

DÜŞÜK SICAKLIKTA MUHAFAZA EDİLMİŞ *in vitro* AYÇİÇEĞİ (*Helianthus annuus* L.) BİTKİLERİNDE ANATOMİK VE KARYOLOJİK İNCELEMELER

Hayati ARDA^{1*}, Sergun DAYAN², Gökçe AKPINAR¹

- ¹⁻ Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü 22030, Edirne. E-mail: harda@trakya.edu.tr Tel.: (0284) 235 28 25 / 1187. Fax : (0284) 235 40 10.
- ²⁻ Trakya Üniversitesi Havsa Meslek Yüksek Okulu Peyzaj ve Süs Bitkileri Programı, 22500, Havsa, Edirne.

ÖZET

Bu çalışmada, *Helianthus annuus* L. (ayçiçeği) bitkisinden embriyo kültürü yöntemi kullanılarak elde edilmiş olan bitkilerin soğukta muhafaza edilerek korunmasına ve bu bitkilerde oluşan anatomik ve karyolojik değişimlerin belirlenmesine çalışılmıştır. Kontrol grubu bitkileri kum ortamında çimlendirilerek elde edilmiştir. Deney grubu ise, 0,5 mg/l BAP ve 0,1 mg/l NAA içeren MS besi ortamında embriyo kültürü yöntemiyle yetiştirilmiştir. Bu bitkilerin yarısı 25 °C de 16/8 saat fotoperyotta bekletilirken diğer yarısı 4 °C'de karanlıkta bekletilmiştir. Yapılan anatomik değerlendirmede, deney grubu bitkilerinin epiderma, korteks parankimasi, öz parankimasi, iletim demetleri gibi yapılarının kontrol grubuna göre farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Mitotik indeks değerleri kontrol grubunda %22.9, deney grubu kültür ortamında yetişen bitkilerde %60, soğukta muhafaza edilmiş bitkilerde ise %10.1 olarak belirlenmiştir. Tüm bu anomaliler normal kültür şartlarında ortadan kalkmış ve bitkiler sağlıklı gelişim göstermiştir. Sonuç olarak ayçiçeğinin soğukta muhafazası yararlanılabilir bir yöntem olarak önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Embriyo kültürü, Anatomi, Mitotik indeks, Ayçiçeği.

**ANATOMICAL AND CARYOLOGICAL INVESTIGATIONS ON *in vitro*
SUNFLOWER (*Helianthus annuus* L.) PLANTS PRESERVED AT LOW
TEMPERATURE**

ABSTRACT

In this study, plants derived from *Helianthus annuus* L. (sunflower) seeds by using the embryo culture method were studied to preserve them at low temperature and to determine the anatomical and karyological changes. The germinated control plants were grown in the sand. The experimental group were cultured on MS embryo culture medium containing, 0,5 mg/l BAP and 0,1 mg/l NAA. One-half of these plants were kept at 16/8 hours photoperiod at 25 °C, and the remains kept in the dark at 4 °C. In the anatomical evaluation, structures such as epidermis, cortex parenchyma, parenchyma, vascular bundles of experimental group plants showed some major differences than the control. Mitotic index values have been identified 22,9% in the control, 60% in the experimental group grown at photoperiod at 25 °C, 10,1% in plants treated with dark and chilling. All of these abnormalities disappeared at normal culture conditions and plants showed healthy development. In conclusion, it is recommended that chilling storage of sunflower is a utilizable method.

Key Words: Embryo culture, Anatomy, Mitotic index, Sunflower.

GİRİŞ

Artan nüfusa paralel olarak ülkemizin bitkisel yağ ihtiyacı giderek artmaktadır. Ülkemizde çoğunlukla ayçiçeği yağı tercih edilmesi ve gerekli bitkisel yağın yarısını dışarıdan ithal etmek zorunda olmamız, son yıllarda ayçiçeğinin önemini giderek arttırmaktadır (Kaya, 2004). Bu ihtiyaçlar ve gelişen biyoteknolojik çalışmaların doğrultusunda ayçiçeği değişik amaçlar için *in vitro* ortamda değişik araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (Chraibi ve Ark., 1992, Greco ve Ark., 1984). *In vitro* ortamda bitki elde etmenin bir yolu da embriyoların eksplant olarak kullanımudur (Knittel ve

Ark., 1991, Freyssinet ve Freyssinet, 1988). Bu yolla elde edilen bitkiler değişik amaçlar için kullanılabilir (klonal çoğaltım, gen aktarımı, somatik embriyo eldesi, germpalzm muhafazası vs.). Ayrıca *in vitro* kültürle elde edilen bitki kısımlarının uzun süreli muhafazası, önemli ıslah hatlarının korunması ve elde edilen verimli soyların uzun süreli saklanabilmesi için önemlidir. Bu amaçla, kültür sıcaklığı 0 °C'nin az üzerine kadar düşürülerek büyüme yavaşlatılabilir (Hatipoğlu, 1999). Düşük sıcaklıkta depolama ile metabolik faaliyetler yavaşlamaktadır. (Emekliler, 2002). Bu sayede kültürler uzun süre korunabilmektedir. Örneğin, Lundergan ve Janick (1979), elma ile yaptıkları çalışmada sürgün uçlarını 1-4 °C'de bir yıl süre ile muhafaza etmeyi başarmışlardır. Başka bir çalışmada *Trifolium repens* aynı teknikle karanlıkta 5 °C'de 10 aya kadar muhafaza edilebilmiştir (Bhojwani, 1981). Düşük sıcaklıkta muhafaza tekniği tek yıllık çim (*Lolium multiflorum*) bitkisinde de başarı ile kullanılmıştır (Dale, 1980). *In vitro*'da saklanan bitkiler aylarca, yıllarca muhafaza altında tutulabilir. Bitkiler 4 °C'de aylarca yeni besi yerine aktarılmadan kalabilirler (Barbara, 2005). Ancak, sonraki bitki gelişiminin sağlıklı olabilmesi açısından soğukta muhafaza süresinde kültürlerde meydana gelebilecek anatomik ve karyolojik değişimlere dikkat edilmelidir. Bu bağlamda, *Helianthus annuus* L. bitkisinden olgunlaşmış embriyo kültürü yöntemi kullanılarak elde edilen bitkilerin düşük ısıda muhafazası ve bu yöntem sonucunda bitkilerde oluşabilecek anatomik ve karyolojik değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOD

Çalışmada kullanılan ayçiçeği tohumları, Edirne Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Çalışma, kontrol ve deney grubu olacak şekilde planlanmıştır. Kontrol grubunda tohumlar kuma ekilmiş ve 25–26 °C'de çimlenmeye bırakılmıştır. Bitkiler 8–10 yapraklı olduklarında gövdelerinden kesitler alınmıştır. Bu kesitler safranin ile boyanmış ve 50 °C'de hazırlanmış gliserin-jelatin (1/1) ortamı ile kapatılıp daimi preparat haline getirilmiştir. Kesitler ışık mikroskobu ile incelenmiş, fotoğrafları çekilerek anatomik özellikleri belirlenmiştir. Ayrıca kontrol grubu

bitkilerinden kök uçları alınarak aseto-orsein boyası ile ezme preperasyon yöntemi kullanılarak mitoz preperatları hazırlanmış ve ışık mikroskobu görüntüleri üzerinde mitotik aktiviteyi belirlemek amacıyla mitoz bölünme aşamasındaki hücreleri saptanmıştır.

Deney grubu bitkilerini elde etmek için olgunlaşmış embriyolar kullanılmıştır. Bu amaçla tohumlara yüzey sterilizasyonu (2 dk %70 alkolde, 2 dk steril destile suda, 2 dk %10'luk sodyum hipoklorit çözeltisinde, ikişer defa 2 dk steril destile suda bekletilmiştir) işlemi uygulanmıştır. Daha sonra embriyolar izole edilerek içerisinde 0,5 mg/l BAP ve 0,1 mg/l NAA hormonları bulunan MS (Murashige ve Skoog, 1962) besiyeri içeren petri kaplarına her bir kaba 10 embriyo gelecek şekilde ekimi yapılarak 25–26 °C'de 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyotta iklim dolabında gelişmeye bırakılmıştır. Embriyolar bir hafta içerisinde alt kültüre alınmıştır. Bitkiler 4–6 yapraklı olduklarında bir kısmı +4 °C'de karanlıkta 30 gün süreyle bekletilmek üzere ayrılmıştır. Diğerleri de iklim dolabında 25-26 °C'de 16/8 saat fotoperiyotta gelişmeye bırakılmıştır. 30 günlük süre sonunda her iki grup bitkiden de gövde kesitleri alınmış ve bu kesitler safraninle boyanarak gliserin-jelatin yöntemiyle kapatılmış ve daimi hale getirilmiştir. Işık mikroskobu ile incelemeler yapılarak fotoğrafları çekilmiştir. Ayrıca mitotik aktiviteyi belirlemek için her iki gruptan alınan kök uçlarına aseto-orsein boyası kullanılarak ezme preperasyon yöntemi uygulanmış ve preperatlar entellan ile daimi hale getirilmiştir. Bu preperatlar üzerinde ışık mikroskobu incelemeleri yapılarak mitoz bölünme halindeki hücreler sayılmıştır.

SONUÇLAR

MORFOLOJİK BULGULAR

Kumdaki kontrol grubu tohumlar 7 gün sonunda %83 oranında çimlenmiştir. Bu bitkiler normal şekilde gelişerek 30 günlük süre sonunda kök, gövde ve yaprak gelişimi göstermiştir. Deney grubu olarak izole edilen embriyolar bir hafta sonunda %85 oranında gelişim göstermişlerdir. Bu bitkilerde 15 gün sonunda kök, gövde ve yaprak

oluşumu meydana gelmiştir. *In vitro* bitkilerin yarısı 4–6 yapraklı olunca +4 °C'lik karanlık ortamda 30 gün süreyle bekletilmiştir. Bu süre sonunda bitkilerin gözlenebilir bir büyüme göstermedikleri, ancak kök ve gövdelerinin normal morfolojik yapılarını korudukları, yapraklarının şekil ve renk olarak sağlıklı oldukları görülmüştür.

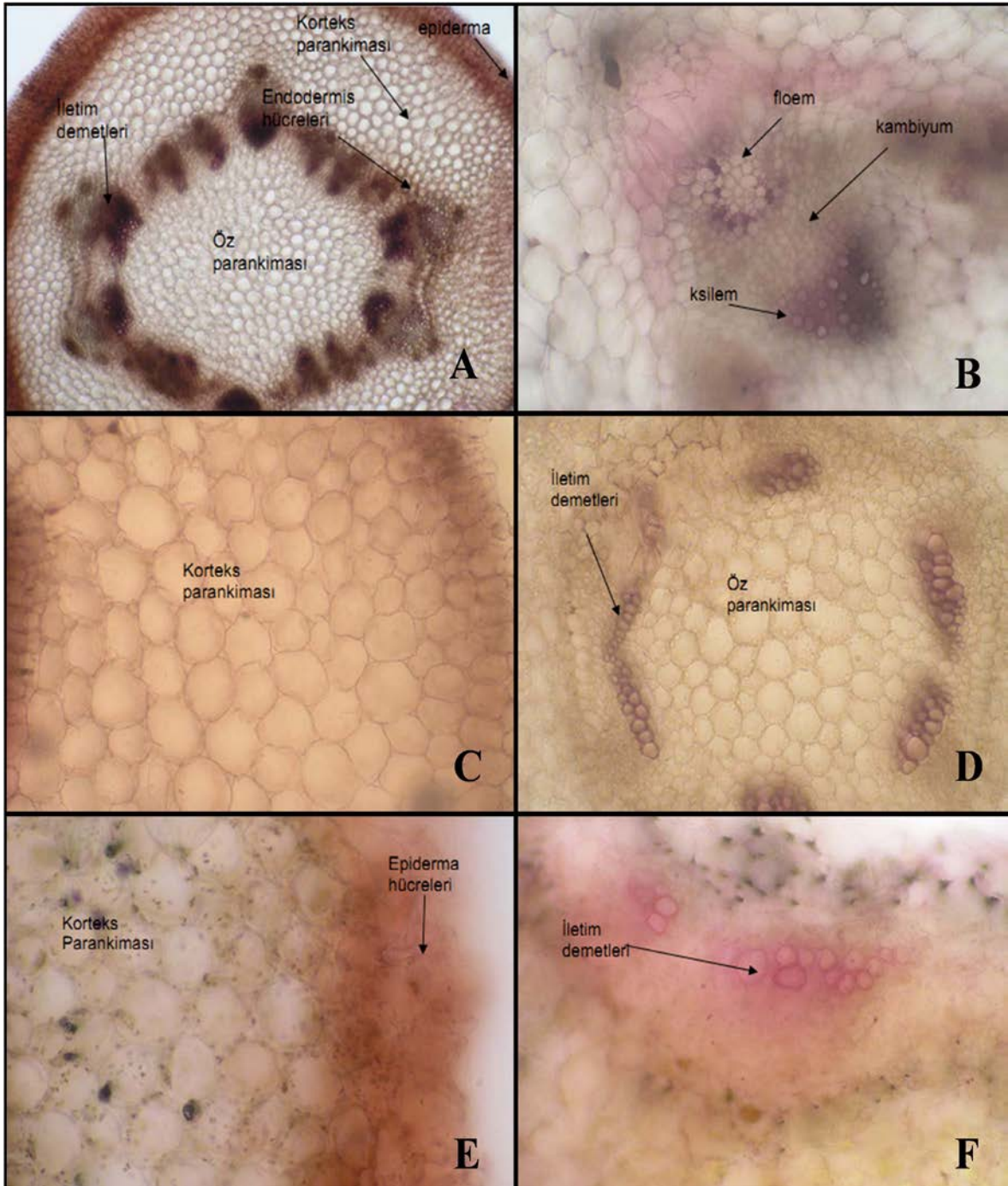
ANATOMİK BULGULAR

Gelişen kontrol grubu bitkileri 8–10 yapraklı aşamaya geldikten sonra alınan gövde enine kesitlerinde yapılan incelemelerde gövdenin en dışında tek sıralı eşkenar hücrelerden oluşan epiderma tabakasının yer aldığı görülmüştür. Epidermanın altında korteks parankimasının bulunduğu ve bu tabakanın epiderma tabakasıyla benzerlik gösterdiği ve renk bakımından da epiderma ile aynı renkte koyu kahverengi olduğu görülmüştür. Korteks parankimasının 9–10 sıralı parankima hücrelerinden oluştuğu ve parankima hücrelerinin aralarında küçük hücre arası boşlukların bulunduğu gözlenmiştir. Parankima dokusunun içerisinde dairesel bir dizilim gösteren iletim demetlerinin yer aldığı saptanmıştır. Bu iletim demetleri ile parankima dokusunun arasında belirgin bir endoderma tabakasının olduğu görülmüştür. İletim demetlerinin dikotil bitkilerde olduğu gibi floem ve ksilemden oluştuğu ve kambiyum tabakası içerdiği gözlenmiştir. İletim demetlerinin ksilem bölgesinde sklerankimatik hücre gruplarının yer aldığı fakat diğer bölgelerde sklerankima hücrelerinin bulunmadığı gözlenmiştir. Dairesel dizilimdeki iletim demetleri arasında parankima hücrelerinin bulunduğu ve öz kollarını oluşturduğu belirlenmiştir. Gövdenin merkezi bölgesinde parankimatik dokunun yer aldığı görülmüştür. Merkezi bölgeye doğru gidildikçe parankima hücrelerinin büyüdüğü gözlenmiştir (Şekil 1 A-B).

Kültürde gelişmiş olan deney grubu bitkilerinden alınan gövde kesitleri incelendiğinde gövdenin dışında değişik şekilli epiderma hücrelerinin bulunduğu görülmüştür. Korteks parankimasının 13–15 sıralı parankima hücrelerinden oluştuğu ve hücre arası boşlukların bulunmadığı saptanmıştır. Endoderma tabakasının fazla belirgin olmadığı görülmüştür. İletim demetleri fazla gelişme göstermemiş olmakla birlikte gövdede dairesel bir görünüm oluşturacak şekilde yer almıştır. İletim demetlerinde

floem dokusu hücrelerine kıyasla ksilem dokusu hücrelerinin daha belirgin olduğu gözlenmiştir. Aralarındaki kambiyum tabakasının da belirgin olmadığı görülmüştür. Gövdenin merkezi bölgesinde parankimatik doku yer almıştır. İletim demetleri arasındaki parankima hücrelerinin öz kollarını oluşturduğu, merkezi bölgeye doğru gidildikçe parankima hücrelerinin büyüklüklerinin arttığı tespit edilmiştir (Şekil 1 C-D).

Embriyo kültüründe gelişen bitkilerden +4 °C'lik ortama alınan ve 30 gün süreyle bekletilen bitkilerin gövde anatomik kesitlerinde gövdenin dışında şekilleri deforme olmuş epiderma hücrelerinin yer aldığı görülmüştür. Epiderma hücrelerine benzer şekil ve görünümde korteks parankimasının bulunduğu saptanmıştır. Korteks parankimasında yer alan parankima hücrelerinin çeper yapılarının bozulduğu, içeriklerinin koyu renkli kümeler halinde bu doku içersinde yer aldığı, bazı bölgelerde ise normal yapı ve şekillerini koruduğu tespit edilmiştir. Parankima dokusunun bittiği yerde iletim demetlerini kuşatan belirgin bir endoderma tabakasının yer aldığı ve iletim demetlerinin fazla gelişme göstermemiş olmakla birlikte gövdede dairesel bir görünüm oluşturacak şekilde sıralandığı görülmüştür. İletim demetlerinde floem dokusu hücrelerinin belirgin olmamakla birlikte ksilem dokusu hücrelerinin belirgin olduğu saptanmıştır. Aralarındaki kambiyum tabakasının da belirgin olmadığı fark edilmiştir.



Şekil 1. Kontrol ve deney grubu bitkilerinin gövde enine kesitleri. A-B kontrol grubu, C-D deney grubu 25 °C, E-F deney grubu 4 °C.

İletim demetlerinin arasında öz kollarının bulunduğu gözlenmiştir. Gövdenin merkezi bölgesinde parankimatik doku hücrelerinin büyük ölçüde deforme olduğu ve iletim demetlerine yakın bölgelerde kalıntılarının bulunduğu görülmüştür (Şekil 1 E-F).

KARYOLOJİK BULGULAR

Kontrol grubu olarak yetiştirilmiş bitkilerdeki mitoz bölünme aktivitesini incelemek için hazırlanan preparatlarda kök ucundaki hücrelerin eşkenar şekilli oldukları interfaz aşamasındakilerin büyük nükleuslu, mitoz bölünme aşamasındakilerin ise değişik evrelerde oldukları gözlenmiştir. Deney grubunun normal kültür ortamında yetiştirilmiş bitkilerinden hazırlanan kök ucu preparatları incelendiğinde hücrelerinin genelde dikdörtgen şekilli oldukları, nükleuslarının büyük ve tanecikli yapıya sahip olduğu ve hücrelerin birçoğunun mitoz bölünmenin çeşitli aşamalarında oldukları görülmüştür. Deney grubunun soğukta muhafaza edilmiş bitkilerinden alınan kök uçlarındaki hücreler incelendiğinde, hücrelerin farklı büyüklüklerde oldukları, şekillerinin değişkenlik, nükleus büyüklüklerinin farklılık gösterdiği, mitoz bölünme evresindeki hücrelerinin ise sayıca az oldukları gözlenmiştir. İncelenen preparat sayısı, hücre sayısı ve mitotik indeks değerleri Tablo 1’de verilmiştir. Ayrıca tüm gruplardaki hücrelerin kromozom sayılarının $2n=34$ olduğu belirlenmiştir.

Tablo 1. Kontrol ve deney gruplarındaki kök ucu preparatlarının mitotik indeks değerleri.

	Preparat sayısı	Sayılan hücre sayısı	Mitoz evresi	İnterfaz evresi	Mitotik indeks (%)
Kontrol Grubu	10	892	205	687	22,9
Deney grubu (25 °C)	10	854	513	341	60
Deney grubu (4 °C)	10	906	92	814	10,1

TARTIŞMA

Çalışmamızda kontrol grubundaki çimlenme oranı %83 iken besi yerine aktarılan embriyoların %85'inin tam bir bitkiye farklılaşması, rejenerasyon oranının başarılı olduğunun göstergesidir. Elde edilen anatomik ve karyolojik bulgular sonuçlar kısmında verildiği için burada sadece olası sebepleri tartışılmıştır. Buna göre kontrol grubu ve deney grupları arasında bitkilerin gelişimleri esnasında dış morfolojik bakımdan önemli bir farklılığın oluşmadığını görülmüştür. Buna karşılık deney ve kontrol grubu anatomik olarak incelendiğinde bazı farklılıkların olduğu, mitotik indeksler açısından ise oldukça anlamlı değişimlerin olduğu gözlenmiştir.

Anatomik değişimlerin nedeni olarak *in vitro* ve *in vivo* ortamda yetiştirilen bitkilerde farklı çevresel faktörlerden etkilenme tarafımızdan en önemli neden olarak düşünülmektedir. Çünkü, kültür ortamındaki bitkilerde ortamın steril olması, bitkinin su ve besin ihtiyacının en iyi şekilde karşılanması gibi nedenlerden dolayı bitkilerde hücre bölünmesi daha hızlı olmakta, ancak hücresel farklılaşma aynı hızda olmamaktadır. Bunun sonucunda da, deney grubu bitkilerinin gövde anatomik yapısında farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Ek olarak düşük sıcaklık etkisinin hücre membranlarındaki lipitlerin katılaşmasına yol açtığı bilinmektedir. Dolayısıyla membranların permeabilitesi artmaktadır. Ancak bu etki bitkilerin normal sıcaklığa dönmesi ile ortadan kalkabilmektedir (Kocaçalışkan, 2006). Çalışmamızda da +4°C'de muhafaza edilen fidelerin dış ortam koşullarına alındığında normal gelişme göstermesi bu durumu desteklemektedir. Aynı şekilde başka bir araştırmada 12 ay süre ile +5°C'de ve karanlıkta bekletilen *Saussurea lappa* fidelerinden etiyole ve bodur sürgünler olduğu fakat normal şartlara döndüğünde 8 gün içinde bitkilerin yeşile döndüğü bildirilmiştir (Arora ve Bhojwani, 1989).

Mondal ve Ark. (2002), +4°C'de saklanan aksillar tomurcuklardan sürgün çoğalmasıyla çayın (*Camellia sinensis*) üretilebildiğini göstermişlerdir. Çay embriyolarının düşük sıcaklıkta muhafaza kapasitesine sahip olduğunu açıklamışlardır. Nod eksplantları laboratuvar koşullarında düşük sıcaklıkta (4°C) kültüre alınmıştır. 4

°C’de muhafaza edilmesine rağmen tomurcuk oluşumunun etkilenmediğini gözlemişlerdir. *Dianthus ingoldbyi* ile yapılan başka bir çalışmada 6 ay boyunca karanlıkta ve düşük sıcaklıkta (4 °C) tutulan *in vitro* fidelerde herhangi bir anatomik ve morfolojik dejenerasyon olmadığı bildirilmiştir (Arda, 2009). Çalışmamızda her ne kadar bazı anatomik değişimler gözlenmişse de, bitkilerin normal ortam koşullarına alınmasını takiben gelişimin normale dönmesi sonucu, soğukta muhafaza yönteminin ayçiçeğinde uygulanabilir olduğu düşünülmektedir. Keza Barbara (2005), germplazm muhafazasında doku kültürünün bitki materyalinin çoklu üretimi, muhafazası, saklanması ve dağılmasında etkili bir yöntem olduğunu açıklamıştır. *In vitro* saklanan bitkilerin aylarca, yıllarca muhafaza altında tutulabildiğini ayrıca, bitkilerin 4°C’de aylarca yeni besi yerine aktarılmadan kalabileceğini açıklamıştır.

Mitotik aktivite değerleri karşılaştırıldığında kontrol grubunda %22.9, deney grubu kültür ortamında yetiştirilende %60, deney grubu soğukta muhafaza edilenlerde ise %10.1 olarak bulunmuştur. Normal şartlarda gelişen bitkinin mitotik aktivitesi, ortam şartlarının ve besleme olanaklarının el verdiği ölçüde hücre bölünmesine imkan sağlamasıyla açıklanabilir. Kültür ortamında yetiştirilen bitkilerde oldukça yüksek mitotik aktivite görülmesinin nedeni olarak *in vitro* ortamda bitkilere sağlanmış olan maksimum yaşama şartlarından kaynaklanan etkinin bir sonucu olduğu düşünülebilir. Bilindiği gibi sitokinler hücre bölünmesini uyarmaktadır (Babaoğlu ve Ark., 2002). Bu bağlamda çalışmamızda kültür ortamında kullanılan ve bir sitokin olan BAP’nin oranının yüksek olmasının da ayrıca hücre bölünmesini teşvik ettiği düşünülmektedir. Soğukta muhafaza edilmiş olan bitkilerde mitotik aktivitenin oldukça düşük çıkmış olmasının, düşük sıcaklıkta bitkilerde metabolik aktivitenin, besin ve su alımının yavaşlaması ve alınmış olan su ve besinin iletiminin zorlaşması nedenlerinden oluştuğu düşünülebilir. Nitekim bu düşünce Harrison ve Ark. (1998)’lerinin arpada ve Simon ve Ark. (1976)’lerinin hıyarda düşük sıcaklığın mitotik aktiviteyi düşürdüğü tespiti ile örtüşmektedir.

Bu bulgulara göre *in vitro* ve *in vivo* ortamda yetiştirilen bitkiler ile soğukta muhafaza edilen bitkiler arasında anatomik yapıları ve mitotik aktiviteleri açısından

farklılıklar oluştuğu görülmektedir. Ancak bu farklılıkların bitkilerin kültür ortamından normal ortama aktarılmasıyla ortadan kalkabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle, ayçiçeğinin soğukta muhafazası kullanılabilir bir yöntem olarak kabul edilebilir. Daha uzun süreli olarak yapılan çalışmalar ve besi yerine eklenecek bazı koruyucu maddeler ile bu yöntemler ayçiçeği için daha da geliştirilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] ARDA, H., MERİÇ, Ç., GÜLER, N., DAYAN, S., “Effect of Low Temperature on Morphological and Anatomical Features of *Dianthus ingoldbyi* Turill Shoots Propagated Via Tissue Culture Techniques” 5th Balkan Botanical Congress, September, 07-11,2009. Belgrade, Serbia.
- [2] ARORA, R., BHOJWANI S., S. “*in vitro* Propagation and Low Temperature Storage of *Saussurea lappa* C.B. Clarke - An Endangered, Medicinal Plant”. *Plant Cell Reports* 8:44-47, 1989.
- [3] BABAOĞLU, M., YORGANCILAR, M., AKBUDAK, M., A., “Doku Kültürü: Temel Laboratuar Teknikleri”, S:1-35, 2002, (Eds., BABAOĞLU, M., GÜREL, E., ÖZCAN, S., “Bitki Biyoteknolojisi, I- Doku Kültürü Ve Uygulamaları” II. Baskı, 374 S. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya.)
- [4] BARBARA, R., “Tissue Culture For Germplasm Conservation and Distribution” *Hortscience*, 40:981, 2005.
- [5] BHOJWANI, S., S. “A Tissue Culture Method For Propagation and Low Temperature Storage of *Trifolium Repens* Genotypes” *Physiologia Plantarum* 52(2) 187–190, 1981.
- [6] CHRAIBI, K., CASTELLE, J., C., LATCHE, A., ROUSTAN, J., P., FALLOT J., “A Genotype- Independent System of Regeneration From Cotyledons of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) The Role Of Ethylene”. *Plant Sci.* 86: 215-221, 1992.
- [7] DALE, P., J., A Method For *in vitro* Storage of *Lolium multiflorum* Lam, *Annual Botany* 45(5): 497-502, 1980.
- [8] EMEKLİLER, Y., “Germplasm Muhafazası”, s:282-323, 2002, (Eds. BABAOĞLU, M., GÜREL, E., ÖZCAN, S., Bitki Biyoteknolojisi, I- Doku Kültürü ve Uygulamaları, 374 s., Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya)

- [9] FREYSSINET, M., FREYSSINET, G., “Fertile Plant Regeneration From Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Immature Embryos” *Plant Science*, 56(2) 177–181, 1988.
- [10] GRECO, B., TANZARELLA, O.A., CARROZZO, G., BLANCO, A., “Callus Induction and Shoot Rejuvenation in Sunflower (*Helianthus annuus* L.)” *Plant Science Letters*, 36(1) 73–77, 1984.
- [11] HARRISON, J., NICOT, C., OUGHAM, H., “The Effect of Low Temperature on Patterns of Cell Division in Developing Second Leaves of Wild-Type and Slender Mutant Barley (*Hordeum vulgare* L.)” *Plant, Cell And Environment* 21, 79–86, 1998.
- [12] HATIPOĞLU, R., “Bitki Biyoteknolojisi”, Çukurova Üniversitesi Yayınları, No:197, Adana, 1999.
- [13] KAYA, Y., “Ayçiçeği Biyoteknolojisinde Son Gelişmeler ve Islahında Kullanım Olanakları” *Trakya University Journal of Science*, 5(2):141-147, 2004.
- [14] KNITTEL, N., ESCANDON, A., S., HAHNE, G., “Plant Regeneration at High Frequency From Mature Sunflower Cotyledons” *Plant Science*, 73(2) 219–226, 1991.
- [15] KOCAÇALIŞKAN, İ., “Bitki Fizyolojisi”, DPÜ Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kütahya, 2006.
- [16] LUNDERGAN, C., JANICK, J., “Low Temperature Storage of *in vitro* Apple Shoots” *HortScience*, 14:514—515, 1979.
- [17] MONDAL, T., K., BHATTACHARYA, A., OOD, A., AHUJA, P., S., “Propagation of Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) By Shoot Proliferation Of Alginate- Encapsulated Axillary Buds Stored at 4°C” *Current Science*, 83(8):941-944, 2002.
- [18] MURASHIGE, T., SKOOG, F., A., “A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay With Tobacco Tissue Cultures” *Physiol. Plant.*, 15: 473-479, 1962.
- [19] SIMON, E.W., MINCHIN A., MCMENAMIN M., M., SMITH J., M., The Low Temperature Limit For Seed Germination, *New Phitol.* 77, 301-311, 1976.