

Ayvada (*Cydonia vulgaris* Pers.) Olgunlaşmamış Çenek Yapraklardan Somatik Embriyo Oluşumu*

Ahmet AYGÜN¹Hatice DUMANOĞLU²

Geliş Tarihi : 28.01.199

Özet: Bu çalışmada, Limon ayvasının (*Cydonia vulgaris* Pers. cv Limon) serbest tozlanma sonucu oluşmuş tohumlarının olgunlaşmamış çenek yaprakları tam çiçeklenmeden 7, 8, 9, 10 ve 11 hafta sonra çıkarılmış ve 250 mg/l L-glutamin, 500 mg/l kasein hidrolizat, 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 and 5.0 mg/l benziladenin (BA), 0.0, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ya da naftalenasetik asit (NAA) ilave edilmiş makro element ve demir düzeyi ½ olan değiştirilmiş Murashige ve Skoog (MS) ortamında kültüre alınmıştır. Çenek yapraklar 4 hafta süreyle karanlık koşullarda inkübe edilmiş ve daha sonra hormon içermeyen 250 mg/l L-glutamin, 500 mg/l kasein hidrolizat ilave edilmiş karanlık koşullarda 3 kez alt kültüre alınmıştır. Her alt kültür sonrasında embriyonik çenek yaprak oranı (%) ve somatik embriyo sayısı (adet/çenek yaprak) belirlenmiştir. Araştırmada en yüksek embriyonik çenek yaprak oranı (%53.3 - 80.0) ve somatik embriyo sayısı (1.07±0.07 - 2.53±0.79 adet/ çenek yaprak), başlangıç ortamında 0.0 mg/l BA + 2.0 mg/l NAA, 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA, 1.0 mg/l BA + 2.0 mg/l 2,4-D ya da 1.0 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA kombinasyonları kullanılmış ve tam çiçeklenmeden 7 ve 11 hafta sonra kültüre alınmış çenek yapraklardan elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ayva, somatik embriyo oluşumu, benziladenin, naftalenasetik asit, 2,4-diklorofenoksiasetik asit, L-glutamin, kasein hidrolizat

Somatic Embryogenesis from Immature Cotyledons in Quince (*Cydonia vulgaris* Pers.)

Abstract: In this study, immature cotyledons of open-pollinated seeds from 'Limon' quince cultivar (*Cydonia vulgaris* Pers. cv 'Limon') were excised at 7, 8, 9, 10 and 11 weeks after anthesis and cultured on Modified Murashige and Skoog (MS) medium containing ½ macroelements and iron supplemented with 250 mg/l L-glutamine, 500 mg/l casein hydrolysate, 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 and 5.0 mg/l 6-benzyladenine (BA) and 0.0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) or naphthalene-acetic acid (NAA). The cotyledons were incubated for 4 weeks in darkness, prior to subculturing on hormone-free MS medium containing ½ macroelements and iron supplemented with 250 mg/l L-glutamine, 500 mg/l casein hydrolysate in darkness for three times. Percentage of embryonic cotyledon (%) and number of somatic embryos (number per cotyledon) were determined after each subculture. In this research, the highest percentage of embryonic cotyledons (53.3 - 80.0%) and number of somatic embryo (1.07±0.07 - 2.53±0.79) were obtained with 0.0 mg/l BA + 2.0 mg/l NAA, 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA, 1.0 mg/l BA + 2.0 mg/l 2,4-D or 1.0 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA combinations in induction medium and with cotyledons cultured at 7 and 11 weeks after anthesis.

Key Words: Quince, somatic embryogenesis, benzyladenine, naphthalene-acetic acid, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, L-glutamine, casein hydrolysate

Giriş

In vitro somatik embriyo oluşumu, somatik hibridasyon, somaklonal varyasyon, mutasyon, seleksiyon, çeşit tanısı, genetik materyalin korunması ve DNA transferi gibi moleküler yaklaşımların kullanıldığı genetik çalışmalar ve hızlı *in vitro* klonal çoğaltım için somatik embriyoların çok uygun yapılar olması nedeniyle büyük önem taşımaktadır (Litz ve Gray 1992, Robacker 1993, Daigny ve ark. 1996). Williams ve Maheswaran (1986) somatik embriyo oluşumunu, birleşme olmaksızın eşey hücrelerinin ve haploit ya da diploit somatik hücrelerin belirli embriyolojik aşamalardan geçerek farklılaşması olarak tanımlamaktadır. Araştırmacı bu olayın bir çok türde nusellus ve sinerjit hücreleri gibi eşeyssel orjinli ya da yaprak gibi somatik dokulardan doğması olarak

meydana geldiğini de belirtmektedir. Tulecke (1987), *in vitro* somatik embriyo oluşumunun direk ve indirek olmak üzere iki tipinin bulunduğunu bildirmektedir. Bunlardan direk oluşum, eksplant dokusundan embriyonun doğrudan gelişmesi ve indirek oluşum ise kallos, hücre süspansiyonları ve somatik embriyo hücreleri veya hücre gruplarından embriyoların meydana gelmesi olarak ifade edilmektedir.

Birçok odunsu çok yıllık bitki türünde olduğu gibi (Tulecke 1987) meyve türlerinde de somatik embriyo oluşumu, oluşan embriyoların çoğaltılması ve bunun sürekliliğinin sağlanması ayrıntılı çalışmaları gerektiren güç bir işlemdir. Bu amaçla yapılan çalışmalar, eksplant

* Ankara Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezinden özetlenmiştir.

¹ Karadeniz Teknik Üniv. Ordu Ziraat Fak. Bahçe Bitkileri Bölümü-Ordu

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

olarak farklı gelişme aşamasındaki uygun zigotik ya da somatik dokuların, ortam bileşimlerinin ve kültür koşullarının belirlenmesi üzerinde yoğunlaşmıştır (James ve ark. 1984, Tulecke ve McGranahan, Mehra ve Jaidka 1985, Litz 1988, Bano ve ark. 1991, Pijut, Neuman ve ark., Robacker, Gingas ve Stokes 1993, Kolova ve Stoyanov, Paul ve ark. 1994, Onay ve ark., Rugini ve Caricato, Carimi ve ark., Forero 1995, Daigny ve ark. 1996, Garin ve ark., Onay ve ark. 1997).

Bu çalışmada, bugüne kadar somatik embriyo oluşumu konusunda yapılmış herhangi bir araştırmanın bulunmadığı ayvada (*Cydonia vulgaris Pers.*), değişik zamanlarda alınan olgunlaşmamış çenek yapraklardan somatik embriyo oluşumu üzerine başlangıç ortamındaki farklı hormon kombinasyonlarının etkisi araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bu çalışma 1997-1998 yılları arasında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde yürütülmüştür.

Araştırmada bitkisel materyal olarak Limon ayvasında (*Cydonia vulgaris Pers. cv Limon*) serbest tozlanma sonucu meydana gelen meyvelerin tohumlarından çıkarılan olgunlaşmamış çenek yapraklar kullanılmıştır.

Kültürlerde temel besin ortamı olarak 250 mg/l L-glutamin (146.15 g/mol) ve 500 mg/l kazein hidrolizat katılmış, makro element ve demir düzeyi ½ olan değiştirilmiş Murashige ve Skoog (MS) ortamı (Dodds ve Roberts 1993) (Çizelge 1) kullanılmıştır. Çenek yaprakların ilk kültüre alındığı başlangıç ortamının hazırlığında temel besin ortamına farklı dozlarda benziladenin (BA) (225.25 g/mol), 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) (221.04 g/mol) ve naftalenasetik asit (NAA) (186.2 g/mol) ilave edilmiştir. Bu amaçla BA'nın 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 ve 5.0 mg/l; 2,4-D ve NAA'nın 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l dozları esas alınmıştır. Başlangıç ortamında, bu hormonlar BA + 2,4-D ve BA + NAA şeklinde 40 farklı kombinasyonda uygulanmıştır. Alt kültürlerde ise içerisinde hormon bulunmayan temel besin ortamı kullanılmıştır. Tüm ortamların pH'sı 5.7'ye ayarlanmış ve daha sonra bu ortamlara 30 g/l sakkaroz (342.30 g/mol) (Merck) ve 6 g/l agar (Oxoid) ilave edilmiştir. 121°C sıcaklıkta, 1 atmosfer basınç altında, 20 dakika süreyle sterilizasyonu yapılan ortamlar, 7 cm çapındaki steril petrilere 25 ml/petri olacak şekilde dağıtılmıştır.

Olgunlaşmamış çenek yapraklar, tam çiçeklenme tarihinden (10 Mayıs 1997) 7, 8, 9, 10 ve 11 hafta sonra toplanan küçük meyvelerin tohumlarından çıkarılmıştır. Bunun için meyvelerden ayrılan tohumlar %20'lik sodyum hipoklorit solusyonu ile 13 dakika dezenfekte edilmiş ve steril saf su ile 3 kez 5'er dakika çalkalanmıştır. Çenek yapraklar, tohumlardan laminar kabin içerisinde binoküler mikroskop altında çıkarılmış ve her petride 5 adet olacak şekilde dikilmiştir. Kültürler 25°C sıcaklıkta, karanlık koşullarda 4 hafta inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda laminar kabin içerisinde petrilere açılarak çenek yapraklardan somatik embriyo oluşumu incelenmiştir.

Daha sonra çenek yapraklar bozulmadan alt kültüre alınmıştır. Alt kültürler 4 hafta arayla 3 kez yapılmış ve yine 25°C sıcaklıkta, karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Her alt kültür sonrasında embriyonik çenek yaprak oranı (%) ve somatik embriyo sayısı (adet/çenek yaprak) belirlenmiştir.

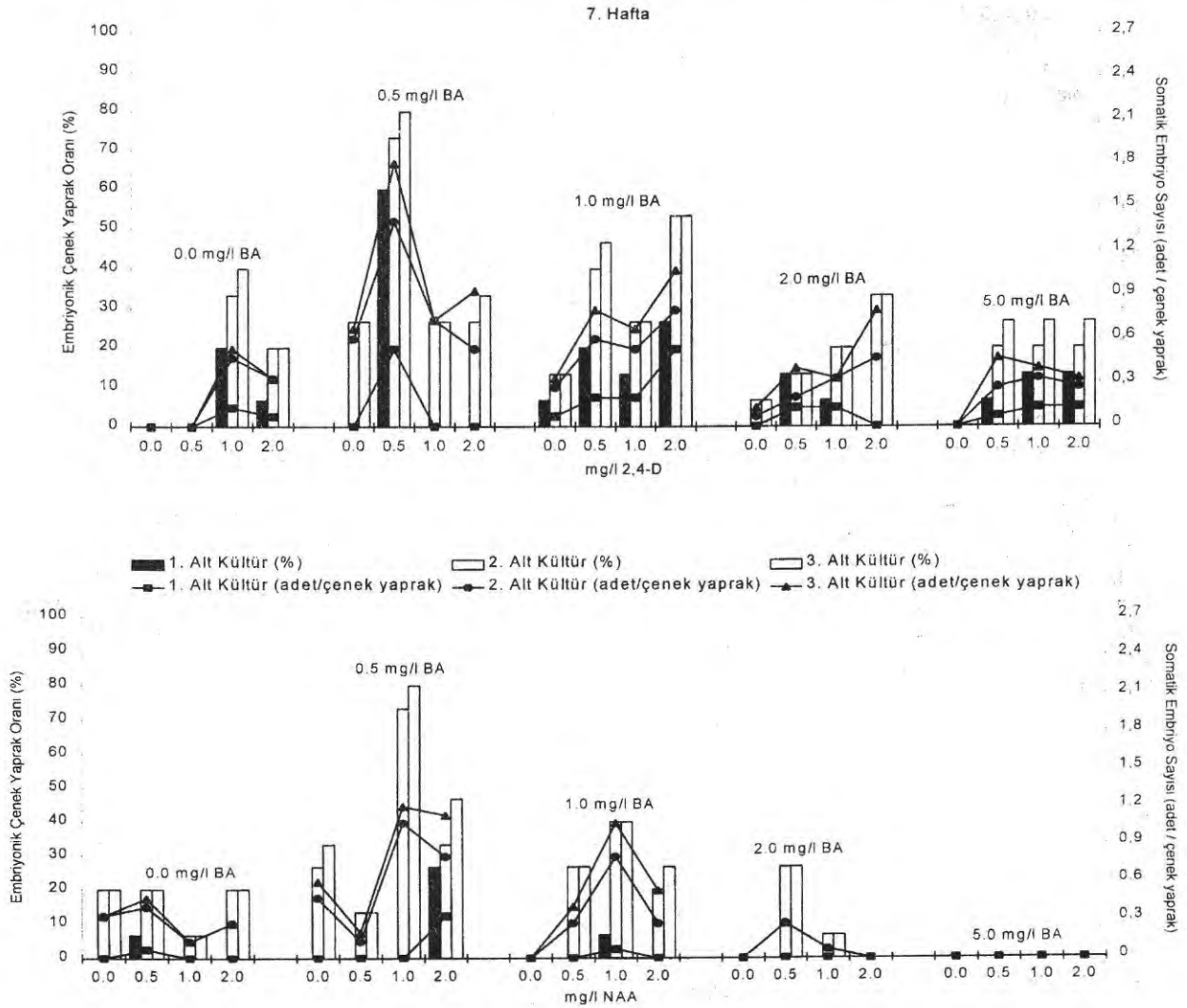
Araştırma "Tesadüf Parsellerinde Tekrarlanan Ölçümlü Deneme Düzeni"ne göre her tekerrürde 5 eksplant bulunacak şekilde 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Çalışmada, embriyonik çenek yaprak oranı (%) ve embriyo sayısı (adet/çenek yaprak) bakımlarından elde edilen farklı değerlerde "çenek yaprak alma zamanı x hormon kombinasyonları x alt kültürler" arasındaki interaksyon varyans analizi yöntemi ile SASS ve Minitab paket programları kullanılarak F testine (p=0.01) göre kontrol edilmiş, ortaya çıkan önemli farklılıklar Tukey testi ile %1 hata sınırı esas alınarak saptanmıştır. İstatistik analizlerde % bulguların açılı değerleri esas alınmıştır. Somatik embriyo sayılarında her değer için standart hatası hesaplanmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Tam çiçeklenme tarihinden 7, 8, 9, 10 ve 11 hafta sonra alınarak ilk 4 haftasını farklı hormon kombinasyonlarını içeren başlangıç ortamında geçiren çenek yapraklarda, bu sürenin sonunda somatik embriyo oluşumuna rastlanmamıştır. Bununla birlikte, aynı çenek yaprakların hormonsuz ortamlarda alt kültüre alınmasından sonra somatik embriyolar oluşmaya başlamıştır. Hem embriyonik çenek yaprak oranı ve hem de embriyo sayısı bakımlarından başlangıç ortamındaki uygulamalar arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar kaydedilmiş ve çenek yaprakların alınma zamanları bakımından en iyi sonuçlar tam çiçeklenmeden 7 ve 11 hafta sonra elde edilmiştir. Nitekim hormon kombinasyonlarına göre değişimle birlikte 7. haftada embriyonik çenek yaprak oranı 3. alt kültürde %80'e (Şekil 1), 11. haftada %66.7'ye (Şekil 5) ulaşırken, diğer zamanlarda bu oran en fazla %40 (Şekil 2, 3 ve 4) olarak belirlenmiştir. Aynı durum somatik embriyo sayısında da gözlenmiş ve 7. haftada çenek yaprak başına 1.80±0.12 (Şekil 1), 11. haftada 2.53±0.79 adet embriyo (Şekil 5) oluşurken, diğer haftalarda elde edilen en iyi değer 0.80±0.12 adet (Şekil 2, 3 ve 4) olmuştur. James ve ark. (1984) da Bramley, Cox, Greensleve ve Spartan elma çeşitleri ile M9, M25, M26 ve M27 elma anaçlarında (*Malus pumila* Mill.) somatik embriyoları, 50 günlük (yaklaşık 7 haftalık) tohumların nusellus ya da endosperminin mikropilar uçlarından ve çeşitlere göre %0-23 arasında değişen oranlarda 1-9 adet/eksplant olarak elde etmişlerdir. Bu bulgu araştırmamızda ayvanın çenek yaprakları için alt kültürlerde iyi sonuç veren 7 haftalık çenek yaprak yaşı ile benzerdir. Neuman ve ark. (1993) ise cevizde (*Juglans nigra* L.) en fazla somatik embriyoyu tam çiçeklenmeden 8, 10 ve 12 hafta sonra aldıkları çenek yapraklarda elde etmişlerdir. Paul ve ark. (1994) Golden Delicious elma (*Malus x domestica* Borkh.) çeşidinin olgunlaşmamış çenek yapraklarından somatik embriyo oluşumu üzerine eksplantların alındığı zamanın önemli olduğunu ve 60 günlük (yaklaşık 8 haftalık) zigotik embriyolardan alınan genç çenek yaprakların yüksek düzeyde (%18.3) embriyonik olduğunu öne sürmüşlerdir.

Çizelge 1. Değiştirilmiş Murashige ve Skoog ortamının içeriği (Dodds ve Roberts 1993)

(A) Makro elementler	Konsantrasyon (mg/l)
Amonyum nitrat (NH_4NO_3)	1650
Potasyum nitrat (KNO_3)	1900
Kalsiyum klorür dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	440
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	170
Magnezyum sülfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	370
(B) Demir	
Sodyum-demir EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{FeNa}$)	36.7
(C) Mikro elementler	
Mangan sülfat monohidrat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	16
Çinko sülfat heptahidrat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	8.6
Borik asit (H_3BO_3)	6.2
Potasyum iyodür (KI)	0.83
Sodyum molibdat dihidrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	0.25
Bakır sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)	0.025
Kobalt klorür heksahidrat ($\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	0.025
(D) Organik maddeler	
Myo-inositol ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	100
Glisin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	2
Thiamin hidroklorid ($\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OS} \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.1
Nikotik asid ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$)	0.5
Pridoksol hidroklorid ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$)	0.5

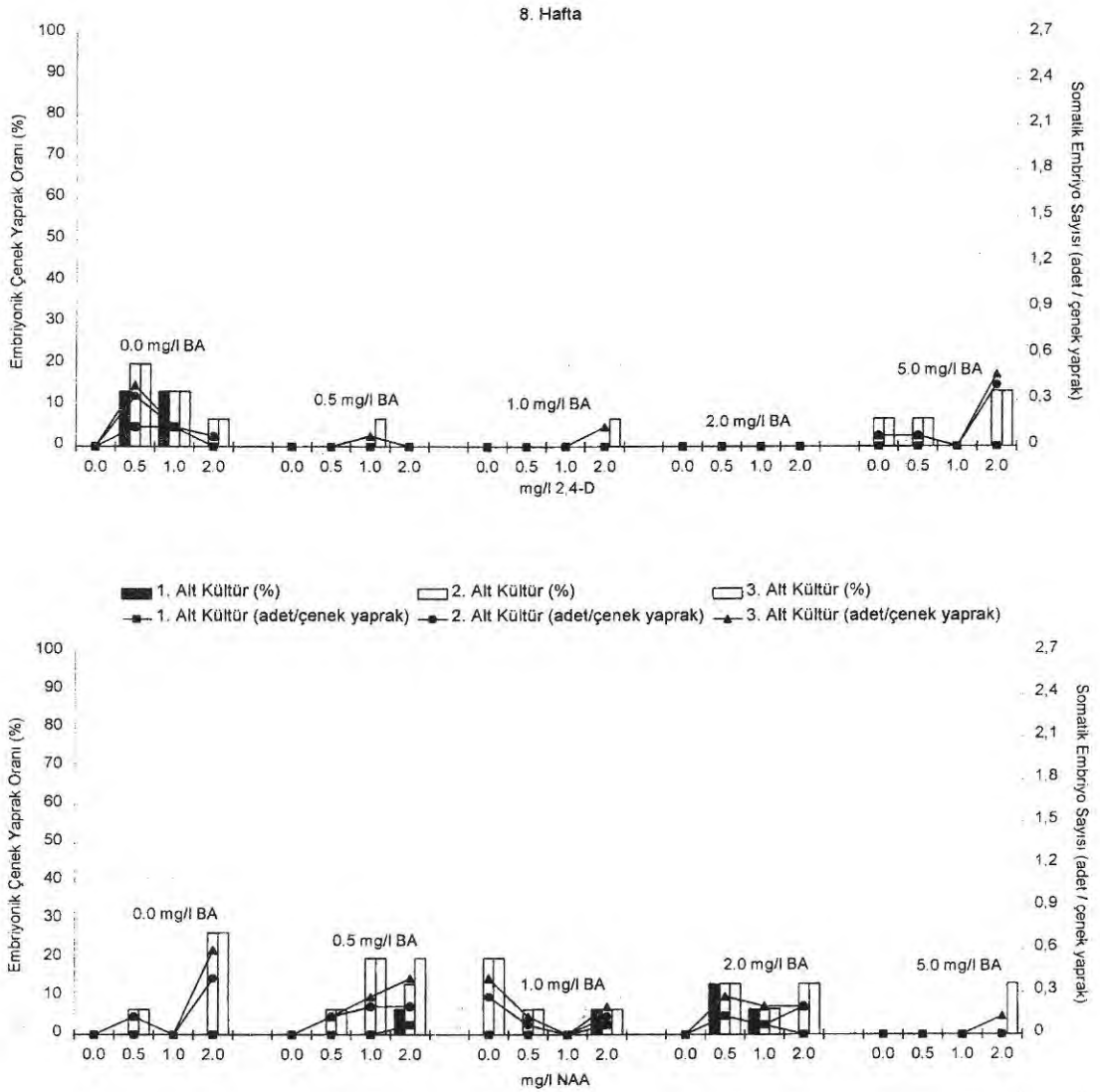


Şekil 1. Ayvada, tam çiçeklenmeden 7 hafta sonra farklı BA+2,4-D ve BA+NAA içeren başlangıç ortamlarında kültüre alınan çenek yapraklardan, hormonsuz alt kültürlerde somatik embriyo oluşumu

Tulecke ve McGranahan (1985) ise cevizde (*Juglans regia* L.) somatik embriyo oluşumu için en uygun çenek yaprak alma zamanının, çeşitlere göre değişmekle birlikte tam çiçeklenmeden 7-11 hafta sonra olduğunu, embriyonik çenek yaprak oranının ise %10-33 arasında değiştiğini bildirmektedirler. Her ne kadar farklı türler üzerinde çalışılmış olsa da bu araştırmacıların bulguları, araştırma sonuçlarımız ile kısmen paralellik göstermektedir.

Ayvanın olgunlaşmamış çenek yapraklarından 3. alt kültür sonunda somatik embriyo oluşumu bakımından istatistik olarak önemli bir farklılıkla elde edilen en iyi sonuçlar, başlangıç ortamındaki 0.0 mg/l BA + 2.0 mg/l NAA (11. hafta) (Şekil 5), 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA ve 1.0 mg/l BA + 2.0 mg/l 2,4-

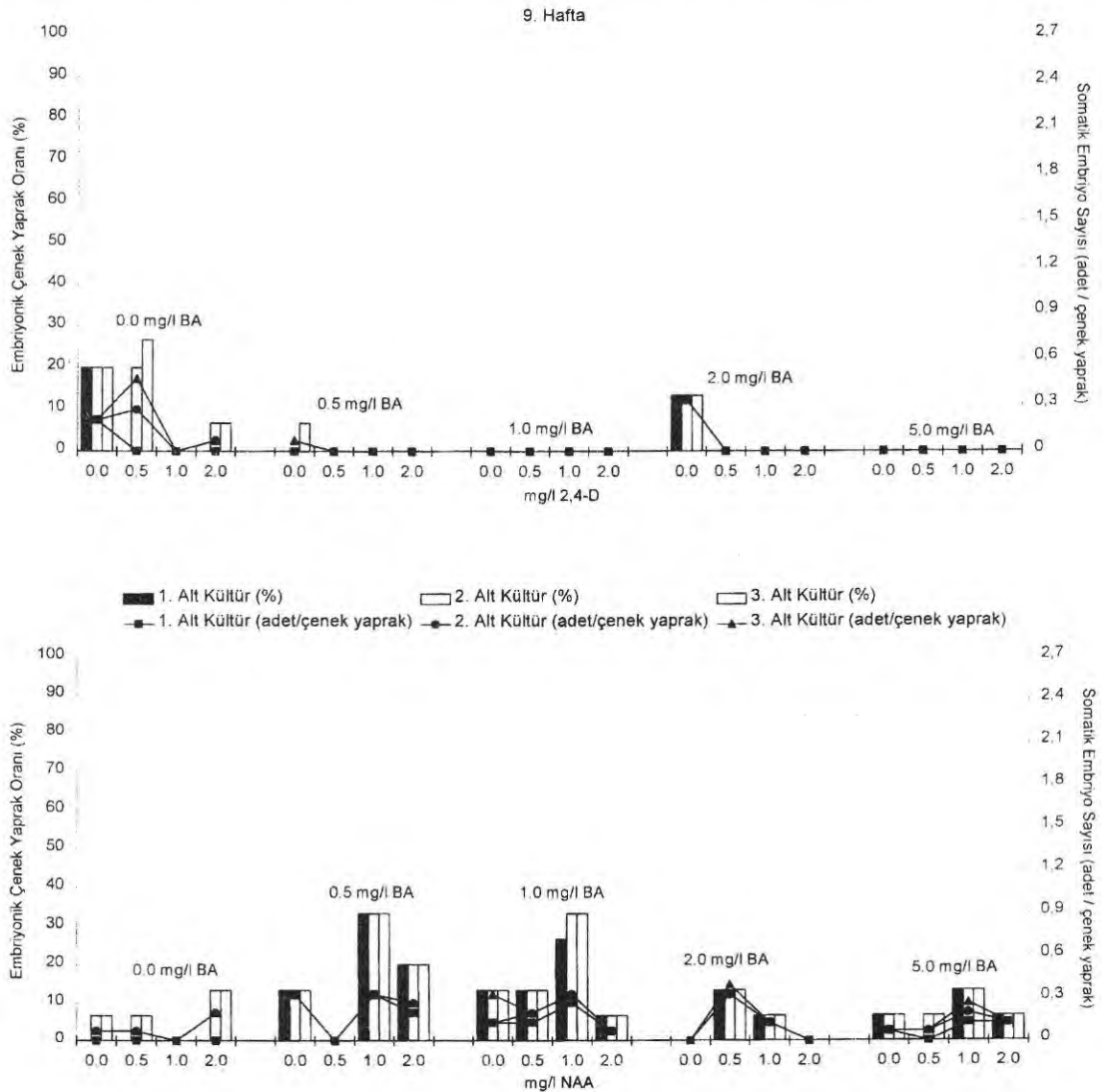
D (7. hafta) (Şekil 1) ve 1.0 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA (11. hafta) (Şekil 5) hormon kombinasyonlarına aittir. Bu uygulamalarda embriyonik çenek yaprak oranı %53.3 ile %80.0, eksplant başına embriyo sayısı 1.07±0.07 ile 2.53±0.79 adet arasında değişmiştir. Bu bulgular incelendiğinde, uygun BA konsantrasyonlarının 0.0 mg/l ile 1.0 mg/l arasında değiştiği, bir başka ifade ile 2.0 mg/l ve 5.0 mg/l gibi yüksek BA düzeylerinin iyi sonuç vermediği, 2,4-D ve NAA'nın ise genellikle 1.0 mg/l ve 2.0 mg/l gibi yüksek düzeylerinin iyi sonuç verdiği görülmektedir. Mehra ve Jaidka (1985) da armutta çenek yapraklara ait kallustan 2.0 mg/l NAA + 2.0 mg/l BA içeren Nitsch ortamında %80; 2.0 mg/l NAA + 2.0 mg/l BA içeren MS ortamında %70 ve 2.0 mg/l NAA + 2.0 mg/l BA içeren White ortamında %45 oranında embrioid elde etmişlerdir.



Şekil 2. Ayvada, tam çiçeklenmeden 8 hafta sonra farklı BA+2,4-D ve BA+NAA içeren başlangıç ortamlarında kültüre alınan çenek yapraklardan, hormonsuz alt kültürlerde somatik embriyo oluşumu

2.0 mg/l dozundaki NAA ile ilgili sonuçlarımız, araştırmaların bulguları ile büyük uyum içerisindedir. Bano ve ark. (1991) ise çayda (*Thea sinensis* L.), 0.5 mg/l 2,4-D ve 0.05 mg/l kinetin katılmış MS ortamına dikilen çenek yaprakların %70'inden embriyonik kültür elde ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, ortamda 2,4-D dozunun artmasıyla çeşitli şekillerde ve büyüklükte sıkı dokuların meydana geldiğini, ancak bu dokuların düşük dozda 2,4-D ve kinetin içeren bir ortamda ayrı ayrı kültüre alınmasıyla proembriyonik hücre yığınlarının ve daha sonra bitkilerin oluştuğunu belirtmektedirler. Gingas ve Stokes (1993) de Bristol ve Jewel kırmızı ahududu çeşitlerinde geç yeşil ya da erken sarı dönemlerdeki meyvelerin tohumlarından aldıkları eksplantların yaklaşık %70'ini, 2,4-D'nin tüm konsantrasyonlarında bir hayli embriyonik bulmuşlardır. Pijut (1993) ise *Juglans cinerea* L.'nin olgunlaşmamış çenek yapraklarından somatik embriyoların 0.01 mg/l IBA,

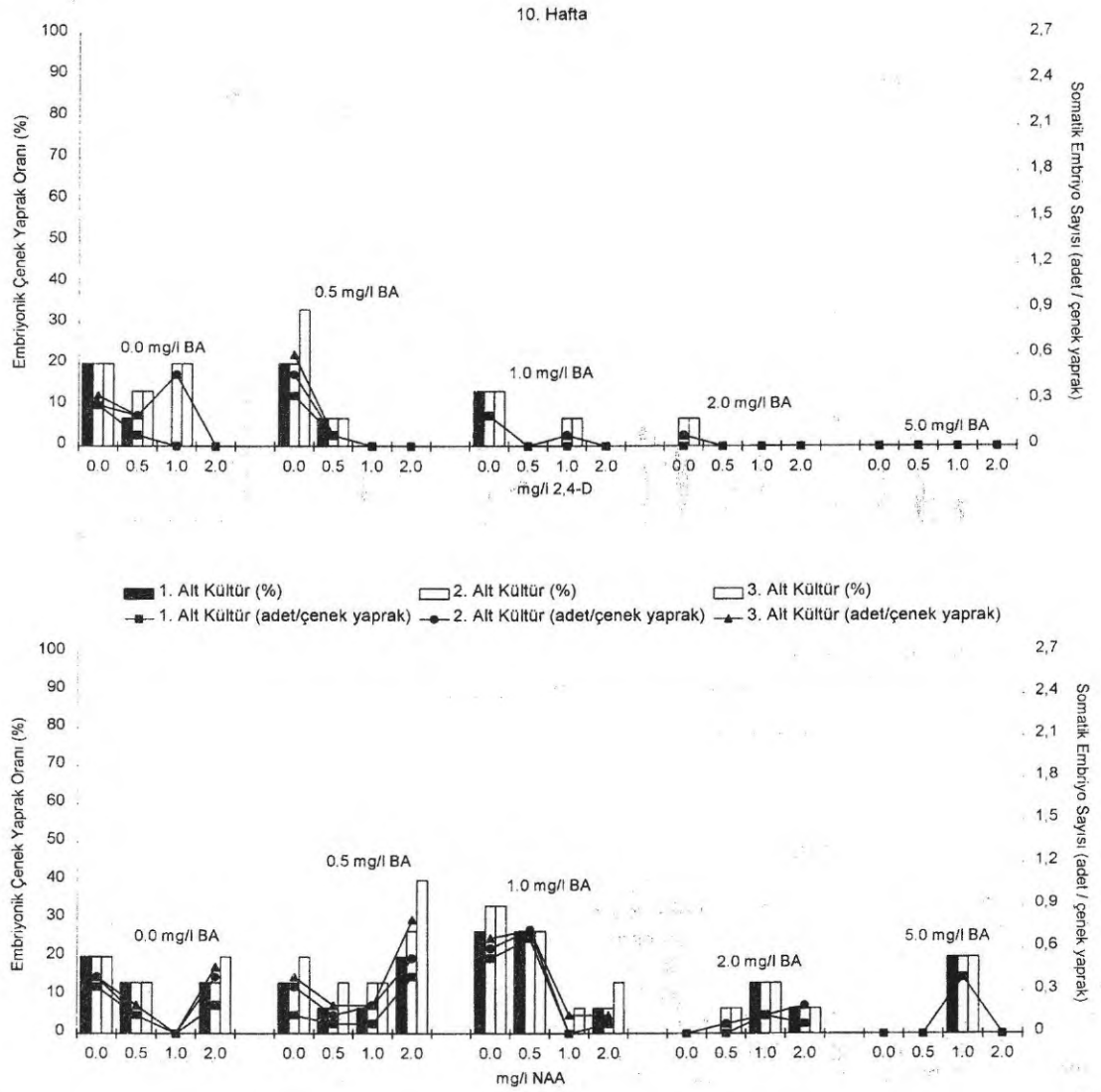
1 mg/l BA ve 2 mg/l kinetin içeren Driver ve Kuniyuki ve hormonsuz Driver ve Kuniyuki ortamları üzerinde doğrudan elde edildiğini bildirmektedirler. Her ne kadar çalışmamızda farklı hormon kombinasyonlarının etkisi alt kültürlerde ortaya çıktıysa da ilk kültür aşaması için 1.0 mg/l BA, önerdiğimiz dozlar içerisinde yer almaktadır. Çalışmamızda yer alan 2.0 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA kombinasyonu, sadece 7., 8. ve 9. haftalarda alınan çenek yapraklarda somatik embriyo oluşturanların oranını %13.3-26.7'ye çıkarırken, Kolova ve Stoyanov (1994) elmada (*Malus pumila* Mill.) 2 mg/l BA, 0.5 mg/l NAA ve 0.1 mg/l GA₃ içeren Skirvin ve Chu ortamı üzerinde çenek yaprak kısımlarının %48 ve boğum aralarından alınan gövde kısımlarının %63'den fazlasının somatik embriyo oluşturduğunu bildirmişlerdir. Paul ve ark. (1994) ise Golden Delicious elma (*Malus x domestica* Borkh.) çeşidinin olgunlaşmamış zigotik embriyolarına ait çenek



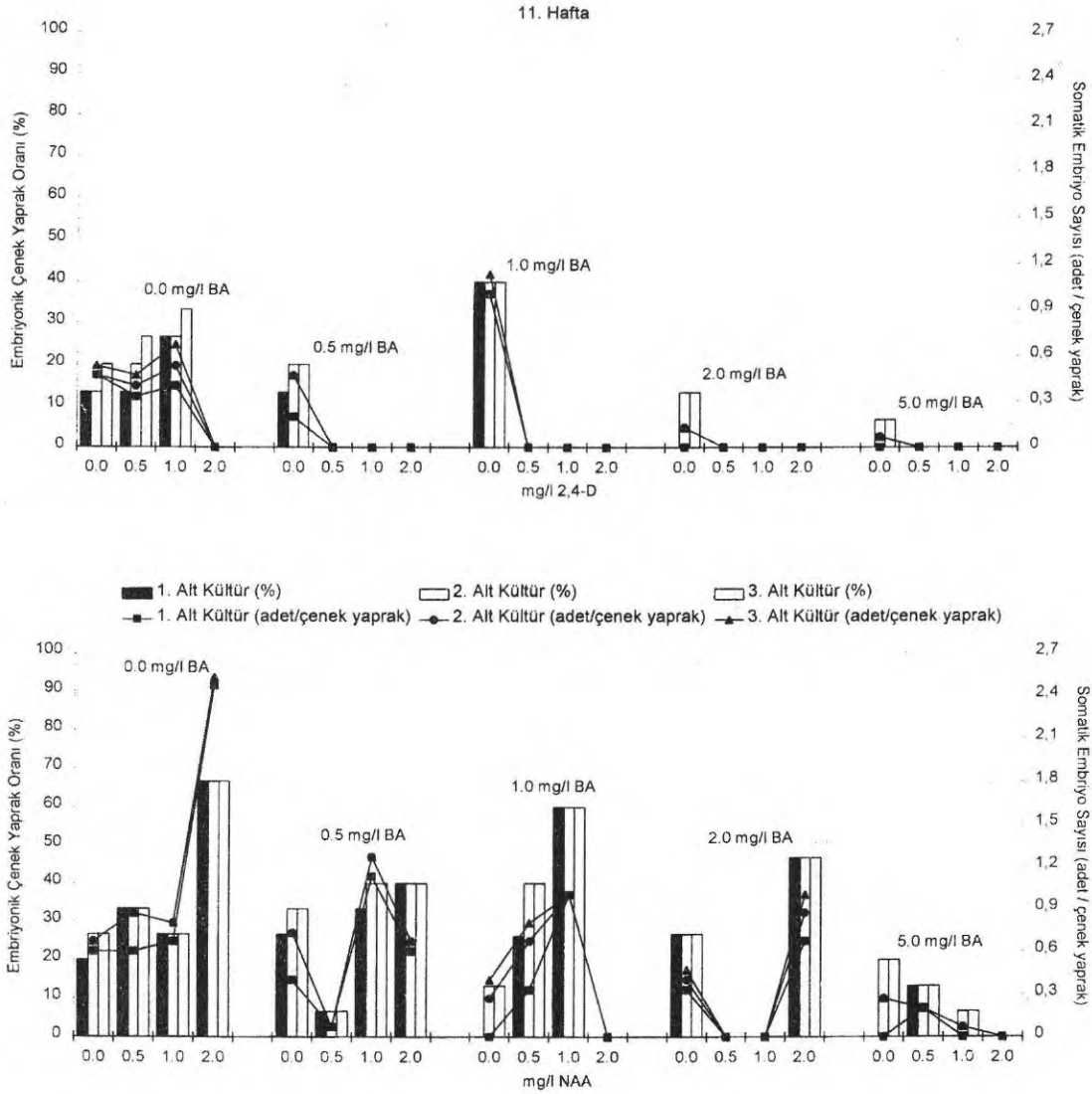
Şekil 3. Ayvada, tam çiçeklenmeden 9 hafta sonra farklı BA+2,4-D ve BA+NAA içeren başlangıç ortamlarında kültüre alınan çenek yapraklardan, hormonsuz alt kültürlerde somatik embriyo oluşumu

yapraklardan somatik embriyo oluşumu üzerine yüksek konsantrasyonda oksin (6 mg/l NAA) içeren başlangıç ortamının ve sonrasında düşük dozlarda sitokinin(0.5 mg/l BA) ve oksin (0.05 mg/l NAA) içeren gelişme ortamının; somatik embriyoların çoğaltımı üzerine de 0.1 mg/l BA + 0.1 mg/l KIN + 0.1 mg/l IBA kapsayan çoğaltma ortamının

etkili olduğunu belirtmektedirler. Daigny ve ark. (1996) Gloster 69 elma çeşitinde (*Malus x domestica* Borkh.) sekonder somatik embriyo oluşumunda %55.5 ile en yüksek çoğalma oranını, 5.3 µM (1.0 mg/l) NAA, 0.9 µM (0.2 mg/l) BA ve 0.9 µM kinetin (KIN) kombinasyonu ya da tek başına TDZ (10 µM) ile elde etmişlerdir.



Şekil 4. Ayvada, tam çiçeklenmeden 10 hafta sonra farklı BA+2,4-D ve BA+NAA içeren başlangıç ortamlarında kültüre alınan çenek yapraklardan, hormonsuz alt kültürlerde somatik embriyo oluşumu



Şekil 5. Ayvada, tam çiçeklenmeden 11 hafta sonra farklı BA+2,4-D ve BA+NAA içeren başlangıç ortamlarında kültüre alınan çenek yapraklardan, hormonsuz alt kültürlerde somatik embriyo oluşumu

Sonuç

Ayvada (*Cydonia vulgaris* Pers.) olgunlaşmamış çenek yapraklardan *in vitro* somatik embriyo oluşumu konusunda yapılmış bu araştırmada en yüksek embriyonik çenek yaprak oranı (%53.3 - 80.0) ve somatik embriyo sayısı ($1.07 \pm 0.07 - 2.53 \pm 0.79$ adet / çenek yaprak), tam çiçeklenmeden 7 ve 11 hafta sonra 0.0 mg/l BA + 2.0 mg/l NAA, 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA, 1.0 mg/l BA + 2.0 mg/l 2,4-D ya da 1.0 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA kombinasyonlarının kullanıldığı başlangıç ortamında kültüre alınan çenek yaprakların, hormonsuz ortamda yapılan alt kültürlerinde elde edilmiştir.

Kaynaklar

- Bano, Z., Rajarathnam, S. and Mohanty B. D. 1991. Somatic embryogenesis in cotyledon cultures of tea (*Thea sinensis* L.). J. of Hort. Sci. 66 (4) 465-470.
- Carimi, F., Pasquale F. D. and Crescimanno F. G. 1995. Somatic embryogenesis in *Citrus* from styles culture. Plant Science, 105 81-86.
- Daigny, G., Paul H., Sangwan R. S and Norreel, B. S. 1996. Factors influencing secondary somatic embryogenesis in *Malus x domestica* Borkh. (cv "Gloster 69"). Plant Cell Reports, 16 153-157.

- Dodds, J. H. and Roberts L. W. 1993. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press, New York, USA, 231 s.
- Forero, C. Y. B. 1995. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Musa* cultivars. *Infomusa*, 4 (1) 16.
- Garin, E. Grenier, E. and March, G. G. 1997. Somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48 83-91.
- Gingas, V. M. and Stokes, B. D. 1993. *Rubus* plant regeneration via asexual embryogenesis. *HortScience*, 28 (1) 58.
- James, D. J., Passsey, A. J. and Deeming, D. C. 1984. Adventitious embryogenesis and the *in vitro* culture of apple seed parts. *J. Plant Physiol.* 115 217-229.
- Kolova, L. G. and Stoyanov, N. A. 1994. *In vitro* Induction of Adventitious Shoot and Embryo Formation in Somatic Tissues of Apple (*Malus pumila* Mill.) Zygotic Embryos and Stem Segments. "Eds. H. Schmidt ve M. Kellerhals, Progress in Temperate Fruit Breeding", s. 377-379, Netherlands.
- Litz, R. E., 1988. Somatic embryogenesis from cultured leaf explants of the tropical tree *Euphoria longan* Stend. *J. Plant Physiol.* 132 190-193.
- Litz, R. E. and Gray, D. J. 1992. Organogenesis and Somatic Embryogenesis. "Eds. F.A. Hammerschlag ve R.E. Litz, Biotechnology of Perennial Fruit Crops", s. 3-34, Cambridge, UK.
- Mehra, P. N. and Jaidka, K. 1985. Experimental induction of embryogenesis in pear. *Phytomorphology*, 35 (1, 2) 1-10.
- Neuman, M. C., Preece, J. E., Sambeek, J. W. V. and Gaffney, G. R. 1993. Somatic embryogenesis and callus production from cotyledon explants of Eastern black walnut. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32 9-18.
- Onay, A., Jeffre, C. E. and Yeoman, M. M. 1995. Somatic embryogenesis in cultured immature kernels of pistachio, *Pistacia vera* L. *Plant Cell Reports*, 15 192-195.
- Onay, A., Firat, M. Z. and Namlı, O. 1997. An improved method for embling production in pistachio, *Pistacia vera* L. using. *Turkish J. of Biology*, 21 159-174.
- Paul, H., Belaizi, M. and Norreef, B. S. S. 1994. Somatic embryogenesis in apple. *J. Plant Physiol.* 143 78-86.
- Pijut, P. M. 1993. Somatic embryogenesis in butternut, *Juglans cinerea*. *Can. J. For. Res.* 23 835-838.
- Robacker, C. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from Muscadine grape leaf explants. *HortScience*, 28 (1) 53-55.
- Rugini, E. and Caricato, G. 1995. Somatic embryogenesis and plant recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.). "Canino" and "Moraiole". *Plant Cell Reports*, 14 257-260.
- Tulecke, W. and McGranahan, G. 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut, *Juglans regia* L. *Plant Science*, 40 57-63.
- Tulecke, W. 1987. Somatic Embryogenesis in Woody Perennials. "Eds. J.M. Bonga ve D.J. Durzan, Cell and Tissue Culture in Forestry", s. 61-91, Boston.
- Williams, E. G. and Maheswaran, G. 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*, 57 443-462.