

## Bazı Yaygın Fiğ (*Vicia sativa* L.) Çeşitlerinde Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantlarından Adventif Sürgün Rejenerasyonu\*

Satı ÇÖÇÜ<sup>1</sup> Serkan URANBEY<sup>1</sup> Cengiz SANCAK<sup>1</sup>

Geliş Tarihi: 07.01.2003

**Özet:** Yüksek oranda bir adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek için 8 ayrı fiğ çeşidinde olgunlaşmamış kotiledon ve embriyo eksenleri değişik oranlarda büyüme düzenleyiciler içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Olgunlaşmamış embriyo eksenlerinden en yüksek sürgün rejenerasyonu %95 ile Kubilay çeşidinden 4 mg/l 6-benzilaminopürin (BAP) ve 0.25 mg/l  $\alpha$ -naftalenasetik asit (NAA) içeren besin ortamından elde edilirken; eksplant başına en fazla sürgün 9.47 adet ile Sanelçi çeşidinden 2 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren besin ortamından elde edilmiştir. Olgunlaşmamış kotiledon eksplantlarında ise hiç sürgün rejenerasyonu elde edilememiştir. Gelişen bu sürgünler daha sonra, kesilerek 2.5 mg/l indole-butyric asit (IBA) içeren MS besin ortamında köklendirilmiştir. Son olarak köklenen sürgünler saksılara aktarılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** fiğ, doku kültürü, adventif sürgün rejenerasyonu, olgunlaşmamış embriyo

### Adventitious Shoot Regeneration from Immature Embryo Explants of Some Common Vetch (*Vicia sativa* L.) Cultivars

**Abstract:** Immature embryo axes and immature cotyledons of eight vetch cultivars were cultured on MS medium containing various combinations of growth regulators for adventitious shoot regeneration. The highest frequency of immature embryo axes producing adventitious shoots (95%) was obtained from Kubilay cultivar on a medium containing 4 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP) and 0.25 mg/l  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA); whereas, the highest number of shoots per embryo axis explants (9.47) was achieved from Sanelçi cultivar on a media supplemented with 2 mg/l BAP and 0.25 mg/l NAA. Immature cotyledon explants did not resulted in shoot regeneration. Regenerated shoots (1-2 cm) were excised and rooted in MS medium containing 2.5 mg/l indole-butyric acid (IBA). Rooted plantlets were finally transferred to compost.

**Key Words:** vetch, tissue culture, adventitious shoot regeneration, immature embryo

#### Giriş

Ülkemizde yem bitkileri içerisinde tarımı en yaygın olan bitki türlerinden bir tanesi fiğlerdir. Fiğ türleri içerisinde en fazla yetiştirilen ise yaygın fiğ (*Vicia sativa*)'dir. Yaygın fiğin anavatanı, Akdeniz Havzası ve Batı Asya'dır. Günümüzde; tüm Akdeniz ülkeleri, Orta ve Kuzey Avrupa ülkeleri, Yeni Zelanda, Kuzey ve Güney Amerika, Güney Afrika, Doğu Asya ve Avustralya'da yaygın bir şekilde tarımı yapılmaktadır (Sağlamtimur ve ark. 1990). Ülkemizde Cumhuriyetin ilk yıllarında 19.800 ha ekim alanına sahip olan yaygın fiğ, bugün 235.000 ha ekim alanına ulaşmış olup bu oran yem bitkileri ekim alanının %25'ini oluşturmaktadır (Anonim 1999).

Fiğ, genel olarak kıyı bölgelerimizde yeşil ve kuru ot, iç bölgelerimizde ise dane (= tohum) üretimi amacıyla yetiştirilmektedir. Gerek otu, gerekse tohumu iyi bir hayvan yemidir. Fiğ ince saplı, bol yapraklı ve hayvanların severek yedikleri besin maddelerince zengin ot verir. Çok lezzetli ve besleyici olan fiğ otu, biçim zamanına göre değişmekle birlikte %12-24 oranında ham protein içerir. Bunun yanı sıra, daneleri de %20 civarında protein içerdiğinden çeşitli hayvanların beslenmesinde yoğun yem olarak da kullanılabilir. Ayrıca, tohumlardan arta kalan fiğ samanı da hayvanlar için iyi bir yem olup, yapısında ortalama %5-6 protein içermektedir. Fiğ toprağı fazla yormayan bir bitkidir. Aksine ot veya tohum için yetiştirilen fiğ, bıraktığı

kök ve anız artıkları ile toprağın organik madde miktarını artırırken, köklerinde yaşayan *Rhizobium* bakterileri de havanın serbest azotunu toprağa bağlarlar. Böylece, yetiştirildikleri toprağı azotlu bileşikler yönünden zenginleştirirler. Çiçeklenme döneminde sürülerek toprağı karıştırılan fiğ, sağladığı organik madde ve azot sayesinde ağır toprakları gevşetir, hafif toprakların su tutma kapasitelerini artırır ve toprakların yapısını düzeltir.

Soya (1991) yeşil gübre olarak ekilen fiğin dekara ortalama 400 kg organik madde ve 10 kg saf azot sağladığını saptamıştır.

Geleneksel tahıl-nadas sisteminin uygulandığı kurak bölgelerimizde, tahıl hasadından sonra yeniden tahıl ekimine kadar tarla yaklaşık 15 ay boş kalmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda toprak yapısının uygun olduğu bölgelerde tahıl nadas sisteminde boş bırakılan nadas yılında fiğün saf veya tahıllar ile karışım halinde yetiştirilebileceği saptanmıştır. Böylece nadas yılında hem toprak erozyonu önlenmekte, hem de buğday veriminde bir azalma meydana gelmemektedir. Yıllık yağışı 400 mm'den fazla olan bölgelerde ve taban alanlarda fiğ ekimi ile büyük bir yem üretimi olanağı bulunmaktadır. Kaliteli kaba yem açığının büyük boyutlarda olduğu ülkemizde bu üretimin önemi daha da artmaktadır (Açıkgöz 1991).

\* Yüksek Lisans Tezi'nden hazırlanmıştır

<sup>1</sup> Ankara Üniv. Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Bölümü-Ankara

Bütün bu olumlu tarımsal özelliklerine karşın fiğ türlerinin tarımı tehdit altındadır. Bundan dolayı, hastalık ve zararlılara dayanıklı, yüksek ot ve tohum verimine sahip erkenci çeşitlerin geliştirilmesi son derece önem taşımaktadır. Ancak klasik bitki ıslahı teknikleriyle hastalık ve zararlılara dayanıklılık başta olmak üzere, çeşitlerin diğer birçok tarımsal özelliklerini iyileştirmede önemli sınırlamalarla karşılaşmaktadır (Özcan ve Özgen 1996). Öte yandan, son yıllarda geliştirilen bitki genetik mühendisliği teknikleriyle hastalık ve zararlılara dayanıklı bitki çeşitleri kolaylıkla üretildiği gibi; yüksek verim kalite ve erkencilik yönünden de önemli adımlar atılmıştır. Genetik mühendisliği tekniklerinin bitki ıslahında kullanılabilmesindeki temel gereklilik ise, kültüre alınan bitki doku, organ ve hücrelerinden yüksek oranda bir adventif sürgün rejenerasyonunun elde edilmesidir (Sancak ve ark. 2000).

Bu çalışmanın amacı da; Türkiye'de üretimi yapılan yaygın fiğ çeşitlerinde gen aktarımına uygun yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyonu sağlayan bir yöntemin geliştirilmesidir.

#### Materyal ve Yöntem

Araştırma Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarlarında yürütülmüştür. Bitki materyali olarak Kara elçi (Erzurum L-147), Sarı elçi, Kubilay-82, Ürem-79, Emir, Uludağ, Nilüfer ve Çubuk (Populasyon) yaygın fiğ çeşitleri kullanılmıştır. Baklaların yüzey sterilizasyonu; olgunlaşmamış embriyo eksenleri ve kotiledonların izolasyonu Özcan ve ark. (1993) ile Sancak (1999)'ın arif ettiği gibi yapılmıştır. Tarlada yetiştirilen fiğ çeşitlerinden tam iriliğine ulaşmış, henüz parlak yeşil ve yumuşak tohumları içeren baklalar hasat edilmiştir (Şekil 1a,1b). Hasat edilen baklalar, içerisinde %100'lük ticari çamaşır suyu (ACE) bulunan, 250 ml'lik steril kavanozlar içerisinde 25 dakika süreyle sterilizasyona tabi tutulmuştur. Yüzey sterilizasyonundan sonra baklalar steril saf su ile 4 defa durulanmıştır. Baklalar, bir petri kutusu içerisinde bistüri yardımıyla olgunlaşmamış tohumlara zarar vermeden ortadan boylamasına ikiye ayrılmıştır. Bakladan çıkartılan olgunlaşmamış tohumların tohum kabuğu bistüri yardımıyla açılarak olgunlaşmamış embriyolar izole edilmiştir. Daha sonra, olgunlaşmamış kotiledonların 2/3'lük uç kısmı kesilip atılarak, kalan 1/3'lük kısım embriyo eksenlerinden kopma noktası üste gelecek şekilde katı rejenerasyon ortamına yerleştirilmiştir. Ayrıca, embriyo eksenleri de kotiledonlardan koparıldığı kısım besin ortamına temas edecek şekilde inkübe edilmiştir. Rejenerasyon ortamına 1-2 cm uzunluğuna geldiklerinde kesilerek 0.50-2.50 mg/l IBA içeren MS besin ortamlarında köklendirilmeye alınmış, her magentaya 5 eksplant yerleştirilmiştir.

İzole edilen tüm eksplantlar içerlerinde 35 ml katı rejenerasyon ortamı bulunan petri kutularında (100 x 10 mm) alt kültür yapılmaksızın kültüre alınmıştır. Sürgün veren eksplant yüzdeleri ve eksplant başına sürgün sayıları kültür başlangıcından 8 hafta sonra belirlenmiştir. Çalışmada 6 farklı ortam 8 farklı çeşitte 4 tekerrürlü olarak denenmiştir. Embriyo eksenleri ile yapılan çalışmalarda her

bir tekerrür için 5 eksplant kültüre alınırken; olgunlaşmamış kotiledonlarda ise her bir tekerrürde 10 eksplant kültüre alınmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler bilgisayarda "SPSS for Windows" programı ile tesadüf parsellerinde bölünmüş parseller deneme desenine göre analiz edilmiştir. Muamele ortalamaları MSTAT-C bilgisayar programı kullanılarak Duncan testi ile karşılaştırılmıştır. Köklendirme çalışmaları ise tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Yüzde değerleri istatistik analizi yapılmadan önce "arcsin transformasyon" una tabi tutulmuştur (Snedacor ve Cochran 1967).

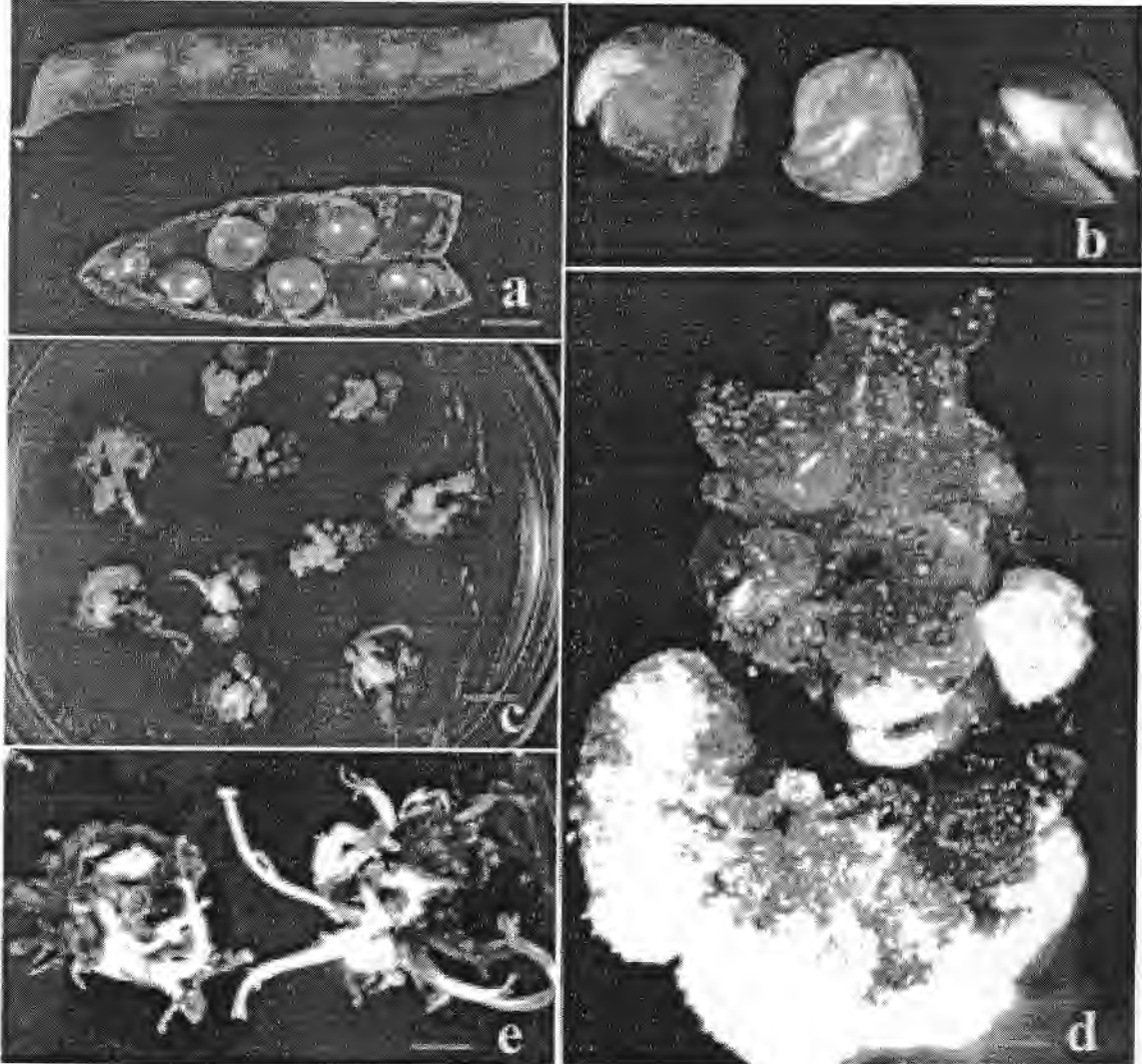
Rejenerasyon ortamı içerisinde MS (Murashige ve Skoog 1962) mineral tuz ve vitaminleri ile %3 sukroz, %0.7 agar, 0.25-4 mg/l 6-benzilaminopurin (BAP) ve 0.25-4 mg/l  $\alpha$ -naftalenasetik asit (NAA) bulunmaktadır. Besin ortamlarının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 121 °C'de 20 dakika tutularak steril edilmiştir. Tüm kültürler beyaz florasan ışığında 16 saat ışık ve 8 saatlik karanlık fotoperiyotta 24 °C'de tutulmuştur.

#### Bulgular ve Tartışma

**Olgunlaşmamış kotiledonlardan adventif sürgün rejenerasyonu:** *In vitro* adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla tarlada gelişen bitkilerden alınan baklalardan izole edilen olgunlaşmamış kotiledon eksplantları değişik oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 3 hafta sonra bütün eksplantlar üzerinde kallus oluşmuş, ancak bu kalluslar üzerinde adventif sürgün uçları gözlenmemiştir (Şekil 1c).

**Olgunlaşmamış embriyo eksenlerinde sürgün rejenerasyonu:** Yüksek oranda bir adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla tarlada gelişen bitkilerden alınan olgunlaşmamış embriyo eksenleri değişik oranlarda büyüme düzenleyiciler içeren ortamlarda kültüre alınmışlardır. Çalışmada BAP ve NAA'nın değişik kombinasyonlarının çeşitlere göre adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi araştırılmıştır. Olgunlaşmamış embriyo eksenlerinde ilk 10 günlük dönemde önceden varolan meristemlerden kuvvetli sürgünler gelişmiştir. Bu sürgünler adventif olmadığından kesilerek uzaklaştırılmıştır. Kültür başlangıcından 10-15 gün sonra sıkı yapılı morfojenik yeşil kalluslar meydana gelmiştir. Üç hafta içerisinde de bu kalluslar üzerinde çok sayıda adventif sürgün uçlarının gelişimi gözlenmiştir (Şekil 1d,e). Ortamların, çeşitlerin ve interaksyonun sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ve eksplant başına sürgün sayısına etkisi 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Çizelge 1'de Farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının fiğ çeşitlerinde olgunlaşmamış embriyo eksenleri eksplantında sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait, Çizelge 2'de ise eksplant başına sürgün sayısına ait değerler görülmektedir. Çizelgelerden de anlaşılacağı üzere farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının çeşitlere göre sürgün gelişimine etkisinde önemli farklılık gözlenmiştir ( $p < 0.01$ ).

Olgunlaşmamış embriyo eksenleri eksplantında sürgün oluşturan eksplant yüzdesi en fazla Çubuk çeşidinde



Şekil 1. Yaygın fiğde olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından kallus oluşumu ve adventif sürgün rejenerasyonu (a, b) adventif sürgün rejenerasyonu için kültüre alınan fiğ bakla, olgunlaşmamış kotiledon ve embriyo eksen (bar=5mm, 2mm) (c) kültür başlangıcından 5 hafta sonra olgunlaşmamış kotiledon eksplantları (bar=7mm) (d, e) Kubilay çeşidinde olgunlaşmamış embriyo eksen eksplantında kallus oluşumu ve adventif sürgün rejenerasyonu (bar=1.5mm, 6mm)

Çizelge 1. Farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının değişik fiğ çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo eksenlerinden adventif sürgün oluşum oranına etkisi

Büyüme düzenleyicileri (mg/l)		Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%)								
BAP	NAA	Çeşitler								
		Çubuk	Uludağ	Nilüfer	Ürem	Emir	Kubilay	Sarıelçi	K. elçi	Ortam. Ort.
0.25	2	0.0 <sup>a</sup> B	0.0 <sup>b</sup> B	0.0 <sup>b</sup> B	0.0 <sup>d</sup> B	35.0 <sup>bc</sup> A	50.0 <sup>d</sup> A	0.0 <sup>b</sup> B	0.0 <sup>a</sup> B	10.62
0.25	4	0.0 C	0.0 <sup>b</sup> C	0.0 <sup>d</sup> C	20.0 <sup>bc</sup> B	25.0 <sup>bc</sup> B	50.0 <sup>d</sup> A	0.0 <sup>b</sup> C	0.0 C	11.87
1	2	0.0 C	40.0 <sup>a</sup> A	50.0 <sup>a</sup> A	50.0 <sup>a</sup> A	20.0 <sup>c</sup> B	15.0 <sup>c</sup> B	30.0 <sup>a</sup> AB	0.0 C	25.62
2	0.25	10.0 BC	5.0 <sup>b</sup> BC	45.0 <sup>a</sup> A	15.0 <sup>cd</sup> B	40.0 <sup>abc</sup> A	35.0 <sup>bc</sup> A	55.0 <sup>a</sup> A	0.0 C	25.62
2	1	0.0 C	5.0 <sup>b</sup> C	25.0 <sup>a</sup> B	0.0 <sup>d</sup> C	55.0 <sup>ab</sup> A	50.0 <sup>d</sup> A	35.0 <sup>a</sup> AB	0.0 C	21.25
4	0.25	0.0 D	10.0 <sup>d</sup> D	35.0 <sup>a</sup> C	45.0 <sup>ab</sup> BC	65.0 <sup>a</sup> B	95.0 <sup>a</sup> A	50.0 <sup>a</sup> BC	0.0 D	37.50
Çeşit. Ort.		1.66	10.00	25.83	21.66	40.00	49.16	28.33	0.0	—

Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark p<0.05 düzeyinde önemlidir

Aynı satırda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark p<0.05 düzeyinde önemlidir

∓: aynı sütun içerisinde farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır

Çizelge 2. Farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının değişik fiğ çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo eksenlerinden adventif sürgün sayısına etkisi

Büyüme düzenleyicileri (mg/l)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)								
		Çeşitler								
BAP	NAA	Çubuk	Uludağ	Nilüfer	Ürem	Emir	Kubilay	Sarıelçi	K. elçi	Ortam. Ort.
0.25	2	0.00 <sup>a</sup> B	0.00 <sup>b</sup> B	0.00 <sup>b</sup> B	0.00 <sup>b</sup> B	1.66 <sup>a</sup> B	4.00 <sup>ab</sup> A	0.00 <sup>c</sup> B	0.00 <sup>a</sup> B	0.71
0.25	4	0.00 B	0.00 <sup>b</sup> B	0.00 <sup>b</sup> B	1.88 <sup>bc</sup> AB	2.26 AB	3.33 <sup>abc</sup> A	0.00 <sup>b</sup> B	0.00 B	0.93
1	2	0.00 D	6.03 <sup>a</sup> A	4.26 <sup>a</sup> AB	5.93 <sup>a</sup> A	2.88 BC	1.50 <sup>c</sup> CD	3.83 <sup>a</sup> AB	0.00 D	3.05
2	0.25	1.00 CD	1.50 <sup>b</sup> BCD	3.56 <sup>b</sup> B	1.26 <sup>c</sup> CD	3.08 BC	2.57 <sup>bc</sup> BC	9.47 <sup>a</sup> A	0.00 D	2.80
2	1	0.00 C	0.50 <sup>c</sup> C	3.63 <sup>b</sup> B	0.00 <sup>c</sup> C	3.27 B	3.56 <sup>abc</sup> B	5.88 <sup>a</sup> A	0.00 C	2.10
4	0.25	0.00 C	1.50 <sup>b</sup> BC	2.88 <sup>b</sup> B	3.66 <sup>a</sup> AB	2.13 BC	5.56 <sup>a</sup> A	5.10 <sup>a</sup> A	0.00 C	2.60
Çeşit. Ort.		0.17	1.59	2.39	2.12	2.54	3.42	4.04	0.00	-

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

Aynı satırda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark  $p < 0.05$  düzeyinde önemlidir

\*: aynı sütun içerisinde farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır

(% 10.00) 2 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA, Uludağ, Nilüfer ve Ürem çeşitlerinde (sırasıyla % 40.00, % 50.000 ve % 50.00) 1 mg/l BAP ve 2 mg/l NAA, Emir, Kubilay ve Sarıelçi çeşitlerinde (sırasıyla % 65.00, % 95.00 ve % 50.00) ise 4 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarından elde edilmiştir. Eksplant başına en fazla sürgün sayısı ise Çubuk çeşidinde (1 adet) 2 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA, Uludağ (6.03 adet), Nilüfer (4.26 adet) ve Ürem (5.93 adet) çeşitlerinde 1 mg/l BAP ve 2 mg/l NAA, Emir çeşidinde (3.27 adet) 2 mg/l BAP ve 1 mg/l NAA, Kubilay çeşidinde (5.56 adet) 4 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA, Sarıelçi çeşidinde (9.47 adet) ise 2 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir.

Tarımsal öneme sahip genlerin gen aktarım teknikleri ile bitkilere aktarılabilmesi için etkili adventif sürgün rejenerasyon yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Gen aktarımı yapılan hücrelerden transgenik bitkiler rejenera edilmedikçe, o gen aktarımının hiçbir önemi olmamaktadır. Yaygın fiğın olgunlaşmamış embriyo eksplantlarında daha önce sürgün rejenerasyonu bildirilmemiştir. Öte yandan, önceki çalışmalarda soya (Lazzeri ve ark. 1987), bezelye (Özcan ve ark. 1993), korunga (Özcan ve ark. 1996), koca fiğ (Sancak 1999) ve Macar fiği (Sancak ve ark. 2000) gibi baklagillerin olgunlaşmamış kotiledon ve embriyo eksenlerinden yüksek oranlarda adventif sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Bütün bu çalışmalar baklagillerde olgunlaşmamış embriyo eksplantlarının rejenerasyon için iyi bir başlangıç materyali olduğunu göstermektedir.

Sekiz ayrı fiğ çeşidinde yapılan bu çalışmada olgunlaşmamış kotiledonlardan tüm ortamlarda % 100 kallus oluşumu elde edilirken, bu kalluslardan sürgün gelişimi elde edilememiştir. Olgunlaşmamış embriyo eksenini eksplantında ise Karıelçi çeşidi hariç diğer çeşitlerde sürgün gelişimi elde edilmiştir. Natali ve Cavallini (1987), bezelyede yaptıkları çalışmada sürgün rejenerasyonunu en fazla etkileyen faktörün eksplant tipi ve genotip olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada olgunlaşmamış kotiledon eksplantında denemeye alınan 5 farklı bezelye genotipinden sadece 5075 hattında 2 mg/l

BAP ve 2 mg/l NAA içeren besin ortamından sürgün rejenerasyonu elde etmişler, diğer çeşit ve ortamlarda sürgün rejenerasyonu elde edememişlerdir. Olgunlaşmamış embriyo eksenini eksplantında ise 0.5 mg/l BAP ve 3 mg/l NAA içeren ortamda 5 genotipte de sürgün rejenerasyonu elde edilemezken, 2 mg/l BAP ve 2 mg/l NAA içeren besin ortamında ise tüm genotiplerde sürgün rejenerasyonu elde etmişler, 3 mg/l BAP ve 5 mg/l NAA içeren ortamda ise sadece 5075, Dolce Provenza ve Espresso Generoso çeşitlerinde sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. Aynı türe ait çeşitler arasında adventif sürgün rejenerasyonu bakımından büyük farklar olduğu diğer birçok araştırmacı tarafından da belirtilmiştir (Hughes 1981, Albertch ve Kohlenbach 1989, Matheson ve ark. 1990, Mirici 2000).

*In vitro* çalışmalarda, adventif sürgün rejenerasyonunu en fazla etkileyen faktörlerden bir tanesi de ortamda bulunan bitki büyümesini düzenleyiciler olduğu ve besin ortamındaki oksin-sitokinin dengesinin iyi ayarlanması neticesinde yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyonunun elde edilebileceği değişik araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Özcan ve ark. 1993, Özcan ve ark. 1996, Sancak 1999). Benzer sonuçlar bu çalışmada da elde edilmiştir.

**Köklenme:** Rejenera olan sürgünler 1-2 cm uzunluğuna geldiklerinde kesilerek 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 ve 2.50 mg/l IBA içeren MS besin ortamlarında köklendirilmeye alınmıştır. Kültür başlangıcından üç hafta sonra kök oluşturan sürgün oranı, sürgün başına kök sayısı kaydedilmiştir. Kök oluşturan sürgün oranı ve sürgün başına kök sayısında kullanılan ortamlar arasında farklılık gözlenmiştir (Çizelge 3;  $p < 0.01$ ). En yüksek köklenme oranı % 100.00 ile 2.5 mg/l IBA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Bununla birlikte % 80.00 ile 2 mg/l IBA içeren MS besin ortamından elde edilen değer ile arasındaki fark istatistiksel açıdan önemsiz çıkmıştır. Sürgün başına en fazla kök sayısı 4.40 adet ile 2.5 mg/l IBA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Köklenen sürgünler daha sonra saksılara aktararak serada geliştirilmiştir.

Çizelge 3. Farklı IBA konsantrasyonlarının Kubilay çeşidinden elde edilen adventif sürgünlerin köklenmesi üzerine etkisi

IBA Dozları (mg/l)	Kök oluşturan sürgün oranı (%)	Sürgün başına kök sayısı (adet)
0.5	53.33 b*	1.55 c
1	73.33 b	2.33 bc
1.50	46.66 b	2.08 bc
2	80.00 ab	2.73 b
2.5	100.00 a	4.40 a

\*: aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark p<0.05 düzeyinde önemlidir

Farklı bitki türlerinin en iyi köklendiği büyüme düzenleyicisi farklı olabilmektedir. Önceki çalışmalarda mercimek 0.25 mg/l IBA (Khawar ve Özcan 2002), Macar fiği 5 µM IBA (Sancak ve ark. 2000), korunga 1 mg/l IBA veya 1 mg/l NAA (Özcan ve ark. 1996), çilek üçgülü 1-4 mg/l IAA (Singha ve ark. 1988), Nohut 1 µM IBA ve Bezelye ise 2 mg/l IAA içeren besin ortamında (Hussey ve Gunn 1984) en iyi köklenme göstermiştir. Bu çalışmada ise en iyi köklenme 2.5 mg/l IBA içeren besin ortamından elde edilmiştir.

## Sonuç

Optimize edilmiş bir rejenerasyon sistemine sahip olmayan bir türde transformasyon yapmanın fazla bir anlamı olmadığından ve bütün bitki türleri için evrensel bir rejenerasyon protokolü olmayışı nedeniyle her bitki türü hatta her bitki çeşidi için spesifik bir sistemin belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle, bu çalışma ile ülke tarımı için son derece önemli olan fiğ çeşitlerinde gen aktarımına uygun bir adventif sürgün rejenerasyonu sistemi geliştirilmiş ve çeşitlere göre değişmekle beraber %0-95.00 arasında bir rejenerasyon frekansı yakalanmış ve elde edilen sürgünler köklendirilerek saksılara aktarılmıştır. Araştırma sonuçlarımıza göre, en yüksek rejenerasyonu incelenen 8 farklı fiğ çeşidinden Kubilay çeşidi, en düşük rejenerasyonu ise Karaelçi çeşidi vermiştir. Buna dayanarak Kubilay çeşidinin rejenerasyon kapasitesinin diğer çeşitlerden daha yüksek olduğu ve transformasyon çalışmalarında bu çeşidin kullanılabileceği sonucuna varılabilir. Bundan sonraki amacımız ise *Agrobacterium tumefaciens* veya diğer gen aktarımı teknikleriyle transgenik fiğ bitkilerinin elde edilmesidir.

## Teşekkür

Bu çalışma 98K120640 kodlu DPT Tarımsal Biyoteknoloji AR-GE Merkezi Projesi tarafından desteklenmiştir.

## Kaynaklar

- Açıkgöz, E. 1991. Yem Bitkileri. Uludağ Üniv. Yay. No:7-025-0210, Bursa.
- Albrecht, C. and H. W. Kohlenbach, 1989. Induction of somatic embryogenesis in leaf-derived callus of *Vicia narbonensis* L., Plant Cell Rep., 8, 267-269.

- Anonim, 1999. Devlet İstatistik Enstitüsü, Başbakanlık. Ankara.
- Hughes, K. W. 1981. Ornamental Species, pp 5-50. In: Cloning Agricultural Plants Via *In Vitro* Techniques, Conger, B. V. (ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Hussey, G. and H. V. Gunn, 1984. Plant production in pea (*Pisum sativum* L. cvs. Puget and Upton) from long-term callus with superficial meristems. Plant Sci. Let., 37, 143-148.
- Khawar, M. K. and S. Özcan, 2002. Effect of indole-3-butyric acid on *in vitro* root development in lentil (*Lens culinaris* Medik.). Turk J. Bot., 26, 109-111.
- Lazzeri, P. A., D. F. Hildebrand, G. B. Collins, 1987. Soybean somatic embryogenesis: Effects of hormones and culture manipulations. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 10 (197-208)
- Matheson, S. L., J. Nowak and L. N. MacLean, 1990. Selection of regenerative genotypes from highly productive cultivars of alfalfa *Euphytica*, 45, 105-112.
- Mirici, S. 2000. Kolza (*Brassica napus* L. ssp. *Oleifera*) Bitkisinde Adventif Sürgün Rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı. Doktora Tezi, Gazi Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant., 15, 473-497.
- Natali, L. and A. Cavallini, 1987. Regeneration of pea (*Pisum sativum* L.) plantlets by *in vitro* culture of immature embryos. Plant Breed., 99,172-176.
- Singha, S., B. S. Baker and S. K. Bhatia, 1988. Tissue culture propagation of running buffalo clover (*Trifolium stoloniferum* Muhl. ex A. Eatton). Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 15, 9-11.
- Özcan, S., M. Barghchi, S. Firek and J. Draper, 1993. Efficient adventitious shoot regeneration and somatic embryogenesis in pea. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 11, 44-47.
- Özcan, S. ve M. Özgen, 1996. Bitki genetik mühendisliği. Kükem Dergisi, 1, 69-95.
- Özcan, S., C. S. Sevimay, M. Yıldız, C. Sancak and M. Özgen, 1996. Prolific shoot regeneration from immature embriyo explants of sainfoin (*Onobrychis vicifolia* Scop.), Plant Cell Rep., 16, 200-203.
- Sağlamtımur, T., V. Tansı, H. Baytekin, 1990. Yem Bitkileri Yetiştirme. Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Ders Kitabı No: 74. Adana.
- Sancak, C. 1999. Koca fiğ (*Vicia narbonensis* L.)'in olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu, Gazi Eğitim Fak. Dergisi, 19, 25-33.
- Sancak, C., S. Mirici and S. Özcan, 2000. High frequency shoot regeneration from immature embriyo explants of Hungarian vetch, Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 61, 231-235.
- Snedecor, G. W. and W. G. Cochran, 1967. Statistical Methods, The Iowa State University Press, Iowa, USA.
- Soya, H. 1991. Fiğ Kültürü. TYVAP Ege Marmara Dilimi Tarla Bitkileri ABAV Toplantısı, 24-26. 10. 1991- Ege Tar. Araş. Enst. Menemen, İzmir.

İletişim adresi:

Cengiz SANCAK  
Ankara Üniv. Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Bölümü-Ankara  
Tel:0 312 317 05 50/1618  
Fax: 0 312 318 26 66  
E-mail: sancak@agri.ankara.edu.tr.