
Araştırma Makalesi / Research Article

Doku Kültüründe Üretilen Soya Fasulyesinde (*Glycine max* (L.) Merrill) Somaklonal Varyasyonların Araştırılması

Özlem EFENDİOĞLU¹, Musa TÜRKER¹, Fethi Ahmet ÖZDEMİR^{*2}

¹Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Van

²Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bartın

Özet

Bu çalışmada soya fasulyesi (*Glycine max* (L.) Merrill) bitkisinin, Agrova SA88 varyetesi *in vitro* koşullarda çimlendirilmiştir. Çimlendirilen fidelerden alınan gövde ucu, boğum, yaprak, petiyol, kök, kotiledon ve hipokotil eksplantları Murashige Skoog (MS) ve Gamborg's B5 ortamlarına konulup, farklı bitki büyüme düzenleyicileri ile muamele edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin soya fasulyesi bitkisinin somaklonal varyasyonları üzerine etkileri araştırılmıştır. Toprakta normal şartlarda yetiştirilen bitki ve farklı bitki büyüme düzenleyicileri uygulanmış ortamlarda yetişen doku ve organlardan DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri ile PCR kurulmuş ve olası varyasyonlar rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) primerleri ile test edilmiştir. Bunun sonucunda herhangi bir somaklonal varyasyonun oluşmadığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bitki büyüme düzenleyicileri, Soya fasulyesi, Somaklonal varyasyon, RAPD

Investigation Of The Somaclonal Variations In Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) Grown In Tissue Culture

Abstract

In this study, soybean plant's (*Glycine max* (L.) Merrill) Agrova SA88 variety was germinated under *in vitro* conditions. The offshoot, internode, leaf, petiole, root, cotyledon and hypocotyl explants taken from the germinated seedlings were put to Murashige Skoog (MS) and Gamborg's B5 medium and treated with different plant growth regulators. The effects of plant growth regulators on somaclonal variations of soybean were studied. DNA extractions were made from the plants, which naturally grow under normal conditions on the soil, and from the tissues and organs grown in mediums with different plant growth regulators. PCR was set up using the obtained DNA samples and possible variations were tested with randomly reproduced polymorphic DNA (RAPD) primers. It was observed that no somaclonal variation was present.

Keywords: Plant growth regulators, Soya bean, Somaclonal variation, RAPD

1. Giriş

Soya, bitki gelişimi, verim ve kalite açısından ekolojik koşullara tepkisi oldukça yüksek olan kültür bitkilerindendir. Özellikle gün uzunluğu, soya çeşitlerinin adaptasyon alanlarını dar bir kuşak içerisine sınırlamaktadır. Yapılan çalışmalarda soya fasulyesinin farklı olgunlaşma grubuna giren çeşitlerin performanslarının bölgelere göre değiştiği gibi bir bölgede aynı olgunlaşma grubu içerisindeki çeşitlerin göstermiş olduğu performansların da farklı olduğu görülmektedir [1]. Soya, önemli bir besin kaynağıdır. Tohumu yüksek oranda ham protein içermektedir. Bu protein, kolay sindirilen proteinlerdendir. En çok cholin, pantothenic asit, niacin, thiamine, riboflavin, inositol, vitamin E, vitamin K içermektedir. Soya A vitamini ve B grubu vitaminlerinin de kaynağıdır [2].

Soyanın beslenme ve yağ eldesi adına önemi, 1940'lara kadar anlaşılammıştır. 1940'lardan sonra soya yetiştiriciliği ve genetiği üzerinde Amerika'da yoğun araştırmalar başlatılmıştır [3]. Öyle ki

* Sorumlu yazar: ozdemirfethiahmet23@yahoo.com

aşırı yağlı besinlerle kolesterol yüklemesi yapan Amerikalılar kurtuluşu soya fasulyesinde aramışlardır. Yapılan araştırmalar ile soya fasulyesinin kolesterolü düşürdüğü, göğüs kanserini önlediği ve kemikleri güçlendirdiği tespit edilmiştir. Soya fasulyesinin ürün verme süresi tohumdan itibaren yaklaşık olarak 120 gündür [4]. Bu süre kısa zamanda ürün elde etmek isteyenler için oldukça uzun bir süredir. Doku kültürü ortamında bu süre kullanılan yöntemle bağlı olarak 2 aya kadar düşürülebilmektedir.

Bitki hücre ve doku kültürü çalışmaları *in vitro* şartlarda gerçekleştirildiği için, rejenerasyonun yapıldığı fiziki ortam şartlarından veya ortamda kullanılan kimyasal maddelerden kaynaklanan gen düzeyinde birtakım farklılıkların meydana gelmesi muhtemeldir. Bu değişikliklere somaklonal varyasyonlar denir. Bu değişiklikler doku kültürü çalışmalarının her safhasında meydana gelebilir. Somaklonal varyasyonların nedenleri; bitkinin genotipi, ortam komponentleri ve kullanılan doku kültürü yöntemleri olabilir [5, 6]. Örneğin ortamda kullanılan yapay bir oksin türevidir ve aynı zamanda herbisit olarak bilinen 2,4-D'nin havuç hücre kültüründe DNA'nın metilasyonuna ve dolayısı ile havuç kültürünün gelişmemesine neden olduğu kaydedilmiştir [7]. Yine yüksek konsantrasyonlu oksin ve sitokininin deforme olmuş ve birbirinden ayrılmayan gövde sürgünü oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir [8]. Bazı bitkilerin doku kültüründe RAPD markırları ile yapılan testlerde herhangi bir varyasyona rastlanmamıştır [9]. Soya fasulyesi kültürlerinde yapılan somaklonal varyasyon testlerinde bitki büyüme düzenleyicileri ile rejenere edilen soya fidelerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir [10]. Doku kültüründe embriyogenik ve organogenik kültürlerde rejenere edilen soya bitkilerinde kısmi albinoluk, ikiz embriyolar, birden fazla ve cüce gövdeler, anormal yaprak morfolojisi ve yaprak kıvrımları, kısırılık ve klorofil eksiklikleri gözlenmiştir [11]. Somatik embriyolardan rejenere edilen soya fasulyesi bitkilerinde RAPD primerleri kullanılarak yapılan somaklonal varyasyon testlerinde polimorfizm gözlenmiştir [12]. Roth ve arkadaşlarının [13] RFLP (Restricted Fragment Length Polymorphism) primerleri kullanarak soya kültürlerinde yaptıkları genetik varyasyon testlerinde polimorfizm gözlemişlerdir.

Literatürde yer alan çalışmalarda somaklonal varyasyon tespitleri rapor edilmekle beraber bazı çalışmalarda da somaklonal varyasyon gözlenmediği rapor edilmiştir. Bu çalışmada da soya bitkisinin Agrova SA88 çeşidinde klonal üretim gerçekleştirilerek, kullanılan kültür bileşenlerinin özellikle bitki büyüme düzenleyicilerinin somaklonal varyasyon meydana getirip getirmediğini test etmek amacı ile RAPD-PCR tekniği uygulanmıştır. Her bir türün hatta tür içindeki kategorilerin doku kültürü bileşenlerine verdikleri cevaplar farklı olabilmektedir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada soya fasulyesi (*Glycine max* (L.) Merrill) bitkisinin Agrova SA88 çeşidi kullanılmıştır. Soya fasulyesi tohumları Adana Tarım İl Müdürlüğünden temin edilmiştir.

2.2. Sterilizasyon

Kullanılan petri, erlen gibi cam malzemeler ile pens, bistüri gibi ekipmanlar ve çalışmada kullanılmış olan Murashige ve Skoog, Gamborg's B5 (Duchefa, Netherland) besin ortamı 1.5 atmosfer basınç altında 121 °C de farklı sürelerde tutularak sterilizasyonu sağlanmıştır.

Sağlam olarak seçilen soya fasulyesi tohumları önce 5 dk. steril saf su içerisinde bekletilmiş. Buradan alınan tohumlar ilk önce %70'lik etanol içerisinde 30 sn., ardından %70'lik ticari çamaşır suyu (ACE-Türkiye, %5 NaOCl) içerisinde 15 dk. tutulmuştur. Bu aşamadan sonra soya tohumları steril saf su ile 3 kez durularak, otoklavlanmış kurutma kağıtları üzerinde kurutulmuştur. Hormonsuz besin ortamlarına her erlene 3 adet soya tohumu gelecek şekilde ekim yapılarak bu ortamlarda çimlendirilmiştir.

2.3. Büyüme Ortamları ve Kültür Koşulları

Denemelerde Murashige ve Skoog (MS) ve Gamborg's B5 besin ortamları kullanılmış. Bu ortamlar içerisine %3 sükröz ilave edilmiş ve % 0.8 agar (Sigma) ile katıştırılmıştır. Ortam hazırlandığında çift distile saf su kullanılmış olup, besin ortamının pH'sı 1M NaOH ve 1M HCl kullanılarak 5.8 e ayarlanmıştır.

2.4. Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) Merck ve Sigma şirketlerinden temin edilmiştir. BBD'ler uygun çözücülerde çözdürüldükten sonra istenilen miktarda ve oranda stok solüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan BBD stok solüsyonları 4 °C'de saklanmıştır.

2.5. Kullanılan RAPD primerleri

Bu çalışmada kullanılan primerler ve nükleotid dizileri aşağıdaki gibidir.

Kullanılan Primer	Nükleotid Dizisi
CS-44	ATTCGGCCGC
CS-46	GGGATCTAGC
CS-56	TGGTGGGTCC
OH-04	GGAAGTCGCC
OR-12	ACAGGTGCGT
OS-03	CAGAGGTCCC
SA-F	CGGCCCGTT
SA-R	AGGTCACGTA

2.6. Somaklonal Varyasyonlar

Soya fasulyesinin klonal üretimi esnasında meydana gelen kallus, adventif sürgün ve doğal ortamda yetişen bitkilerden DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş. Seçilen örneklerin farklı bitki büyüme düzenleyicileri ile üretilmiş doku ve organlar olmasına özen gösterilmiş ve bu amaçla 2,4-Dikloro fenoksi asetik asit (2,4-D) ile üretilmiş kallus, kinetin (K) ve benzil amino pürin (BAP) ile çoğaltılmış adventif sürgün, BAP ile elde edilmiş kallus ve doğal ortamda yetiştirilmiş soya fidesi kullanılmıştır. DNA ekstraksiyonu için, tek bir fideden elde edilen eksplantlar kullanılmıştır. DNA ekstraksiyonunda kullanılacak tüm malzeme ve çözeltiler otoklavda steril edilmiştir.

2.7. Tampon ve Stok Çözeltiler

Ekstraksiyon tamponu: 2% CTAB (Sigma Chemical Co., Poole, UK.), 1% PVP 40.000 (Sigma Chemical Co., Poole, UK.), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) (Boehringer Mannheim, Lewes UK.), 20 mM EDTA (Sigma Chemical Co., Poole, UK.), 1.4 M NaCl bidistile steril su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

TBE tamponu: 1.4 M Tris, 1.4 M borik asit (BDH, Merck Ltd., Poole, UK.), 0.01 M EDTA

DNA yükleme tamponu: 25% sukroz, 0.05% w/v bromophenol blue, Xylene cyanol FF (Sigma Chemical Co., Poole, UK.).

Jel boyama: Ethidium bromide (Sigma Chemical Co., Poole, UK.), 10mg/mL stok çözelti olarak hazırlanmış ve karanlıkta saklanmıştır. Kullanılacağı zaman son konsantrasyon 0.1 mg/mL olacak şekilde seyreltilmiştir.

dNTP karışımı: 1 mM dATP, dATP, dGTP, dCTP

Taq DNA polimeraz reaksiyon tamponu (10 X Stok): 200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500mM KCl.

Kullanım konsantrasyonu 1X dir.

Taq DNA polimeraz: Taq polimeraz enzimi, tamponu ve MgCl₂

2.8. DNA Ekstraksiyonu ve Kantitatif Tayini

0.5 g taze bitki örnekleri sıvı azot ile önceden soğutulmuş havan içinde tamamen toz haline gelinceye kadar ezilmiştir. Ezilen bitki örnekleri önceden sıvı azotta soğutulmuş spatül ile 1.5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmış üzerine 1 ml önceden 55 °C'ye kadar ısıtılmış CTAB ekstraksiyon çözeltisi eklenmiştir. Tüpler 55 °C'de her 15 dk. da bir çalkalanmak sureti ile 1 saat inkübe edildikten sonra 5 dk. 12.000 rpm de santrifüj edilmiştir. Tüplerin üzerindeki tabaka temiz ependorf tüplerine aktarılıp üzerine kendi hacmi kadar kloroform ilave edilmiştir. 2 dk. iyice çalkalandıktan sonra 5 dk. 12.000 rpm de santrifüj edilmiştir. Üstteki tabaka alınarak hacminin 2/3'ü kadar önceden soğutulmuş izopropanol (Sigma Chemical Co., Poole, UK.) eklenmiş ve yavaş bir şekilde defalarca ters çevirme hareketi yaptırılmıştır. Örnekler 15 dk. derin dondurucuda saklanarak aynı hareket birkaç defa daha tekrarlanmıştır. Ardından 30 saniye 12.000 rpm de santrifüj edilmiştir. İzopropanol dökülüp ependorf içinde kalan DNA pelleti üzerine 0.5 ml önceden soğutulmuş %70'lik etanol ilave edilmiştir. Tüpler yumuşak bir şekilde ters yüz edilerek DNA'nın iyice yıkanması sağlanmıştır. Alkol uzaklaştırılarak DNA kurutulmuş ve bidistile suda çözünerek -20 °C de DNA örnekleri saklanmıştır. Elde edilen

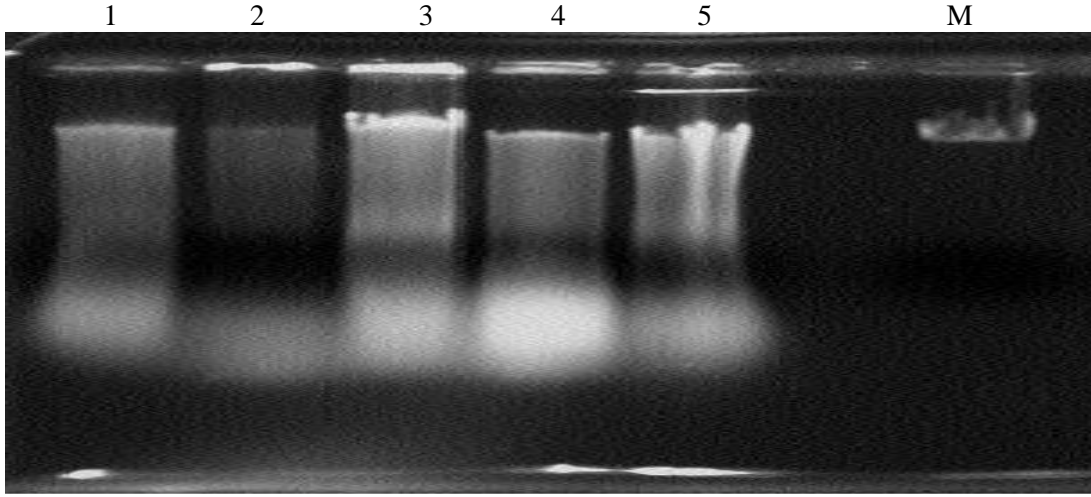
DNA'nın kantitatif tayini, miktarı önceden bilinen kesilmemiş λ DNA ile mukayese edilerek hesaplanmıştır. Bunun için % 0.7 lik agaroz jel 1X TBE tamponu içinde eritilerek hazırlanmıştır. Jel taraklarından 2 mm derinliğinde havuzlar oluşturularak erimiş agaroz, jel tankına dökülüp soğumaya bırakılmıştır. Jel soğuduktan sonra tarak çıkarılarak jel içinde havuzlar oluşturulmuştur. Tankın üzeri kapanıncaya kadar 1X TBE tamponu ilave edilmiştir. Havuzlara 10 μ L DNA ve 4 μ L yükleme tamponu yerleştirilmiştir. Bir havuza da miktarı bilinen kesilmemiş λ DNA ve yükleme tamponu yüklenmiştir. DNA örnekleri güç kaynağında 50 V da 2 saat yürütülerek boyama tamponu ile boyanıp UV altında fotoğrafı çekilmiştir. Miktarı bilinen DNA ile ekstre edilen DNA karşılaştırılarak miktar tayini yapılmıştır.

2.9. RAPD Primerleri ile DNA Çoğaltımı

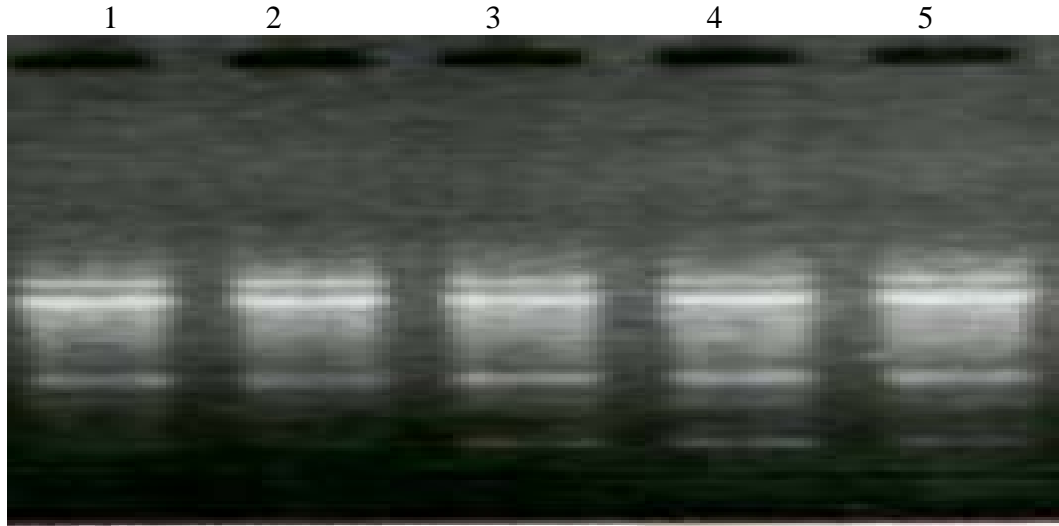
Çalışmada kullanılan RAPD primerleri (Operon Technologies) 10 DNA bazı içermektedir. Bu çalışmada 8 farklı RAPD primeri kullanılmıştır. Fakat bunlardan AGGTCACGTA dizisine sahip SA-R primeri ile elde edilen amplifikasyon örneği net bir şekilde varyasyon hakkında bilgi verebilecek düzeyde görülmüştür. Diğer primerlerin bir kısmında DNA profili tümüyle bazılarında ise kısmen gözlenmiştir. PCR koşulları Williams ve arkadaşlarının [14] metodu modifiye edilerek hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı şu şekildedir: 1X Taq polimeraz tamponu, 200 μ M her bir dNTP den, 0.2 μ M primer, 25 ng kalıp DNA, 1.5 ünite Taq polimeraz enzimi ve 1.5 mM MgCl₂. Reaksiyon karışımı üzerine DNaz ve RNaz dan arındırılmış su ilave edilerek 50 μ L ye tamamlanmıştır. PCR programı aşağıdaki şekildedir. 94 °C de 5dk bir döngü, 1dk 92 °C de, 1.5 dk. 35 °C de, 2 dk. 72 °C de 45 döngü, 5 dk. 72 °C 1 döngü şeklindedir. Çoğalan DNA bant profilinin belirlenmesi için agaroz jel elektroforez işlemi aynen DNA'nın kantitatif tayini işlemindeki basamaklar takip edilerek yapılmıştır. Buradaki tek istisna agaroz jel konsantrasyonunun %1.4 olmasıdır. UV altında görüntülenen DNA bantları karşılaştırılarak polimorfizm tespit edilmiştir.

3. Bulgular

Bu çalışmada soya fasulyesi fide eksplantları MS ve B5 ortamlarında farklı bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) konsantrasyonları ve kombinasyonları kullanılarak kallus ve adventif sürgünler elde edilmiştir. Ortamda kullanılan kimyasallar özellikle bitki büyüme düzenleyicilerinin bitki genomu üzerinde bir takım değişikliklere yol açtığı bilinmektedir. Bu amaçla özellikle yüksek BBD konsantrasyonunda yetiştirilen kallus ve sürgünlerden ekstre edilen DNA örnekleri RAPD (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) testlerine tabi tutulmuştur. Bunun için 2,4-D, Kinetin ve BAP uygulamaları yapılmış kallus, adventif sürgün ve BBD içermeyen tabi ortamda yetişen bitkilerden DNA ekstre edilmiş. Primerler kullanılarak PCR ile DNA çoğaltılmış ve varyasyon olup olmadığı gözlenmiştir. Markır olarak 1 μ g kesilmemiş λ DNA kullanılarak doku ve organlardan ekstre edilen DNA miktarları mukayese edilmiştir. Buna göre 2,4-D kullanılarak hazırlanan ortamdan elde edilen 0.5 g kallustan yaklaşık olarak 0.5 μ g DNA, kinetin kullanılarak hazırlanan ortamdan elde edilen 0.5 g fide yapraklarından 2 μ g, BAP kullanılarak hazırlanan ortamdan elde edilen fideden alınan 0.5 g taze örnekten elde edilen DNA miktarı 3.5 μ g, tabii ortamda yetiştirilen bitkinin 0.5 g yapraklarından elde edilen DNA miktarı 1.5 μ g, BAP ile elde edilen 0.5 g kallustan elde edilen DNA miktarı ise 1.25 μ g olarak tespit edilmiştir (Şekil 1). Elde edilen konsantre DNA örnekleri, DNA ve RNA parçalayıcı enzimlerden ari bidistile ve steril su kullanılarak tümü aynı konsantrasyona gelecek şekilde seyreltikten sonra materyal metot bölümünde açıklandığı şekilde PCR kurulmuş ve ardından jel görüntüsü elde edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 1. Estre edilen DNA örnekleri M: Marker 1. 2,4-D ile elde edilmiş kallus 2. Kinetin ile elde edilmiş fide 3. BAP ile elde edilmiş fide 4. Tabii ortamda yetişmiş bitki 5. BAP ile elde edilmiş kallus.



Şekil 2. Ekstre edilen DNA örneklerinin SA-R primeri ile PCR reaksiyonunda çoğaltılması 1. 2,4-D ile elde edilmiş kallus 2. Kinetin ile elde edilmiş fide 3. BAP ile elde edilmiş fide 4. Tabii ortamda yetişmiş bitki 5. BAP ile elde edilmiş kallus

Şekil 2'deki jel görüntüsüne göre kullanılan kimyasal maddelerin ve kültür ortamı şartlarının herhangi bir somaklonal varyasyona neden olmadığı söylenebilir. Birinci ve ikinci örneklerde en küçük moleküler ağırlığa sahip olan dördüncü veya en altta bulunan bantlar, az üretilmeleri nedeni ile silik görülmele beraber dikkatle bakıldığında varlıkları tespit edilebilir. Bu nedenle tüm örneklerin band profillerinin monomorfik olduğu söylenebilir.

4. Tartışma

İnsanların beslenmesi yönünden önem taşıyan bitkilerin, verimini, hastalık ve zararlılara karşı dirençlerini arttırmak amacı ile gerçekleştirilen klasik ıslah metotlarının yanı sıra günümüzde doku kültürü ve biyoteknoloji sayesinde her yönü ile istenen özelliklere sahip bitki türlerinin üretimi çok daha kısa sürelerde ve kontrollü koşullarda elde edilerek bu bitkilerin doğa koşullarına uygun hale getirilmesi mümkündür. Ancak, doku kültürü çalışmaları rejenere edilen bitkilerde bazı genetik varyasyonlara yol açabilmektedir. Bu varyasyonların bir kısmı arzu edilen bazı ekonomik karakterlerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Bu amaçla doku kültüründe özellikle genetik varyasyon çalışmaları da yapılmaktadır.

Bu çalışmada ekonomik ve besin değeri yüksek olan soya fasulyesi doku kültüründe klonal olarak üretilmiş, bu esnada meydana gelebilecek olası somaklonal varyasyonlar RAPD-PCR

(polimeraz zincir reaksiyonu ile rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA segmentleri) yöntemi ile test edilmiştir. Bu konuda önemli sonuçlar elde edilmiş olmasına rağmen daha yoğun ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Somaklonal varyasyonların saptanmasında RAPD yöntemi, pratik, radyoaktif madde kullanılmadığı için güvenli ve sağlıklı sonuçlar vermektedir. Somaklonal varyasyonların tespitinde ne kadar çok primer kullanılırsa o kadar sağlıklı sonuçlar elde edilir. Yapılan bu çalışmada kullanılan primer sayısı çok yüksek olmamakla birlikte, varyasyonların tespiti konusunda bir primerden sağlıklı sonuçlar alınmıştır. Doku kültüründe rejenere edilen soya fasulyesi genellikle somaklonal varyasyon göstermektedir [10-13]. Bulgularımız bu çalışmalarla paralellik göstermemektedir. Çeşitli bitkilerle yapılan çalışmalarda varyasyon tespiti fazla olmakla birlikte, varyasyon tespit edilememiş çalışmalar da vardır. Dolayısı ile bu çalışmalar bizim bulgularımızla örtüşmektedir. Kullandığımız ortam komponentleri ve çevre şartlarının somaklonal varyasyona yol açıp açmadığının tespiti için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Genellikle varyasyonlar kallus kültürlerinde görülebilmektedir. Nedeni ise kallus hücrelerinin daha kararsız ve ortam şartlarından etkilenmeye en açık kültür çeşidi olmasıdır [15]. RAPD primerleri genom üzerinde kendi komplementlerini bularak o bölgelere tutunurlar. Dolayısı ile primerin komplementeri olan bölgeden kaç adet varsa o sayıda bant üretirler. Böylece aynı primerler farklı genomlarda farklı sayıda bant üretirler. şayet, primerlerin komplementeri genom üzerinde bulunmuyorsa primer tutunacak bölge bulamaz ve herhangi bir bant üretmez. Bulgularımızda kullanılan primerlerden sadece birinde sonuç alınabilmesinin nedeni primerlerin komplementlerinin genom üzerinde bulunmaması ihtimali yanında deneysel hatalardan da kaynaklanmış olabilir. Bu nedenle, doku kültürü ortam bileşenlerinin özellikle BBD'lerinin somaklonal varyasyona neden olup olmadığı konusunda kesin bir sonuca varabilmek için çok sayıda primerler kullanılarak ve ortam bileşenleri kontrollü bir şekilde değiştirilerek ayrı ayrı test edilmeli veya daha hassas yöntemler kullanılmalıdır. Böylece hem varyasyonun kaynağı hem de dozu tespit edilebilir.

Kaynaklar

1. İşler N., Çalışkan M. E. 1998. GAP bölgesi ekolojik koşullarında soyada (*Glycine max* (L.) Merrill) verim ve verime etkili bazı özelliklerin korelasyonu ve path analizi. *Tr. J. Of Agriculture and Forestry*, 22: 1-5.
2. Shurpalekar S. A. 1961. Chemical composition and nutritive value of soybeans and soybeans products. *Soybeans concil of America, international Office*. 11(2): 7-12, Roma.
3. Fehr W. R. 1987. Breeding methods for cultivar development in B. E. Caldwell (Ed) soybeans. Improvement, production and uses, *Agronomy*, 16: 249-294.
4. Yılmaz H. A., Efe L. 1998. Bazı soya (*Glycine max* (L.) Merrill) çeşitlerinin Kahramanmaraş koşullarında 2. Ürün olarak yetiştirilebilme olanakları. *Tr. J. Of Agriculture and Forestry*, 22: 135-142.
5. George E. F., Sherrington P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture. *Handbook and directory of commerical laboratories*. Exegetics Ltd., 73-87.
6. Karp A. 1989. Can genetic instability be controlled in plant tissue culture? *International association of plant tissue culture newsletter*, 58: 2-11.
7. Loschiavo F., Pitto L., Giuliano G., Torti G., Nutironchi V., Marazziti D., Vergara R., Orselli S., Terzi M. 1989. DNA methylation of embriyogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor. Appl. Genet.*, 77: 325-331.
8. Verga A., Thomas L. H., Bruinsma J. 1988. Effects of auxins on epigenetic instabilty of callus propagated *Kalanchoe blossfeldiana* poelln. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 15: 223-231.
9. Goto S., Thakur R. C., Ishii K. 1998. Determination of genetic stability in long term micropropagated shoots of *Pinus thunbergii* parl. Using RAPD markers. *Plant Cell Reports*, 18: 193-197.

10. Freytag A. H., Rao-Arelli A. P., Ananda S. C., Wrather J. A., Owens L. D. 1989. Somaclonal variations in soybean plants regenerated from tissue culture. *Plant Cell Reports*, 8(4):199-202.
11. Barwale U. B., Widholm J. M. 1987. Somaclonal variation in plants regenerated from cultures of soybean. *Plant Cell Reports*, 6(5): 365-368.
12. Gesteira A. S., Otoni W. C., Barros E. G., Moreira M. A. 2012. RAPD based detection of genomic instability in soybean plants derived from somatic embryogenesis. *Plant Breeding*, 18: 193-197.
13. Roth J. E., Frazier B. L., Apuya N. R., Lark K. G. 1989. Genetic variation in an inbred plant: variation in tissue cultures of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Genetics*, 121: 359-368.
14. Williams J. G. K., Hanafey M. K., Rafalski J. A., Tingey S. V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymology*, 18: 704-740.
15. Shenoy V. B., Vasil I. K. 1992. Biochemical and molecular analysis of plants derived from embryogenic tissue cultures of napier grass (*Pennisetum purpureum* K. Schum). *Theor. And Appl. Genet.*, 83: 947-952.