

Bazı Burçak Hatlarında (*Vicia ervilia* (L.) Wild.) Kotiledon Boğum Eksplantından Adventif Sürgün Rejenerasyonu*

Yılmaz ERDOĞAN¹ Satı ÇÖÇÜ² İskender PARMAKSIZ² Cengiz SANCAK² Orhan ARSLAN¹

Geliş Tarihi: 05.11.2003

Özet: Çalışmada Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden temin edilen 6 farklı burçak hattı kullanılmıştır. Tohumlar MS besiyerinde çimlendirilmiş ve 4-5 gün sonra gelişen bitkilerden kotiledon boğum eksplantları izole edilerek değişik oranlarda Thidiazuron (TDZ) veya 6-benzilaminopürin (BAP) ve α -naftalenasetik asit (NAA) içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Eksplant başına en fazla sürgün sayısı 15.7 adet ile 7 numaralı hattan 4 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren besin ortamından elde edilmiştir. Gelişen bu sürgünler daha sonra değişik oranlarda indol-3-bütirik asit (IBA) içeren MS ortamında köklendirmeye alınmıştır. 7 hafta sonra en yüksek köklenme oranı (%100) ve sürgün başına ortalama kök sayısı (6 adet) 2 mg/l IBA içeren ortamdan elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: burçak, kotiledon boğum, adventif sürgün rejenerasyonu, doku kültürü

Adventitious Shoot Regeneration from Cotyledon Node Explants of Some Bitter Vetch (*Vicia ervilia* (L.) Wild.) Lines.

Abstract: Six lines of bitter vetch obtained from Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, University of Ankara were used in the study. Seeds were germinated on MS medium and cotyledon nodes isolated from 4-5 days' seedlings were cultured on MS media supplemented with various concentrations of Thidiazuron (TDZ) or 6-benzilaminopurine (BAP) and α -naftalenasetic acid (NAA). The highest number of shoots per cotyledon node explant (15.7) was achieved from line 7 on a media containing 4 mg/l BAP and 0.25 mg/l NAA. Regenerated shoots were excised and rooted on MS medium containing various concentrations of indole-3-butyric acid (IBA). The highest rooting percentage (100%) and mean number of roots per shoot (6) were obtained on a media supplemented with 2 mg/l IBA.

Key Words: bitter vetch, cotyledon node, adventitious shoot regeneration, tissue culture

Giriş

Hayvan varlığımızın ihtiyacı olan yemin önemli bir kısmı doğal yem kaynaklarımız olan çayır ve meralarımız ile tarla arazisinde yetiştirilen yem bitkilerinden sağlanmaktadır. Özellikle kurak bölgelerimizde doğal yem kaynaklarımızın verimlerinin çok düşük olması, tarla arazisinde yetiştirilen yem bitkileri kültürünün önemini daha da artırmaktadır (Ekiz, 1988). Ülkemizde kurak alanlarda, tek yıllık tane baklagil yem bitkisi olarak birkaç bitki türünün kültürü yapılmaktadır. Kurak şartlarda başarıyla yetiştirilen yıllık baklagil tane yem bitkilerinden birisi burçaktır. Diğer kültür bitkilerinin ekonomik olarak tarımının yapılamadığı alanlarda, kireççe fakir topraklarda, taşlı, yamaç tarlalarda burçak tarımı yapılabilmektedir. Köklerindeki *Rhizobium sp.* bakterilerinin yardımı ile havadaki serbest azotu toprağa aktararak toprağın verim gücünü yükseltmesi, bu bitkinin ekim nöbetindeki önemini arttırmaktadır. Ancak, kültüründeki güçlükler nedeniyle ekim alanı son yıllarda gittikçe azalma göstermiştir. Kurağa dayanıklı olan burçak bitkisi ile yapılacak ıslah çalışmaları ile yüksek verimli ve ekonomik çeşitlerin geliştirilmesi gerekmektedir. 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 doku kültürü ve bitki genetik mühendisliği teknikleriyle hastalık ve zararlılara dayanıklı bitki çeşitleri kolaylıkla üretildiği gibi; yüksek verim kalite ve erkencilik yönünden de önemli adımlar atılmıştır. Ancak gen aktarımı, somaklonal varyasyon ve *in vitro* mutasyon çalışmaları ile istenilen özelliğe sahip bireylerin elde edilebilmesi için öncelikle doku kültürü yöntemleriyle etkili bir adventif sürgün rejenerasyonu sisteminin kurulması gerekmektedir.

Bu amaçla bu araştırmada ülkemiz tarımı için önemli bir yem bitkisi olan burçakta adventif sürgün rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi ve rejeneren olan bitkiciklerin köklendirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Araştırma Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan burçak bitkisinin 7, 8, 9, 10, 11 ve 12 numaralı burçak hatlarına ait tohumlar Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Hayrettin EKİZ'den temin edilmiştir.

* Yüksek Lisans Tezi'nden hazırlanmıştır.

¹ Gazi Üniv. Eğitim Fak. Biyoloji Bölümü-Ankara

² Ankara Üniv. Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Bölümü-Ankara

Tohumlar, yüzey sterilizasyonu için % 50'lik ticari çamaşır suyunda (Axion) 25 dakika tutulduktan sonra 4 defa 5'er dakika süreyle steril su ile durulanmıştır. Steril edilen tohumlar yine steril petri kapları içerisinde %3 sukroz içeren ve %0,8 agar ile katılaştırılan MS (Murashige ve Skoog 1962) besin ortamında 24° C'de 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda çimlendirilmiştir. Her petri kabına 15 adet tohum konulmuştur. Tohumlar kültüre alındıktan 2 gün sonra çimlenmeye başlamıştır. Kültür başlangıcından 4-5 gün sonra ise gelişen fideliklerin sürgün ucu, kök tacı ve kotiledonları kesilerek kotiledon boğum eksplantları izole edilmiştir. İzole edilen kotiledon boğumlar daha sonra %3 şeker, %0,8 agar ve farklı oranlarda TDZ (Thidiazuron) veya 6-benzilaminopurin (BAP) veya α -naftalenasetik asit (NAA) içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır.

Kotiledon boğumlardan gelişen sürgünler 10-20 mm uzunluğa geldiklerinde kesilerek değişik oranlarda indole-3-butyric asit (IBA) içeren steril cam kavanozlar içinde köklendirmeye alınmıştır. Burada köklenen sürgünler son olarak iklim odasında saksılar içerisinde yüksek nemde (% 90) 7-10 gün tutularak bitkiciğin hem ortam şartlarına uyum sağlaması, hem de kök sisteminin gelişmesi sağlanmıştır.

Ortam hazırlığında çift distile saf su kullanılmış olup, besin ortamının 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 sterilizasyon sağlanmıştır. 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 tutulmuşlardır.

Kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait denemeler herbirinin içerisinde 8 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. Muamele ortalamaları MSTAT-C bilgisayar programı kullanılarak Duncan testi ile karşılaştırılmıştır. Köklendirme çalışmaları ise herbirinin içerisinde 3 adet sürgünün kültüre alındığı kültür kavanozlarında 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Yüzde değerleri istatistik analizi yapılmadan önce "arcsin transformasyon" una tabi tutulmuştur (Snedecor ve Cochran 1967).

Bulgular ve Tartışma

Yüksek oranda bir adventif sürgün rejenerasyon sistemi geliştirmek için burçak bitkisine ait kotiledon boğum eksplantları değişik oranlarda büyüme düzenleyiciler içeren ortamlarda kültüre alınmışlardır. Çalışmada TDZ veya BAP ve NAA' in değişik kombinasyonlarının hatlara göre adventif sürgün

rejenerasyonuna etkisi araştırılmıştır. Kültür başlangıcından yaklaşık 15-20 gün sonra sıkı yapılı morfogenezik yeşil kallus gelişimi gözlenmiştir. Bu kallus üzerinde daha sonra çok sayıda adventif sürgün uçları gelişmiştir (Şekil 1 a,b).

Kotiledon boğum eksplantında sürgün rejenerasyonu: Varyans analizi sonucunda sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ve eksplant başına sürgün sayısına büyüme düzenleyiciler ve burçak hatlarının etkisi ile büyümeyi düzenleyici x hat interaksyonunun etkisi 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Çizelge 1'de Farklı BAP ve NAA konsantrasyonları ile TDZ'nin burçak hatlarının kotiledon boğum eksplantında sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait değerler, Çizelge 2'de ise eksplant başına sürgün sayısına ait değerler verilmektedir. Çizelgelerden de anlaşılacağı üzere yapılan Duncan testi sonucunda farklı BAP ve NAA ile TDZ konsantrasyonlarının hatlara göre sürgün gelişimine etkisinde önemli farklılık gözlenmiştir ($P \leq 0.01$).

Kotiledon boğum eksplantında hatlara göre en fazla sürgün oluşturan eksplant yüzdesi 7. ve 12. hatlarda değişik oranlarda TDZ (%100), 8. hatta 1 mg/l BAP ve 0.25 mg/l veya 0.50 mg/l NAA (%100), 9. hatta 0,50 mg/l TDZ (%96), 10 hatta 1 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA ile 2 mg/l BAP ve 0.50 mg/l NAA (%96) ve 11. hatta ise 2 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA (%87.66) içeren ortamlardan elde edilmiştir (Çizelge 1).

Hatlara göre eksplant başına en fazla sürgün sayısı 7. hatta 15,7 adet ile 4 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA, 8. hatta 4,7 adet ile 2 mg/l BAP ve 0.50 mg/l NAA ile 4 mg/l BAP ve 0.50 mg/l NAA, 9. hatta 8 adet ile 4 mg/l BAP ve 0.50 mg/l NAA, 10. hatta 6,7 adet ile 2 mg/l BAP ve 0.50 mg/l NAA, 11 ve 12 numaralı hatlarda ise 9,7 ve 14 adet ile 1 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren ortamlardan elde edilmiştir. Hatlar kendi aralarında değerlendirildiğinde, genel olarak 7. hattın rejenerasyon kapasitesi diğerlerinden daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 2). Burçak ıslahında doku kültürü tekniklerinden yararlanabilmek için öncelikle etkili adventif sürgün rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi gerekmektedir. Burçak bitkisinde daha önceden olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından sürgün rejenerasyonu bildirilmesine rağmen, bu tip eksplantların belirli dönemlerde elde edilebilmesi laboratuvar çalışmalarını sınırlandırmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada her zaman elde edilebilecek bir eksplant olan kotiledon boğum eksplantı kullanılmıştır. Burçakta daha önce kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonu bildirilmemiştir. Öte yandan mercimek (Khawar ve Özcan 2002), nohut (Polisetty ve ark. 1997), bezelye (Jackson ve Hobbs 1990) ve bakla (Khalafalla ve Hattori 1999) gibi baklagillerin kotiledon boğumlarından yüksek oranlarda adventif sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Bütün bu çalışmalar baklagillerde kotiledon boğum eksplantının rejenerasyon için iyi bir başlangıç materyali olduğunu göstermektedir.

Çizelge 1. Farklı BAP ve NAA ile TDZ konsantrasyonlarının değişik burçak hatlarının kotiledon boğum eksplantlarından adventif sürgün oluşum oranına etkisi

Büyüme düzenleyicileri (mg/l)			Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%)						
BAP	NAA	TDZ	7. HAT	8. HAT	9. HAT	10. HAT	11.HAT	12.HAT	Ortam. Ort.
1	0.25	-	87.66 ^{ab} AB	100.00 ^a A	92.00 ^{ab} AB	96.00 ^a AB	83.66 ^{ab} BC	58.83 ^b C	86.27
1	0.50	-	79.66 ^b BC	100.00 ^a A	75.33 ^{ab} BC	91.66 ^a AB	66.66 ^{abc} C	50.33 ^b C	77.27
2	0.25	-	82.00 ^{ab} *	83.66 ^{ab}	87.66 ^{ab}	83.33 ^{ab}	87.66 ^a	71.00 ^b	82.55
2	0.50	-	87.66 ^{ab} A	91.66 ^a A	92.00 ^{ab} A	96.00 ^a A	83.66 ^{ab} A	58.33 ^b B	84.88
4	0.25	-	79.33 ^{ab} AB	88.00 ^{ab} AB	83.66 ^{ab} AB	91.66 ^a A	88.00 ^a AB	67.00 ^b B	82.94
4	0.50	-	68.00 ^b AB	88.00 ^{ab} A	62.66 ^b AB	54.33 ^{bc} AB	54.33 ^{bc} AB	38.00 ^b A	60.88
-	-	0.25	100.00 ^a A	25.30 ^c C	71.00 ^b B	50.33 ^c BC	54.33 ^{bc} BC	96.00 ^a A	66.16
-	-	0.50	100.00 ^a A	42.00 ^c B	96.00 ^a A	50.00 ^c B	66.66 ^{abc} B	100.00 ^a A	75.77
-	-	0.75	100.00 ^a A	46.00 ^c C	92.00 ^{ab} AB	79.33 ^{abc} BC	46.00 ^c C	100.00 ^a A	77.22
-	-	1.25	100.00 ^a A	58.66 ^{bc} B	79.33 ^{ab} B	62.66 ^{bc} B	75.00 ^{abc} B	100.00 ^a A	79.27
Çeşitlerin Ort.			88.43	72.33	83.16	75.53	70.60	73.90	

Aynı sütunda farklı küçük ve aynı satırda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

*: Aynı satır içerisinde farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Çizelge 2. Farklı BAP ve NAA ile TDZ konsantrasyonlarının değişik burçak hatlarının kotiledon boğum eksplantlarında gelişen adventif sürgün sayısına etkisi

Büyüme düzenleyicileri (mg/l)			Eksplant başına sürgün sayısı (adet)						
BAP	NAA	TDZ	7. HAT	8. HAT	9. HAT	10. HAT	11. HAT	12. HAT	Ortam. Ort.
1	0.25	-	11.0 ^b B	3.3 [*] E	7.3 ^{ab} CD	4.7 ^{abcd} DE	9.7 ^a BC	14.0 ^a A	8.33
1	0.50	-	10.3 ^b A	2.7 ^C	4.3 ^{bcd} BC	4.7 ^{abcd} BC	4.3 ^{bcd} BC	6.3 ^{cd} B	5.44
2	0.25	-	14.0 ^a A	3.3 ^C	7.7 ^a B	3.7 ^{abcd} C	6.7 ^b B	3.3 ^{de} C	6.44
2	0.50	-	10.3 ^b A	4.7 ^{BC}	5.3 ^{abc} B	6.7 ^a B	2.3 ^{cd} CD	1.0 ^e D	5.05
4	0.25	-	15.7 ^a A	3.0 ^C	5.0 ^{abcd} BC	6.3 ^{ab} B	4.3 ^{bcd} BC	4.0 ^{de} BC	6.38
4	0.50	-	8.7 ^{bc} A	4.7 ^B	8.0 ^a A	4.3 ^{abcd} B	2.0 ^d B	1.7 ^e B	4.88
-	-	0.25	7.0 ^c A	2.3 ^B	2.3 ^{cd} B	3.0 ^{cd} B	4.3 ^{bcd} AB	5.3 ^d AB	4.05
-	-	0.50	14.0 ^a A	1.7 ^C	3.7 ^{cd} C	2.7 ^d C	3.3 ^{cd} C	9.0 ^{bc} B	5.72
-	-	0.75	14.3 ^a A	2.7 ^{CD}	2.0 ^d D	3.3 ^{bcd} CD	5.3 ^{bc} C	10.3 ^b B	6.33
-	-	1.25	15.0 ^a A	2.3 ^D	3.3 ^{cd} CD	6.0 ^{abc} C	5.0 ^{bcd} CD	11.7 ^{ab} B	7.22
Çeşitlerin Ort.			12.0	3.1	4.9	4.53	4.73	6.66	

Aynı sütunda farklı küçük ve aynı satırda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

*: Aynı sütun içerisinde farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.



Şekil 1. Burçakta kotiledon boğum eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve *in vitro* köklenme.

(a, b) Kültür başlangıcından 5-6 hafta sonra kotiledon boğum eksplantlarında kallus ve sürgün oluşumu (bar=4mm; 6mm).

(c) Gelişen sürgünlerin IBA içeren ortamda köklendirilmesi (bar=8mm)

Altı farklı burçak hattı ile yapılan bu çalışmada kotiledon boğum eksplantında öncelikle kallus oluşumu ve bu kalluslardan da sürgün oluşumu elde edilmiştir. *In vitro* çalışmalarda, adventif sürgün rejenerasyonunu en fazla etkileyen faktörlerin başında ortamda bulunan bitki büyüme düzenleyicilerinin 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, Uranbey ve ark. 2003). Özgen ve ark. (1997), yoncada yaptıkları çalışmada en fazla sürgünü BAP ve NAA; Sancak (1999), korungada yaptığı çalışmada en fazla sürgünü BAP ve IBA içeren ortamlardan; Barna ve Wakhlu (1994) nohutta yaptıkları çalışmada gövde dokularının en alt kısımlarından alınan eksplantlar için en iyi ortamın BAP ve NAA içeren ortamlar olduğunu bildirmişlerdir. TDZ'nin ise *in vitro* kültürde sitokinin kaynağı olarak kullanılan ve sürgün rejenerasyonunu teşvik eden önemli bir büyümeyi düzenleyici olduğu ve TDZ oranının uygun bir biçimde ayarlanması ile sürgün rejenerasyonunun 8-10 kat artabileceği değişik araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Thomas ve Katterman 1986, Böhmer ve ark. 1995, Hasokawa ve ark. 1996). Bu çalışmada kullanılan TDZ konsantrasyonları hatlara göre değişmekle birlikte sürgün rejenerasyonunu artırmıştır. Ayrıca, Natali ve Cavallini (1987) bezelyede, Polisetty ve ark. (1997) nohutta yaptıkları çalışmada sürgün rejenerasyonunu etkileyen faktörlerden bir diğerinin ise genotip olduğunu ve her bitki çeşidi için kullanılan büyüme düzenleyici konsantrasyonlarının ayarlanması gerektiğini bildirmişlerdir.

Daha iyi gelişme gösterdiğinden dolayı, 7 numaralı hatta ait sürgünler 10-20 mm uzunluğuna geldiklerinde kesilerek değişik oranlarda IBA içeren MS besin ortamlarında köklendirilmeye alınmıştır. Kültür başlangıcından yaklaşık 7 hafta sonra kök oluşturan sürgün oranı, sürgün başına kök sayısı kaydedilmiştir (Şekil 1c). Ortamlar arasında kök oluşturan sürgün oranı bakımından istatistiksel açıdan bir farklılık gözlenmezken, sürgün başına kök sayısında önemli farklılık gözlenmiştir (Çizelge 3, $P \leq 0.01$).

Çizelge 3. Farklı IBA konsantrasyonlarının 7. hattan elde edilen adventif sürgünlerin köklenmesi üzerine etkisi

IBA Dozları (mg/l)	Kök oluşturan sürgün oranı (%)	Sürgün başına kök sayısı (adet)
0,50	69.33 *	5.33 ab
1.00	78.00	3.00 abc
1,50	55.66	2.67 abc
1,75	66.66	1.67 c
2.00	100.00	6.00 a
2,25	55.33	2.33 bc
2,50	55.66	2.00 bc
5.00	100.00	4.33 abc

Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $P \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

*: Aynı sütun içerisinde farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

En yüksek köklenme oranı % 100 ile 2 ve 5 mg/l IBA içeren MS besin ortamından elde edilmiş ve bu ortamlar ile diğer ortamlardan elde edilen değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemsiz çıkmıştır. Sürgün başına en fazla kök sayısı 6.00 adet ile 2 mg/l IBA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Köklenen sürgünler daha sonra saksılara aktararak serada geliştirilmiştir. IBA'nın köklendirme için uygun bir oksin olduğu diğer araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Khawar ve Özcan 2002, Sancak 2000, Özcan ve ark. 1996).

Bugün bitki biyoteknolojisi klasik ıslah yöntemlerine ek olarak bitki ıslahına yeni ufuklar açmıştır. Bu tekniklerin bitki ıslahında kullanılabilmesi için öncelikle türlerin hatta çeşitlerin rejenerasyonuna olabildiği en uygun büyüme düzenleyici kombinasyonlarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada da 6 farklı burçak hattı için en uygun büyüme düzenleyici kombinasyonları belirlenmiştir.

Teşekkür

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

Kaynaklar

- Barna, K. S. and A. K. Wakhlu, 1994. Whole plant regeneration of *Cicer arietinum* from callus cultures via organogenesis, *Plant Cell Rep.*, 13, 510-513.
- Böhmer, P., B. Meyer and H. J. Jacobsen, 1995. Thidiazuron – Induced high frequency of shoot induction and plant regeneration in protoplast derived pea callus, *Plant Cell Rep.*, 15, 26-29.
- Ekiz, H., 1988. Burçak (*Vicia ervilia* (L.) Willd.) hatlarında bazı tarımsal özelliklerin karşılaştırılması, Ankara Üniv. Ziraat Fak., Tarla Bitkileri Bölümü, Ankara, S: 2-4.
- Hasokawa, K., M. Nokano, Y. Oikawa and S. Yamamura, 1996. Adventitious shoot regeneration from leaf, stem and root explant of commercial cultivars of *Gentiana*, *Plant Cell Rep.* 15, 578-581.
- Jackson J. A. and S. L. A. Hobbs, 1990. Rapid multiple shoot production from cotyledonary node explants of pea (*Pisum sativum* L.). *In vitro Cell Dev. Biol.* 26, 835-838.
- Khalafalla, M. M. and K. Hattari, 1999. A combination of thidiazuron and benzyladenine promotes multiple shoot production from cotyledonary node explants of faba bean (*Vicia faba* L.), *Plant Growth Regulation*, 27, 145-148.
- 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.
- 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.
- Özcan, S., M. Barghchi, S. Firek and J. Draper, 1993. Efficient adventitious shoot regeneration and somatic embryogenesis in pea. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 34, 271-277.

- 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 viciifolia* Scop.), Plant Cell Rep., 16, 200-203.
- Özgen, M., S. Altınok, S. Özcan ve C. S. Sevimay, 1997, *In vitro* micropropogation of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars, Tr.J. of Botany, 21, 275-278.
- Polisetty, R., V. Paul, J. J. Deveshwar, S. Khetarpal, K. Suresh and R. Chandra, 1997, Multiple shoot induction by benzyladenine and complete plant regeneration from seed eXplants of chickpea (*Cicer arietinum* L.), Plant Cell Reports, 16, 565-571.
- Sancak, C., 1999. Koca Fiğ (*Vicia narbonensis* L.)'in Olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu, Gazi Üniv. Gazi Eğitim Fak. Dergisi 19, 25-33.
- Sancak, C. 1999, *In vitro* micropropogation of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.), Tr.J. of Botany, 23, 133-136.
- Sancak, C., S. Mirici and S. Özcan, 2000. High frequency shoot regeneration from embriyo explants of Hungarian vetch, Plant Cell, Tiss. and Org. Cult., 61, 231-235.
- Snedecor, G. W. and W. G. Cochran, 1967. Statistical Methods, The Iowa State University Press, Iowa, USA.
- Thomas, J.C. and F. R. Katterman, 1986, Cytokinin activity induced by thidiazuron, Plant Physiol, 81, 681-683.
- Uranbey, S., S. Çöçü, C. Sancak, İ. Parmaksız, K. M. Khawar, S. Mirici and S. Özcan, 2003. Adventitious shoot regeneration in cicer milkvetch. Biotechnology & Biotechnological Eq., 17, 33-37.

İletişim adresi :

Yılmaz ERDOĞAN
Gazi Üniversitesi, Eğitim Fakültesi
Biyoloji Bölümü-Ankara