

Domuz Ayrığına (*Dactylis glomerata* L.) Olgun Embriyodan Bitki Rejenerasyonu

Esin ŞAHİN* Metin TOSUN Kamil HALİLOĞLU

Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 25240, Erzurum

*Yazışma yazarı: esinsahin@atauni.edu.tr

Geliş tarihi:05.03.2010, Yayına kabul tarihi:01.12.2010

Özet: Bu çalışmada, domuz ayrığı (*Dactylis glomerata* L.)'nin iki yabani ekotipine (Oltu, Ulubağ) ve iki çeşidine (ABD Islah, Amba) ait olgun embriyoların, doku kültürüne tepkileri belirlenmiştir. Araştırmada 2 oksin tipi (dikamba ve pikloram), bu oksin tiplerinin 3 farklı dozu (1,5 mg/l, 2,0 mg/l, 2,5 mg/l) ve kallus oluşumu aşamasında iki farklı dozda (20-30 g/l) sukroz kullanılmıştır. Uygulamaların kallus oluşum oranı üzerine etkisi önemsiz olmasına karşın, bitki rejenerasyonu üzerine etkisi çok önemli olmuştur. Bitki rejenerasyonu genotiplere, hormon tiplerine ve hormon dozlarına göre değişim göstermiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre domuz ayrığına olgun embriyodan bitki rejenerasyonu için pikloramın 1,5 mg/l'lik dozu uygun bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Dactylis glomerata*, embriyo, rejenerasyon

Plant Regeneration from Mature Embryo of Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.)

Abstract: In this research, response of mature embryos of two wild ecotypes and two cultivar of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) to tissue culture were investigated. In the study, 2 auxin types (dicamba and picloram), 3 different doses (1,5 mg/l, 2,0 mg/l and 2,5 mg/l) and 2 different doses of sucrose at callus stage were used. Although the effect of applications were not significant on callus formation ratio, it was significant on plant regeneration. Plant regeneration varied according to genotypes, hormone types and hormone doses. According to the results; 1,5 mg/l dose of picloram was found appropriate for plant regeneration from mature embryo.

Keywords: Orchardgrass, embryo, regeneration

Giriş

Domuz ayrığı, yaygın şekilde üretimi yapılan çok yıllık bir serin iklim yem bitkisidir (Lee et al. 2006). Geniş bir adaptasyon yeteneğine sahip olması, yumak meydana getirerek gölgeye ve kurağa karşı dirençlilik göstermesi ve ayrıca su baskınlarına karşı dayanıklı olması domuz ayrığı bitkisinin üstün özellikleri arasında sayılabilir (Hannaway et al. 1999, Serin ve Tan 1998).

Domuz ayrığı ıslah çalışmalarında, moleküler ıslah yöntemlerinin yüksek düzeyde kullanılabilmesi için, etkin bir *in vitro* rejenerasyon sistemine ihtiyaç duyulmaktadır. Doku kültürü çalışmalarında

en fazla kullanılan eksplant tipi olgunlaşmamış embriyo (Arzani and Mirodjagh, 1999) olmakla beraber, domuz ayrığına anter (Christensen et al. 1997), yaprak (Kuklin and Conger 1995, Tomaszewskiz et al. 1994, Somleva et al. 1993, Horn et al. 1988) ve tohum (Eunkyung et al. 2002, Sanghoon et al. 2004, Hyoshin et al. 2000) gibi değişik bitki eksplantları kullanılmıştır. Tüm bu çalışmalarda domuz ayrığı varyeteleri arasındaki kallus oluşum oranı, rejenerasyon etkinliği (Kiyong et al. 2003, Eunkyung et al. 2002), bitki büyüme düzenleyicilerinin ve antioksidanların kallus

oluşumu ve rejenerasyon üzerine etkisi (Kiwon et al. 2005, Sanghoon et al. 2004, Balan et al. 2001), antisitokininlerin etkisi (Somleva et al. 1995), bakırın rejenerasyon üzerine etkisi (Hyoshin et al. 2000) araştırılmıştır.

Eksplant kaynağı olarak kullanılan olgunlaşmamış embriyoların, daha uzun süre ve daha fazla finansman gerektirmesi sistemin etkinliğini sınırlandırmaktadır. Bu nedenle alternatif bir eksplant kaynağı olarak olgun embriyo kullanımının daha avantajlı olduğu düşünülmektedir. Olgun embriyoların kaynağı olan tohumlar kolaylıkla temin edilebildikleri ve depolanabildikleri için yılın her döneminde çalışma olanağı sağlamaktadırlar (Birsin ve Özgen 2004).

Bu çalışmamızın amacı eksplant kaynağı olarak olgun domuz ayrığı embriyolarından etkin bir kallus oluşumu ve bitki rejenerasyon sistemi geliştirmektir. Bu amaçla çalışmada, farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin ve dozlarının, farklı domuz ayrığı genotiplerinin kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bitki Materyali

Araştırma, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Bitki Moleküler Genetiği Laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada domuz ayrığı bitkisine ait iki yabancı ekotip (Oltu, Ulubağ) ve iki çeşit (ABD Islah, Amba) kullanılmıştır. Oltu ve Ulubağ ekotipleri Erzurum yöresinde doğal olarak yetişen yabancı domuz ayrığı bitkileri olup, daha önce yapılan bir çalışma kapsamında toplanmış ve çoğaltılmıştır (Tosun ve Sağsöz, 1994). ABD Islah çeşidi bölüm stoklarından, Amba çeşidi ise Çim Teknik firmasından temin edilmiştir.

Besi Ortamı

Domuz ayrığı bitkisinin tohumları % 70'lik alkol ile (EtOH) 5 dakika ve % 20'lik çamaşır suyu ile 15 dakika yüzey sterilizasyonundan sonra steril saf su ile 3 kez durulama işlemine tabi tutulmuştur. Kallus oluşumu için embriyolar phytigel (2

g/l) içeren MS (Murashige and Skoog 1962) ortamında 2 farklı oksin tipinin (dicamba ve picloram) 3 farklı konsantrasyonunda (1,5 mg/l, 2,0 mg/l, 2,5 mg/l) denemeye alınmışlardır. Ayrıca kullanılan ortama MES (1,95 g/l), L-glutamine (0,250 g/l), kazein hidrolizat (0,05 g/l), askorbik asit (100 mg/l) ve farklı konsantrasyonlarda (20-30 g/l) karbonhidrat kaynağı olarak sukroz ilave edilmiştir. Ortamın pH'sı 5,8'e ayarlandıktan sonra 20 dakika süreyle 121 °C'de 105 kPa'da otoklavda sterilizasyon yapılmıştır. Embriyolar stereo mikroskop altında tohumdan izole edildikten sonra MS besin ortamına aktarılmışlardır. Olgun embriyolar 25 °C'de karanlık ortamda 4 hafta süreyle bekletildikten sonra yine aynı ortama alt kültüre alınmışlardır. Bu süre içerisinde kallus gelişimi periyodik olarak gözlem ve kontrollere tabi tutulmuştur. 8 hafta sonra farklı gelişim aşamalarında olan kallus dokuları rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Rejenerasyon ortamı olarak modifiye edilmiş (0,2 mg/l 2,4-D; 1,96 g/l MES; 20 g/l sukroz ve 2 g/l phytigel) MS ortamı kullanılmıştır. Rejenerasyon ortamına aktarılan kalluslar 16 saat ışık 8 saat karanlık şartlarda 25 °C'de 4 hafta süreyle bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda sürgün oluşturan bitkiler yine rejenerasyon ortamı içeren kültür tüplerine aktarılmışlardır.

Verilerin İstatistiksel Analizi

Deneme, Tam Şansa Bağlı Deneme Desenine göre 4 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Her bir petri kabına 30 adet embriyo yerleştirilerek toplam 5760 adet tohum kullanılmıştır. İlk 60 günlük süre içerisinde kallus oluşum aşamalarına göre kayıtlar alınmıştır. Elde edilen kallus sayısı ortama konulan toplam tohum sayısına oranlanarak eksplant başına kallus oluşum oranı hesaplanmıştır. Rejenerasyon sonunda oluşan bitkicikler sayılarak, uygulama başına toplam bitki sayısı hesaplanmıştır. Elde edilen veriler SPSS istatistik paket programı kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuş ve uygulamalar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular

Kallus Oluşumu

Eksplantlar ortama konulduktan yaklaşık 2-3 gün sonra kalluslar oluşmaya başlamış ve 30 gün boyunca bu ortamda tutularak gelişmeleri sağlanmıştır (Şekil-1A). Diğer taraftan eksplantlar ortama konulduktan yaklaşık 15 gün sonra somatik embriyolar oluşmaya başlamıştır (Şekil- 1B).

Kallus oluşumu genotiplere göre değişim göstermiş, ancak aralarındaki farklılıklar önemsiz olmuştur. En yüksek

ortalama kallus oluşum oranı % 81,39 ile Amba çeşidinden elde edilmiştir. Bunu sırasıyla Oltu ekotipi (% 78,33), ABD Islah çeşidi (% 78,27) ve Ulubağ (% 75,49) ekotipi izlemiştir (Çizelge 1). Diğer taraftan kallus oluşum oranı üzerine şeker miktarlarının etkisi de önemsiz olmuş ve 30 g/l sukroz seviyesinin (% 79,41) 20 g/l'lik şeker seviyesine göre (% 77,33) daha yüksek oranda kallus oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Farklı şeker seviyeleri, oksin tipleri ve dozlarında genotiplerin eksplant sayısına göre kallus oluşumu (%).

Oksin tipi	Doz (mg/l)	Ulubağ		Oltu		Amba		ABD Islah		Ortalama	
		20 g/l	30 g/l	20 g/l	30 g/l	20 g/l	30 g/l	20 g/l	30 g/l	Oksin dozu	Oksin tipi
Pikloram	1,5	65,83	79,17	83,33	86,67	71,67	69,17	71,67	91,67	77,40	80,42
	2,0	73,33	82,50	83,33	82,50	81,67	90,83	91,67	89,17	84,38	
	2,5	76,67	72,50	81,67	81,67	77,50	81,67	77,50	86,67	79,48	
Dikamba	1,5	82,50	83,33	83,33	72,50	87,50	75,83	89,17	80,00	81,77	76,32
	2,0	78,33	74,17	78,33	57,50	85,00	82,50	65,83	67,50	73,65	
	2,5	77,50	60,00	62,50	86,67	84,17	89,17	45,83	82,50	73,54	
Genotip ort.		75,49		78,33		81,39		78,27		78,37	
Şeker ort.		20 g/l: 77,33		30 g/l: 79,41							

Oksin tipleri yönünden değerlendirme yapıldığında ve ortalama değerler dikkate alındığında kallus oluşum oranı bakımından pikloramın (% 80,42) dikambadan (% 76,32) daha üstün olduğu saptanmış, ancak oksin tipleri arasındaki farklılık önemsiz olmuştur. Ayrıca araştırmada kullanılan pikloramın 1,5; 2,0 ve 2,5 mg/l'lik dozlarında kallus oluşum oranları sırasıyla % 77,40, % 84,38, % 79,48 olarak belirlenmiş, dikambanın aynı dozlarında ise bu oranlar sırasıyla % 81,77, % 73,65, % 73,54 olarak tespit edilmiştir.

Oksin dozları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Diğer taraftan tüm faktörler dikkate alınarak

değerlendirme yapıldığında en yüksek kallus oluşum oranı (% 91,67) ABD Islah çeşidinde 20 g/l sukroz seviyesinde pikloramın 2 mg/l'lik dozundan ve 30 g/l sukroz seviyesinde pikloramın 1,5 mg/l'lik dozundan elde edilmiştir.

Bitki Rejenerasyonu

Kalluslar rejenerasyon ortamına aktarıldıktan sonra bir ay süreyle petri kutularında tutulmuşlar ve bu ortamda kök ve sürgün oluşumları sağlanmıştır (Şekil-1C). Daha sonra rejeneren bitkicikler test tüplerine alınmış ve bir ay süreyle gelişmeye bırakılmışlardır (Şekil-1D).

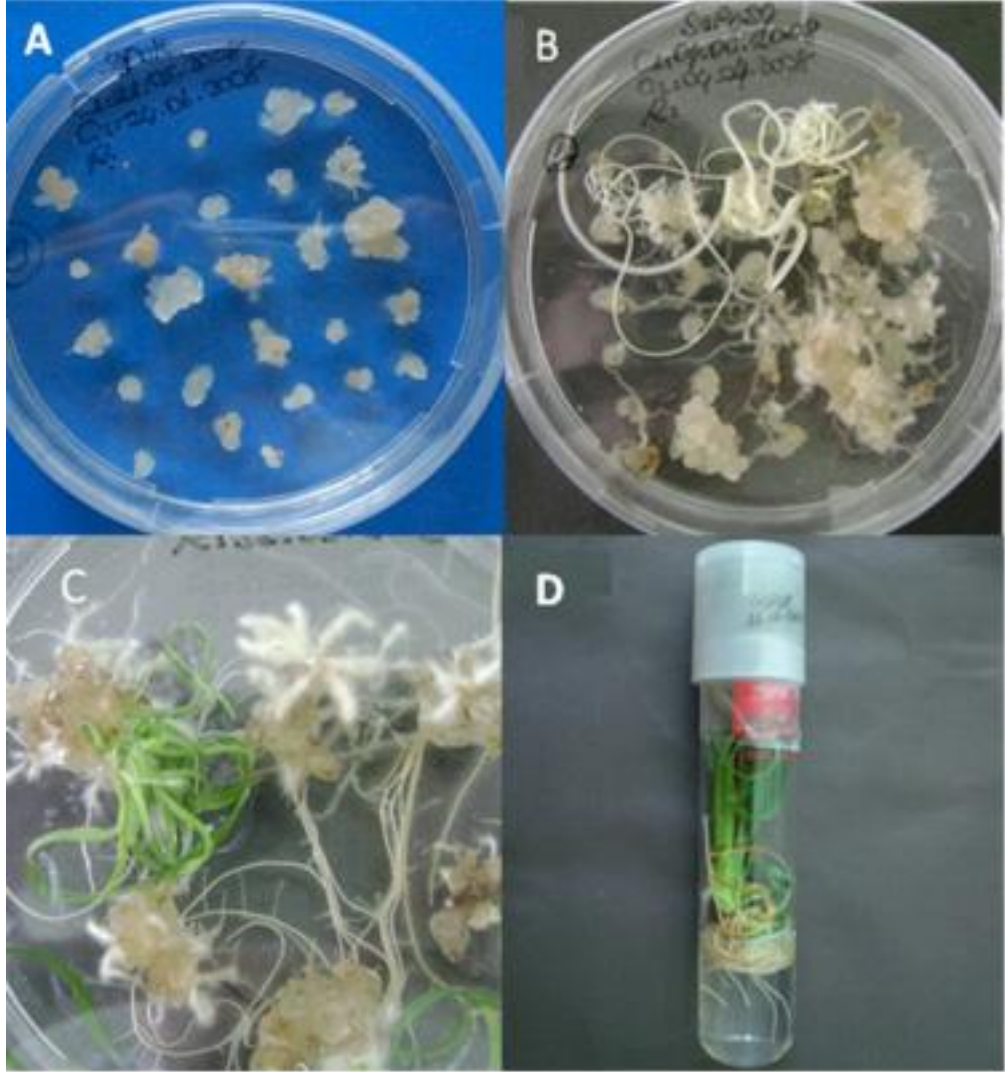
Çizelge 2. Farklı oksin tipleri ve dozlarında genotiplerden elde edilen rejeneren bitki sayısı

Oksin tipi	Doz	Genotip				Ortalama oksin dozu	Ortalama oksin tipi
		Ulubağ	Oltu	Amba	ABD Islah		
Pikloram	1,5	1	2	2	3	2,00	1,83
	2,0	0	1	6	0	1,75	
	2,5	3	1	3	0	1,75	
Dikamba	1,5	1	1	1	4	1,75	1,42
	2,0	0	0	0	1	0,25	
	2,5	0	0	8	1	2,25	
Ortalamalar		0,83 ^{c**}	0,83 ^c	3,33 ^a	1,50 ^b		

** : Aynı satırda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar çok önemlidir (p<0,01).

Rejenere olan bitki sayısı genotiplere göre değişmiş ve aralarındaki farklılıklar çok önemli ($p<0,01$) bulunmuştur. Ortalama rejenere bitki sayısı dikkate alındığında en yüksek rejenere bitki sayısı 3,33 adet ile Amba çeşidinden elde edilmiş, bunu 1,50 adet bitki ile ABD Islah çeşidi izlemiştir. Oltu ve Ulubağ ekotiplerinde ise toplam 0,83'er adet bitki oluştuğu belirlenmiştir (Çizelge 2).

Oksin tipleri yönünden değerlendirme yapıldığında rejenere bitki sayısı bakımından ortalama değerler dikkate alındığında pikloramin (1,83 adet) dikambadan (1,42 adet) daha üstün olduğu saptanmış ve oksin tipleri arasındaki farklılık çok önemli ($p<0,01$) olmuştur.



Şekil 1- A) Domuz ayrığı bitkisinden olgun embriyo kullanarak kallus oluşumu, B) Kallus üzerinde somatik embriyo oluşumu, C) *In-vitro* bitkicik rejenerasyonu, D) Test tüpü içerisinde rejenere olmuş domuz ayrığı bitkisi,

Ayrıca araştırmada kullanılan pikloramin 1,5; 2,0 ve 2,5 mg/l'lik dozlarında ortalama rejenere olan bitki sayısı sırasıyla 2,00, 1,75 ve 1,75 adet olarak belirlenmiş, dikambanın aynı

dozlarında ise bu değerler sırasıyla 1,75, 0,25 ve 2,25 adet olarak tespit edilmiştir.

Oksin dozları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak çok önemli ($p<0,01$) bulunmuştur (Çizelge 3). Oksin dozlarına

göre bitki sayısı en yüksek (2 adet bitki) oksinin 2,5 mg/l dozunda belirlenmiş, bunu 1,5 mg/l'lik dozu (1,88 adet bitki) ve 2,0 mg/l'lik dozu (1,00) izlemiştir.

Çizelge 3. Farklı oksin dozlarında, genotiplerden elde edilen ortalama rejenere bitki sayısı.

Oksin dozları	Ortalamalar
1,5	1,88 ^{b**}
2,0	1,00 ^c
2,5	2,00 ^a

** : Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar çok önemlidir (p<0,01).

Tüm uygulamalar dikkate alındığında en fazla rejenere bitki sayısının 8 adet ile Amba çeşidinden, dikambanın 2,5 mg/l dozundan elde edildiği görülmektedir.

Tartışma

Buğdaygiller rejenerasyon bakımından inatçı türler olarak bilinmekle birlikte (Lu and Vasil, 1981; Cutler et al. 2007), doku kültürü ortamının bileşiminde (Fennel et al. 1996), eksplant kaynağı (Redway et al. 1990), genotipte (Hyoshin et al. 1998; Liu et al. 2004) değişiklikler yapılarak sorunlar aşılabilmektedir.

Bu araştırmada kallus oluşumu genotiplere göre değişmekle birlikte genotipler arasındaki farklılıkta önemsiz olmuştur. Buna karşın bitki rejenerasyonu üzerine genotipin etkisi çok önemli olmuştur. Aynı şekilde domuz ayrığı üzerinde daha önce yapılan çalışmalarda da genotipin hem kallus hem de rejenerasyon üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Eunkyung et al. 2002; Sanghoon et al. 2006; Hyoshin et al. 1998; Lee et al. 2005; Kiyong et al. 1998). Genotiplerin doku kültürüne tepkilerinin farklı olması, kallus oluşumu ve rejenerasyonun çekirdekdeki veya sitoplazmadaki genler tarafından kontrol edilebileceğini göstermektedir (Peng and Hodges, 1989).

Denemede hormon çeşitlerinin ve dozlarının kallus oluşumu üzerine önemli bir etkisi bulunmamasına karşın bitki rejenerasyonu üzerine etkileri çok önemli olmuştur. Bitki büyüme düzenleyicileri *in vitro* çalışmalarda belirleyici rol

oynamaktadır. Buğdaygillerde diğer oksin tipleri yanında, pikloramin ve dikambanın etkili oldukları belirlenmiştir (Zhong et al. 1991). Bu araştırmada bitki rejenerasyonu üzerine pikloramin dikambadan daha etkili olduğu belirlenmiştir. Buna karşın domuz ayrığında eksplant kaynağı olarak tohumun kullanıldığı bazı çalışmalarda ise en iyi sonuç dikambanın 3 mg/l'lik dozundan elde edilmiştir (Hyoshin et al. 1998; Kiyong et al. 1998). Bulgular arasındaki bu farklılık araştırmada kullanılan genotiplerin farklı olmasından kaynaklanabilir.

Sonuç

Uygulamaların kallus oluşum oranı üzerine etkisi önemsiz olmasına karşın, bitki rejenerasyonu üzerine etkisi çok önemli olmuştur. Bitki rejenerasyonu genotiplere, hormon tiplerine ve hormon dozlarına göre değişim göstermiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre domuz ayrığında bitki rejenerasyonu için pikloramin 1,5 mg/l'lik dozu önerilebilir. 1,5 mg/l pikloramin dozu denenilen tüm genotiplerde sonuç vermiştir. Fakat 2,5 mg/l'lik uygulama sadece bir genotipte yüksek sonuç verirken diğerlerinde hiç veya az sayıda rejenerasyon sağlamıştır. Bu açıdan 1,5 mg/l'lik doz uygulaması, genotipe daha az bağlı olduğu için önerilmiştir. Ancak araştırmada elde edilen rejenere bitki sayısının yetersiz olduğu düşünülmekte, bu nedenle farklı oksin tipleri ve dozlarının ayrı ayrı veya kombine halde denenmelerinin yararlı olacağı önerilmektedir.

Kaynaklar

- Arzani, A. and Mirodjagh, S.S. 1999. Response of durum wheat cultivars to immature embryo culture, callus induction and in vitro salt stress. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 58:67-72.
- Balan, M., Breazu, I. and Sand, C. 2001. Plant regeneration from callus induced from different explants of *Dactylis glomerata* L. on media with various phytohormonal composition. *Journal article, Volume: 55-56 Issue: 191.*

- Birsin, M.A. and Özgen, M., 2004. A comparison of callus induction and plant regeneration from different embryo explants of triticale (*Triticosecale Wittmack*). Cellular and Molecular Biology Letters, Volume:9 Pages: 353-361.
- Christensen, J.R., Borrino, E., Olesen, A. and Andersen S.B. 1997. Diploid, tetraploid and octoploid plants from anther culture of tetraploid orchardgrass, *Dactylis glomerata* L. Plant Breeding, 116, Pages:267-270.
- Cutler, A.J., Saleem, M. and Wang H. 2007. Cereal protoplasts recalcitrance. In Vitro Cellular Developmental Biology, Pages: 104-111.
- EunKyung, B., InAe, L., KiYong, K., ByungHyun, L., Daeyoung, S., Hyoshin, L. MinSup, C. and Jinki, J. 2002. Comparison of callus formation ratios from seed explants, callus sizes and regeneration efficiency among several orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) varieties. Journal of the Korean Society of Grassland Science, Volume: 22 Issue: 2 Pages: 93-100.
- Fennel, S., Bohorova, N., Ginkel, M., Crossa, J. and Hoisington, D.A., 1996. Plant regeneration from immature embryos of 48 elite CIMMYT bread wheats. Theor Appl. Genet., 92:163-169.
- Hannaway, D., Fransen, S., Cropper, J., Teel, M., Chaney, M., Griggs, T., Halse, R., Hart, J., Cheeke, P., Hansen, D., Klinger, R. and Lane, W. 1999. Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) Extension & Station communications. PNW 502. Oregon State University. Corvallis, USA. p. 18.
- Horn, M.E., Conger, B.V. and Harms, C.T. 1988. Plant regeneration from protoplasts of embryogenic suspension cultures of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). Plant Cell Reports, 7:371-374.
- HyoShin, L., ByungHyun, L., SungHye, W., SangHyun, L. and Jinki, J. 2000. Effect of copper on the plant regeneration from seed derived callus of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). Journal of the Korean Society of Grassland Science, Volume: 20 Issue: 4 Pages: 259-264.
- HyoShin, L., YongSham, K., ByungHyun, L., SangHyun, L. and Jinki, J. 1998. Plant regeneration from seed-derived callus in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). Journal of the Korean Society of Grassland Science, Volume: 18 Issue: 4 Pages: 285-290.
- HyoShin, L., YongSham, K., ByungHyun, L., SungHye, W., KiYong, K. and Jinki, J. 2000. Plant regeneration from embryogenic suspension culture of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). Journal of the Korean Society of Grassland Science, Volume: 20 Issue: 1 Pages: 7-12.
- KiWon, L., SangHoon L., DongGi, L., HyunSook, W., DoHyun, K., MyungSuk, C., KiYoung, K., Hyoshin, L. and ByungHyun, L. 2005. Effect of plant growth regulators and antioxidants on callus induction and plant regeneration from seed culture of orchardgrass. Journal of the Korean Society of Grassland Science, Volume: 25 Issue: 3 Pages: 191-198.
- KiWon, L., SangHoon, L., DongGi, L., HyunSook, W., DoHyun, K., MyungSuk, C., KiYoung, K., HyoShin, L., and ByungHyun, L. 2005. Effect of plant growth regulators and antioxidants on callus induction and plant regeneration from seed culture of orchardgrass. Journal of the Korean Society of Grassland Science, Volume: 25 Issue: 3 Pages: 191-198.
- KiYong, K., KyungMin, K., EunKyung, B., InAe, L., YongWoo, R., GiJun, C., GeunJe, P., DaeYoung, S. and Jinki, J. 2003. Callus formation ratio and regeneration efficiency of orchardgrass varieties developed in Korea. Journal of the Korean Society of Grassland Science, Volume: 23 Issue: 1 Pages: 59-64
- Kiyong, K., YongWoo, R., GiJun, C., JaeSoon, S., JeongGap, K. and Jinki, J. 1998. Rapid regeneration of plants

- on N6 medium from orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) calli. Journal of the Korean Society of Grassland Science, Volume: 18 Issue: 3 Pages: 267-272.
- Kuklin, A.I. and Conger, B.V., 1995. Enhancement of somatic embryogenesis in orchardgrass leaf cultures by epinephrine. Plant Cell Reports, 14:641-644.
- Lee, S.H., Lee, D.G., Woo, H.S., Lee, K.W., Kim, D.H., Kwak, S.S., Kim, J.S., Kim H., Ahsan, N., Choi, M.S., Yang, J.K. and Lee, B.H. 2006. Production of transgenic orchardgrass via *Agrobacterium*-mediated transformation of seed-derived callus tissues. Plant Science, Volume 171, Issue 3, Pages 408-414.
- Liu, G.S., Liu, J.S., Qi, D.M., Chu, C.C. and Li, H.J., 2004. Factors affecting plant regeneration from tissue cultures of Chinese leymus (*Leymus chinensis*). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 76:175-178.
- Lu, C. and Vasil, I.K., 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of *Panicum maximum*. Theoretical and Applied Genetics, 59:275-280.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant, 15, 473-497.
- Redway, F.A., Vasil, V., Lu, D. and Vasil, K., 1990. Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl. Genet., 79:609-617.
- SangHoon, L., DongGi, L. and ByungHyun, L. 2004. Effects of medium supplements on seed-derived callus culture and regeneration of orchardgrass. Korean Journal of Crop Science, Volume: 49 Issue: 3 Pages: 232-236.
- SangHoon, L., KiWon, L., DongGi, L., DoHyun, K. and ByungHyun, L. 2006. Effect of orchardgrass varieties on callus culture and plant regeneration. Journal of the Korean Society of Grassland Science, Volume: 26 Issue: 4 Pages: 187-192.
- Serin, Y. and Tan, M. 1998. Buğdaygil Yem Bitkileri. Ziraat Fakültesi Ders Kitabı.
- Somleva, M., Kapchina, V., Alexieva, V. and Golovinsky, E. 1995. Anticytokinin effects on in vitro response of embryogenic and nonembryogenic genotypes of *Dactylis glomerata* L. Plant Growth Regulation, Volume: 16 Issue: 2 Pages: 109-112.
- Somleva, M., Odjakova, M. and Golovinsky, E. 1993. In-vitro effect of some pyrimidine analogs on embryogenic response of *Dactylis glomerata* leaf explants. Journal of Plant Physiology, Vol:142, Issue:6, Pages: 765-767.
- Tomaszewski, Z., Kuklin, A.I. Sams, C.E. and Conger, B.V., 1994. Influence of low-temperature preincubation on somatic embryogenesis and ethylene emanation from orchardgrass leaves. Plant Growth Regulation, Vol:14, Issue:3, Pages:229-234.
- Tosun, M. ve Sağsöz, S., 1994. Erzurum yöresinde doğal olarak yetişen domuz ayrığı (*Dactylis glomerata* ssp. *hispanica* (Roth) Nyman) bitkilerinde bazı morfolojik ve fenolojik özelliklerin belirlenmesi. Tarla Bitkileri Kongresi, İzmir. s 39-43.
- Zhong, H., Srinivasan, C. and Sticklen, M.B. 1991. Plant regeneration via somatic embryogenesis in creeping bentgrass (*Agrostis palustris*). Plant Cell Report, 10:435-456.