasının gerekliliği vurgulanmaktadır (Sahin Demirbag ve ark. 2008).

Son yıllarda değişik üçgül türlerinde organogenezis veya somatik embriyogenezis aracılığı ile elde edilen rejenerasyon çalışmaları yayınlanmıştır (Singha ve ark. 1988, Zhang ve ark. 1999 ve Uranbey ve ark. 2005). Tüm bu çalışmalar, bitki büyüme düzenleyicilerinin ve eksplant tiplerinin sürgün rejenerasyonundaki önemini ortaya koymaktadır. *T. pannonicum* ssp. *elongatum* için ise şu ana kadar hiçbir geleneksel ya da modern biyoteknolojik yöntemle sürgün rejenerasyonu çalışması ortaya konulmamıştır. Böyle bir protokolün ortaya konması ve etkin bir hızlı çoğaltım metodunun geliştirilmesi, sözkonusu endemik türden geliştirilecek yeni yem bitkisi çeşitlerinin kısa süre içinde bir şekilde ortaya konulmasını sağlayacaktır. Bu sebeplerden ötürü, *T. pannonicum* ssp. *elongatum*'da hızlı ve etkin bir bitki çoğaltım yönteminin geliştirilmesinin gerekliliği söz konusudur.

Materyal ve Metod

Araştırma, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan üçgül (*T. pannonicum* ssp. *elongatum*) bitkisinin tohumları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Osman Tosun Gen Bankası'ndan sağlanmıştır.

Üçgül bitkisinin tohumları % 50'lik ticari çamaşır suyu (%5-6'lık NaOCl, Ace®) bulunan 500 ml'lik steril kavanozlar içerisinde, 20 dakika süreyle yüzey sterilizasyona tabi tutulduktan sonra, 3'er defa 5'er

dakika steril saf su ile durulama işlemi yapılmıştır. Yüzey sterilizasyon işleminden sonra tohumlar çimlendirme işlemi için MS (Murashige and Skoog 1962) temel besin ortamına koyulmuşlardır. Tohumların çimlendirme ortamında kullanılan MS makro ve mikro elementleri ve vitaminlerle % 3'lük şeker içeren % 0.65'lik Agar (Duchefa Germany) içermektedir. Steril *in vitro* koşullarda yaklaşık 7-8 günlük olan tohumdan elde edilen sürgünlerden hipokotil ve kotiledon yaprak sapı (petiol) eksplantları alınmıştır. Elde edilen eksplantlar, steril koşullar altında her bir Petri™'ye (100x10 mm) % 3 şeker, % 0.65 agar (Duchefa®) ve 1 mg/l Kinetin ve 0.1, 0.2, 0.4 mg/l α naftalin asetik asit (NAA) (Çizelge 1) içeren rejenerasyon ortamında kültüre alınmıştır. Ortam hazırlığında distile su kullanılmış olup, besin ortamının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.6 – 5.8'e ayarlandıktan sonra ve 121 °C 'de, 118 kPa basınç altında 20 dakika tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Tüm kültürler 16 saat ışık fotoperiyodunda 24±2 °C sıcaklıkta tutulmuşlardır. Üçgül bitkisine ait rejenerasyon ortamına sürgünler, 10–20 mm uzunluğa geldiklerinde, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25 ve 1.50 mg/l indol 3 bütrik asit (IBA) içeren MS köklendirme ortamlarına alınmıştır.

Köklenen fideler (1:1:1) oranında torf, vermikulit ve perlit içeren saksılara şaşırtılmıştır. Saksılar serada 24±2 °C sıcak ve doğal ışık altında gelişmeye bırakılmış ve 2 hafta boyunca gerektiği dönemlerde sulanmıştır. Bu şekilde fidelerin hem ortam şartlarına uyum sağlaması, hem de kök sisteminin gelişmesi sağlanmıştır.

Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre, her tekrerde 5 eksplant olmak üzere 5 tekerrürlü olarak 2 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen veriler "SPSS for Windows 15.0" programı yardımıyla general linear model testine tabi tutulmuş, muamele ortamlarını karşılaştırmak amacıyla Duncan testi kullanılmıştır. Yüzde değerler, istatistik analizinden önce arcsin değerlerine çevrilmiştir (Snedecor ve Cochran 1967).

Bulgular

Sürgün rejenerasyonu: Çalışmada Kinetin ve NAA'ın değişik konsantrasyonlarının üçgül adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi araştırılmıştır. Kültür başlangıcından sonraki ilk iki hafta içinde sürgünler oluşmaya başlamıştır.

Çizelge 1. Uzun yapraklı üçgül bitkisinde hipokotil ve kotiledon yaprak sapı eksplantlarından gelişen adventif sürgün rejenerasyonu yüzdesi (\pm SEM)

Uygulamalar (mg/L)	Eksplant Tipi		Ortalamalar
	Hipokotil	Kotiledon Yaprak Sapı (Petiol)	
1 Kinetin+ 0.1 NAA	25.0 \pm 0.0 b	25.0 \pm 0.0 b	25.0 \pm 0.0
1 Kinetin + 0.2 NAA	50.0 \pm 14.4 b	33.3 \pm 8.3 b	41.7 \pm 8.33
1 Kinetin + 0.4 NAA	91.7 \pm 8.3 a	41.7 \pm 8.3 b	66.7 \pm 12.4
Ortalama	55.6 \pm 10.9	33.3 \pm 4.2	44.4 \pm 6.3

a-b; Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$).

Sürgün oluşturan eksplant oranı: Varyans analizi sonucunda sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından, farklı bitki büyüme düzenleyici maddeler ile eksplant arasında istatistiksel olarak önemli etkileşim bulunmuştur ($P<0.05$). Çizelge 1'de görüldüğü gibi sürgün oluşturan eksplant yüzdesi en fazla % 91.7 \pm 8.3 ile hipokotil eksplantından ve 1 mg/l Kinetin + 0.4 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilirken, en düşük sürgün yüzdesi % 25.0 \pm 0.0 ile her iki eksplantta 1 mg/l Kinetin + 0.1 NAA içeren ortamda gözlenmiştir. Diğer ortam ve eksplantlardan elde edilen sonuçlar ise bu iki grubun değerleri arasında yer almışlardır.

Eksplant başına sürgün sayısı: Eksplant başına sürgün sayısı incelendiğinde bitki büyüme düzenleyici maddelerin farklı konsantrasyonlarının, eksplant başına sürgün sayısına etkisi önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Çizelge 2'de görüldüğü gibi, eksplant başına en fazla sürgün sayısı 11.2 \pm 1.3 adet ile 1 mg/l Kinetin+0.4 mg/l NAA içeren ortamdan, 2.5 \pm 0.6 adet ile en düşük sürgün sayısı 1 mg/l kinetin + 0.1 NAA uygulamasında gözlenmiştir. Kullanılan her iki eksplant arasında istatistiksel olarak 0.05 düzeyinde önemli farklılık belirlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından 7.1 \pm 1.6 adet ile hipokotilin kotiledon yaprak sapı eksplantına göre daha fazla sürgün verdiği tespit edilmiştir (5.2 \pm 1.3 adet).

Sürgün Uzunluğu: Yürütülen çalışmanın sonuçlarına göre, farklı bitki büyüme düzenleyici maddelerin üçgülün sürgün uzunluğu üzerine olan etkisi istatistiksel olarak 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur.

En uzun sürgün gelişimi 3.5 \pm 0.5 cm ile 1 mg/l Kinetin+ 0,1 mg/L NAA içeren ortamda ve en kısa sürgün gelişimi ise 1.5 \pm 0.2 cm ile 1 mg/l Kinetin + 0.4 NAA içeren ortamda belirlenmiştir. 1 mg/l Kinetin + 0.2 mg/l NAA içeren ortamdan 1.9 \pm 0.3 cm uzunlukta sürgünler elde edilmiştir (Çizelge 3).

Köklenme Oranı: Uzun yapraklı üçgül bitkisinde, hipokotil eksplantından elde edilen sürgünler altı farklı konsantrasyondaki Indol bütirik asit (IBA) köklendirme ortamında başarılı bir şekilde köklenmiştir. Çizelge 4 de görüldüğü üzere, farklı IBA konsantrasyonlarındaki köklenme yüzdeleri $P<0.01$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır.

Çizelge 2. Uzun yapraklı üçgül bitkisinde hipokotil ve kotiledon yaprak sapı eksplantlarından gelişen adventif sürgün sayısı (\pm SEM)

Uygulamalar (mg/L)	Eksplant Tipi		Ortalamalar
	Hipokotil	Kotiledon Yaprak Sapı	
1 Kinetin+ 0.1 NAA	3.7 \pm 0.7	1.3 \pm 0.4	2.5 \pm 0.62 c
1 Kinetin + 0.2 NAA	4.7 \pm 1.5	5.0 \pm 0.6	4.8 \pm 0.5 b
1 Kinetin + 0.4 NAA	13.0 \pm 1.2	9.3 \pm 1.9	11.2 \pm 1.3 a
Ortalama	7.1 \pm 1.6 a	5.2 \pm 1.3 b	6.2 \pm 1.0

a-c; Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$).

Çizelge 3: Uzun yapraklı üçgül bitkisinde hipokotil ve kotiledon yaprak sapı eksplantlarından gelişen sürgün uzunluğu (cm) (\pm SEM)

Uygulamalar (mg/l)	Eksplant Tipi		Ortalamalar
	Hipokotil	Kotiledon Yaprak sapı	
1 Kinetin+ 0.1 NAA	3.9 \pm 0.2	3.1 \pm 0.9	3.5 \pm 0.5 a
1 Kinetin + 0.2 NAA	1.8 \pm 0.5	1.9 \pm 0.3	1.9 \pm 0.3 b
1 Kinetin + 0.4 NAA	1.9 \pm 0.2	1.0 \pm 0.1	1.5 \pm 0.2 b
Ortalama	2.5 \pm 0.4	2.0 \pm 0.4	2.3 \pm 0.3

a-b; Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$).

Çizelge 4: Uzun yapraklı üçgül bitkisinin farklı Indol Bütirik Asit (IBA) konsantrasyonlarında köklenme yüzdesi (\pm SEM)

IBA (mg/ l)	Köklenme yüzdesi (%)
0.25	43.3 \pm 6.0 cd
0.50	61.7 \pm 1.7 b
0.75	93.3 \pm 4.4 a
1.0	95.0 \pm 2.9 a
1.25	58.3 \pm 8.3 bc
1.50	31.7 \pm 6.7 d
Ortalama	63.9 \pm 6.0

a-d; Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($P<0.01$).

Köklenme oranı bakımından 1 ve 0.75 mg/l IBA dozlarında % 95±2.9 ve % 93.3±4.4 ile en yüksek köklenme yüzdesine, % 31.7±6.7 ile 1.5 mg/l IBA dozunda ise en düşük köklenme yüzdesine ulaşılmıştır. En fazla köklenme yüzdesi 0.75 ve 1.0 mg/l IBA içeren ortamdan elde edilmiştir. Elde edilen bitkiler başarı ile sera koşullarında saksılara aktarılmıştır ve dış koşullara alıştırmıştır.

Tartışma

Bu araştırmada MS ortamına Kinetin ve NAA'in değişik konsantrasyonları ilave edilerek, uzun yapraklı üçgülün hipokotil ve kotiledon yaprak sapından adventif sürgün rejenerasyonu gelişimine bakılmıştır. Uzun yapraklı üçgül bitkisinde hipokotil ve kotiledon yaprak sapı eksplantlarından gelişen adventif sürgün rejenerasyonu yüzdesine ve eksplant başına sürgün sayısına bakıldığında, ortamda 1 mg/l Kinetinle NAA'in miktarındaki artış ile her iki eksplantta da sürgün oluşum yüzdesinde ve eksplant başına sürgün sayısında belirgin artış gözlenmiştir. Ancak, hipokotil ve kotiledon yaprak sapı eksplantları kıyaslandığında, hipokotil eksplantında daha fazla sürgün oluşumu gözlenmiştir. Benzer şekilde Wang ve Holl (1988) üçgül türlerinin sürgün çoğaltımıyla ilgili yaptıkları çalışmada, oksinle beraber sitokinini kullanılmışlardır. Fratini ve Ruiz (2002) yaptıkları çalışmada, en iyi rejenerasyon olan sürgünlerin kinetin ya da zeatin içeren besin ortamlarının düşük dozlarında geliştiğini ve daha sonra da kök gelişiminin elde edildiğini bildirmişlerdir. Mokhtarzadeh ve Constantin (1978), *T. alexandrium* bitkisinin anther ve hipokotillerinden kallus oluşturmak için MS ortamına NAA ve Kinetin eklemiştir. Komalavalli ve Rao (1997) bazı çok yıllık çalimsı bitkilerle yapılan çalışmalarda, BA ve Kinetinin mikro bitki çoğaltımında süper bir kombinasyon oluşturduğunu bildirmiştir. Beach ve Smith (1979), *T. pratense* ve *T. incarnatum* bitkilerinde NAA, 2, 4-D ve Kinetin içeren B5 ortamında kalluslar oluşturarak bitki elde etmişlerdir.

Sevimay ve ark. (2005), *T. repens* bitkisinin kotiledon ve hipokotil eksplantlarından çeşitli konsantrasyonlarda TDZ (Thidiazuron) - NAA ya da Kinetin NAA kullanarak somatik embriyogenez elde etmiş ve hipokotillerin TDZ-NAA içeren ortamlarda, kotiledonlara göre, yüksek frekansta rejenerasyon verdiğini bildirmişlerdir. Buna karşılık, Uranbey ve ark (2005), kışlık üçgülde (*T. resupinatum*), MS besi ortamına BAP(6-benzylaminopurine), IBA, veya BAP, Kinetin ve IBA kombinasyonu ile destekleyerek, koltuk altı meristem, hipokotil ve kotiledon nodu eksplantlarından, en fazla sürgün rejenerasyonunu 1.6 mg/L BA ve 0.2 mg/L IBA veya 3.2 mg/L BA ve 0.2

mg/L IBA içeren MS ortamında kotiledon nodlarından elde etmişlerdir.

Barik ve ark. (2004) yaygın mürdümükte kotiledon nodu üzerine farklı kinetin dozlarının etkilerini araştırdıkları çalışmada, sürgün gelişiminin kinetin yükselen dozları ile arttığı saptamışlardır. Buna karşılık, Konieczny (1995), *Trifolium nigrescens* bitkisinde 8 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l Kinetin içeren MS ortamında kalluslar elde etmiştir. Daha sonra, bu kalluslar 0.5 mg/l NAA ve 2 mg/l 2-iP içeren MS ortamına aktarıldığında embriyo oluşumu gözlenmiştir. McLean ve Nowak (1989), çayır üçgülünde hipokotilde, epikotile göre, daha yüksek sürgün rejenerasyonu olduğunu gözlemişlerdir.

Bu çalışmada, uzun yapraklı üçgül bitkisinden maksimum kök gelişimi % 95 ile 0.75 ya da 1 mg/l IBA içeren MS ortamından elde edilmiştir. Bu sonuçlar, Uranbey ve ark. (2005)'in çalışmasıyla uyum göstermektedir.

Sonuç

Çalışma sonuçları, endemik uzun yapraklı üçgül bitkisinin hipokotil ve kotiledon yaprak sapı eksplantlarından kinetin + NAA kullanarak başarılı biçimde mikro çoğaltma yapılabileceğini göstermiştir. Geliştirilen bu protokol sayesinde, endemik uzun yapraklı üçgül bitki türünün ıslahına fayda sağlanabileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Açıkgöz, E. 2001. Yem Bitkileri. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü. 3. Baskı. 584, Bursa
- Barik, D.P., S. K. Naik, U. Mohapatra and P. K. Chand. 2004. High frequency plant regeneration by *in vitro* shoot proliferation in cotyledonary node explants of grasspea (*Lathyrus sativus* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 40: 467–470.
- Beach, K.H. and R.R. Smith. 1979. Plant regeneration from callus of red and crimson clover. *Plant Science Letters* 16: 231-237.
- Bisby, F.A, J. Buckingham and J.B. Harborne. 1994. *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*. Chapman and Hall, London. 673.
- Fratini, R. and M.L. Ruiz. 2002. Comparative study of different cytokinins in the induction of morphogenesis in lentil (*Lens culinaris* Medik.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 38: 46-51.
- Komalavalli, N. and M.V. Rao. 1997. *In vitro* micropropagation of *Gymnema elegans* W& A, a rare medicinal plant. *Indian Journal of Experimental Biology* 35: 1088–1092.

- Konieczny, R. 1995. Plant regeneration in callus culture of *Trifolium nigrescens* Viv. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 37: 47-53.
- McLean, N.L. and J. Nowak. 1989. Plant regeneration from hypocotyl and petiole callus of *Trifolium pratense* L. Plant Cell Reports 8: 395-398.
- Mokhtarzadeh, A. and M.J. Constantin. 1978. Plant regeneration from hypocotyl-and. anther-derived callus of berseem clover. Crop Science 18:567-572.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Plant Physiology 15: 473-497.
- Pederson, G.A., K.H. Quesenberry, G.R. Smith and Y.K. Guteva. 1999. Collection of *Trifolium* sp. and other forage legumes in Bulgaria. Genetic Resources and Crop Evolution 46:325-33
- Sevimay, C.S., K.M. Khawar, S. Çöçü and S. Özcan. 2005. Somatic embryogenesis in white clover (*Trifolium repens* L.). Periodicum Biologorum 107(1): 101-105..
- Singha, S., B.S., Barker. and S.K. Bhatia.1988. Tissue culture propagation of runing buffalo clover (*Trifolium stoloniferum* Muhl. ex A. eatton). Plant Cell Tissue and Organ Culture 15:9-11.
- Snedecor G.W. and W.G. Cochran. 1967. Statistical Methods. The Iowa State University Pess, Iowa, USA.
- Şahin Demirbağ N., H. Kendir and K.M. Khawar. 2008. *In Vitro* regeneration of Turkish endemic *Trifolium pannonicum* JACQ. Subsp. *Elongatum* (WILLD). Biotechnology & Biotechnological Equipment 22(4):921-924.
- Tubives 2008. Türkiye Bitkileri Veri Servisi <http://www.tubitak.gov.tr/tubives>. (25.9.2008).
- Uranbey, S., C.S. Sevimay and S. Özcan. 2005. Development of high frequency multiple shoot formation in persian clover (*Trifolium resupinatum*). Plant Cell Tissue and Organ Culture 80 (2) :229-232.
- Wang, H. and F.B. Holl. 1988. *In vitro* culture and incidence of. somaclonal variation in regenerated plants of *Trifolium pratense* L. Plant Science 55: 159-167.
- Zhang, D.Y., J. Li, X. Li, Q. Li, D. Y. Zhang, J.M. Li, W. Liix. and Q. S. Li. 1999. Induction of cali and establishment of embryogenic cell suspension culture derived from red clover and white clover. Grassland of China 1: 15-18.
- Zohary, M. 1972. Flora Palastina. 2: *Trifolium*, p. 157-193. Plates 231-276. The Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem.
- Zohary, M. and D. Heller. 1984. The Genus *Trifolium*. The Israel Academy of Sciences and Humanities. 606.

İletişim Adresi :

Nurdan ŞAHİN DEMİRBAĞ
Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Tarla Bitkileri Bölümü, Ankara, Türkiye.
Tel: 0 (312) 596 1639
E-posta: nsahin@agri.ankara.edu.tr