

BAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi (1999). 1 (1)

**BETA VULGARIS L. (ŞEKER PANCARI) HİPOKOTİL
EKSPLANTLARININ SÜRGÜN REJENERASYONU ÜZERİNE
BAZI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN ETKİLERİ¹**

Güler ÇOLAK, Süleyman TOKUR

**Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Eskişehir**

ÖZET

Bu çalışmada *Beta vulgaris* L.cv. KWSTR-239 (şeker pancarı) tohumlarının in vitro şartlarda çimlendirilmesi sonucu elde edilen hipokotil eksplantlarının Murashige-Skoog temel besi ortamlarında, bazı bitki büyüme düzenleyicilerinin organogenetik etkilerine bağlı olarak adventif tomurcuk verme ve sürgün rejenerasyonuna etme imkanları araştırıldı. Çalışmada oksin olarak Naftalenasetik asit (NAA) ve 2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), sitokin olarak Kinetin (K) ve 6-Benzilaminopurinin (BAP) 8 farklı kombinasyon ve konsantrasyonu kullanıldı. Neticede *Beta vulgaris* L.cv.KWSTR-239 (şeker pancarı) hipokotil eksplantlarının adventif tomurcuk verimi ve sürgün rejenerasyonunda en etkin oksin-sitokin kombinasyonu NAA-BAP olarak belirlendi. Bunu NAA-K kombinasyonu ile elde edilen sonuçlar izledi. Ancak 2,4-D-K kombinasyonu içeren besi ortamlarında kültüre alınan hipokotil eksplantlarında, birbirini takip eden üç alt kültür gerçekleştirilmesine rağmen hiçbir zaman organogen faaliyetlere tanık olunamadı.

Anahtar Kelimeler: *Beta vulgaris*, şeker pancarı, in vitro, doku kültürü

¹ Bu çalışma Osmangazi Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

EFFECTS OF SOME PLANT GROWTH REGULATORS ON THE SHOOT REGENERATION OF HYPOCOTYL EXPLANTS OF *BETA VULGARIS* L.(SUGAR BEET)

ABSTRACT

In this study, it has been investigated that the possibilities of adventive bud giving and shoot regenerate of hypocotyl explants, obtained from *Beta vulgaris* L. cv. KWSTR-239 (sugar beet) which made sprouted in vitro conditions, depending upon organogenetic effects of some plant growth regulators in Murashige-Skoog basal medium. Different eight combinations and concentrations of Naphthaleneacetic acid (NAA) and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 6-Benzylaminopurine (BAP) and Kinetin (K) were used as auxine and cytokinin, respectively at the study. As conclusion, it was determined that the most effective combination of auxine-cytokinin is NAA-BAP in the adventitive bud giving and shoot regeneration of hypocotyl explants of *Beta vulgaris* L. cv. KWSTR-239 (sugar beet), and the results of combination of NAA-K follow this. In spite of realizing the sub-culture which follow each other within the mediums including the combination of 2,4-D-K, it doesn't observed any organogenic activities.

Key words : *Beta vulgaris*, sugar beet, in vitro, tissue culture,

1. GİRİŞ

Organlaşmış bitki paralarından itibaren vejetatif yolla bitkiler yetiştirilmesi işlemi Mikropropagasyon yöntemi olarak tanımlanır [1]. Bir diğer ifadeyle klonal bitki çoğaltım tekniği olan mikropropagasyon yöntemi bitkilerin in vitro kültür ortamlarında hızlı çoğaltılması esasına dayanır.

In vitro kültür teknikleri ile ilgili ilk çalışmalar, bir veya birçok hücre topluluğundan itibaren kolonilerin kültüre alınmasıyla başlamış ancak bu sahada ilk yıllarda elde edilen başarısızlıklar araştırmacıları çok daha fazla sayıda hücreler içeren organ parçalarıyla çalışmaya sevk etmiş ve neticede değişik besi ortamlarıyla farklı yönlerde organ veren olaylar gözlenme yoluna gidilmiştir. *Beta* cinsine giren çeşitli türlerinde in vitro kültür çalışmalarındaki potansiyelleri değerlendirilmiştir. Örneğin *Beta maritima* [2, 3], *Beta macrocarpa* [3], *Beta lomatogona*, *Beta corolliflora* ve *Beta trigyna*'nın [4] in vitro organogenesis ve mikropropagasyon çalışmalarında kullanıldııkları bilinmektedir. Fakat bu tip çalışmaların özellikle *Beta vulgaris* türü üzerinde yoğunlaştığını görmekteyiz [5 - 10].

Çalışmamızda bazı oksin-sitokinin tipi bitki büyüme düzenleyicilerinin organogenetik etkilerine bağlı olarak hipokotil eksplantların in vitro'da rejenerasyon yeteneğinin araştırılması amaç edinildi. Araştırmamızda *Beta vulgaris* türünü tercih ettik. *Beta vulgaris*'in Türkiye'nin ekonomik öneme sahip endüstriyel bitkileri arasında bulunması, ayrıca bitki gen kaynakları bakımından önemli birtakım yabancı formlarının da doğal flora içinde yer alması araştırma objesi olarak seçilmesine bizi yönlendiren etmen olmuştur.

2. MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada araştırma materyali olarak *Beta vulgaris* L.cv. KWSTR-239 (şeker pancarı) tohumları kullanıldı. Bu tohumların in vitro şartlarda çimlendirilmesi çalışmalarında, tohumlar ilk olarak % 96'lık etil alkolde 1 dakika ve % 5'lik sodyum hipokloritte 35 dakika bekletilmek suretiyle bir seri yüzeysel sterilizasyon işlemine tabi tutuldular ve daha sonra steril saf su banyolarından geçirilerek sodyum hipokloritten arındırıldılar. Bu şekilde sterilizasyon işlemi tamamlanan bitki tohumları 7 g/l agar ve tuz konsantrasyonu yarıya indirilmiş Knop besi ortamı içeren steril deney tüplerine steril şartlarda ekildiler. Besi ortamlarının sterilizasyonu otoklavda 121 °C 'de, 1 atmosfer basınç altında 20 dakika bekletilmek suretiyle gerçekleştirildi. 25±2 °C sıcaklığı olan ve 16 saat ışık, 8 saat karanlık şeklinde fotoperyot düzeni uygulanan bir kültür odasında in vitro şartlarda çimlendirilen 3 hafta yaşlı genç fideciklerin yalnızca hipokotil bölgelerinden izole edilen 4 mm uzunluğundaki eksplantlar steril şartlarda steril besi ortamlarında kültüre alınmak suretiyle yetiştirilmeleri sağlandı. Her deneme için 64-78 adet explant değerlendirildi. Besi ortamı olarak Murashige-Skoog [11] temel besi ortamı tercih edildi. Kültür besi ortamları ayrıca 35 g/l sakkaroz ve 8 g/l agar içermektedir. Bu besi ortamlarına oksin ve sitokininler 8 farklı kombinasyon ve konsantrasyonda ilave edildi. Bunlar sırasıyla 1 mg/l 2,4-D, 2 mg/l K (MS₁); 0.2 mg/l 2,4-D, 2 mg/l K (MS₂); 1 mg/l NAA, 3 mg/l BAP (MS₃); 0.5 mg/l NAA, 3 mg/l BAP (MS₄); 0.5 mg/l NAA, 6 mg/l BAP (MS₅); 1 mg/l NAA, 3 mg/l K (MS₆); 0.5 mg/l NAA, 3 mg/l K (MS₇); 0.5 mg/l NAA, 6 mg/l K (MS₈) şeklinde düzenlendi. Kültür ortamlarının pH 'si otoklavlanmadan önce 5.5 'a ayarlandı ve sterilizasyon işlemi 121 °C 'de 1 atmosfer basınç altında 20 dakika bekletilmek suretiyle gerçekleştirildi. Steril şartlarda izolasyon ve ekim işlemleri tamamlanan kültürlerin tamamı 16 saat ışık, 8 saat karanlık şeklinde fotoperyot düzeni uygulanan ve 25± 2 °C sıcaklığı olan kültür ortamlarında gelişmeye terk edildiler. Gelişme

gösteren hipokotil eksplantların her 3 haftada bir ve toplam 3 kez taze besi ortamlarında alt kültürleri yapılmak suretiyle kültürün devamlılığı sağlandı.

3. BULGULAR

Beta vulgaris L. cv. KWSTR-239 (şeker pancarı) tohumlarının invitro şartlarda çimlendirilmesi sonucu elde edilen hipokotil eksplantlarının farklı oksin ve sitokin kombinasyonları içeren MS besi ortamlarında adventif tomurcuk verimi ve sürgün rejenerasyonunun araştırıldığı bu çalışmada oksin olarak 2,4-D içeren besi ortamlarında (MS₁, MS₂) kültüre alınan hipokotil eksplantların hiç birinde adventif tomurcuk oluşumuna rastlanmadı. Buna karşın her iki besi ortamında kültüre alınan eksplantlar da kallus oluşumu gözlemlendi. Bu durum 1 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l K içeren MS besi ortamında (MS₁) % 42.4, 0.2 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l K içeren MS besi ortamında (MS₂) % 9.3 oranında gerçekleşti. Aynı oksin ve sitokin kombinasyonlarını içeren taze MS besi ortamlarında 3'er hafta ara ile toplam üç alt kültür gerçekleştirilmesine rağmen 2,4-D içeren besi ortamlarında (MS₁, MS₂) gelişen kallus dokusunda hiçbir zaman organogen faaliyetlere rastlanmadı. Çalışmada kullanılan oksin-sitokin kombinasyonları arasında adventif tomurcuk oluşumu ve sürgün rejenerasyonu açısından en iyi sonuçlar sitokin olarak BAP kullanılan besi ortamları ile elde edildi. Bu besi ortamları arasında 0.5 mg/l NAA ve 3 mg/l BAP içeren MS₄ besi ortamı ile hipokotil eksplantlar da % 80.7 oranında sürgün rejenerasyonu sağlandı. Bu besi ortamının *Beta vulgaris* L. cv. KWSTR-239 (şeker pancarı) hipokotil eksplantları için en organogen çözüldüğü saptandı (Resim 1).

Resim 1. 0.5 mg/l NAA ve 3 mg/l BAP içeren MS₄ besi ortamında kültüre alınan hipokotil eksplantlarında sürgün rejenerasyonu.

Bunu 0.5 mg/l NAA ve 6 mg/l BAP içeren MS₅ besi ortamı izledi ve bu besi ortamı ile de % 63.6 oranında sürgün rejenerasyonu sağlandı.

1 mg/l NAA, 3 mg/l BAP içeren MS₃ besi ortamlarında kültüre alınan hipokotil eksplantların sürgün rejenerasyonu oranı ise % 53.3 olarak saptandı. Bu besi ortamında kültüre alınan hipokotil eksplantlarında diğerlerinden farklı olarak önemli ölçüde kallus gelişimi sağlandı (Resim 2).

Resim 2. 1 mg/l NAA ,3 mg/l BAP içeren MS₃ besi ortamında kültüre alınan hipokotil eksplantlarında sürgün rejenerasyonu ve kallus gelişimi .

Sitokinin olarak kinetin içeren MS besi ortamları ile elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, bu besi ortamlarında kültüre alınan

hipokotil eksplantlarında organogenesin BAP ile elde edilen sonuçlardan önemli ölçüde farklı olduğu ortaya çıktı. Kinetin içeren besi ortamlarında kültüre alınan hipokotil eksplantlarının adventif tomurcuk verme ve sürgün rejenerasyon özellikleri kendi aralarında değerlendirildiğinde 0.5 mg/l NAA ve 3 mg/l K içeren MS₇ besi ortamının en organogen çözelti olduğu belirlendi. Bu besi ortamı ile sürgün rejenerasyonu oranı % 51.3 olarak saptandı. Bunu 0.5 mg/l NAA, 6 mg/l K içeren MS₈ besi ortamı (% 43.7) ve 1 mg/l NAA, 3 mg/l K içeren MS₆ besi ortamı (% 40.6) izledi. K-NAA kombinasyonunda en sağlıklı tomurcuk gelişimi MS₇ besi ortamı ile sağlandı.

Sonuç olarak *Beta vulgaris* L.cv. KWSTR-239 (şeker pancarı) hipokotil eksplantlarının sürgün rejenerasyonunda en etkin oksin-sitokinin kombinasyonu NAA-BAP olarak belirlendi. Bu durum alt kültürler esnasında da gözlemlendi (Resim 3). Bunu NAA-Kinetin kombinasyonu ile elde edilen sonuçlar izledi. Ancak 2,4-D-Kinetin kombinasyonu içeren besi ortamlarında kültüre alınan hipokotil eksplantlarında birbirini takip eden toplam 3 alt kültür gerçekleştirilmesine rağmen hiçbir zaman organogen faaliyetlere tanık olunamadı. Kültüre alınan hipokotil eksplantlarının hiçbirinde kullanılan oksin sitokinin kombinasyonlarına bağlı olarak rizogen faaliyetler gözlemlenemedi.

Resim 3. NAA-BAP kombinasyonunda gelişen hipokotil eksplantlarının birinci alt kültürlerden sonraki genel görünüşleri.

Bu çalışmada kültüre alınan eksplantların alt kültürlere transferi için optimum süre 3 hafta olarak belirlendi. Çünkü hipokotil eksplantlarının aynı besi ortamında 3 haftadan fazla kalması durumunda zaman zaman nekrotik görünümlere tanık olundu. Bu da kültürün sürekliliği açısından bir tehlike teşkil ettiğinden çalışmada alt kültüre alma işlemleri her 3 haftada bir ve toplam 3 kez olmak üzere gerçekleştirildi.

4. TARTIŞMA

İn vitro şartlarda gerçekleştirilen adventif tomurcuk oluşumu ve sürgün rejenerasyonu çalışmalarında farklı bitki kısımları eksplant kaynağı olarak değerlendirilebilmektedir. *Beta vulgaris* L. üzerinde yapılan doku kültürü çalışmalarında da çiçek durumu sürgünleri [12, 13], reproduktif sürgünlerin apikal meristemleri [14], yaprak, petiol, olgunlaşmamış embriyo ve meristem eksplantlarından köken alan kallus dokuları [15], petiol ve yaprak orijinli kallus dokuları, fide apeksleri [16], çiçek sapı segmentleri, sürgün uçları, çiçek tomurcukları [17], infloresans uçları [18] ve yaprak eksplantları [19] araştırma materyali olarak kullanılmıştır. Biz ise bu çalışmada *Beta vulgaris* L.cv. KWSTR-239 (şeker pancarı) tohumlarının 7 g/l agar içeren ve tuz konsantrasyonu yarıya indirilmiş Knop besi ortamında in vitro şartlarda çimlendirilmesi sonucu elde edilen hipokotil bölgelerini eksplant kaynağı olarak değerlendirdik.

Bizim çalışmamızda *Beta vulgaris* L.cv. KWSTR-239 tohumlarının in vitro şartlarda çimlendirilmesi sonucu elde edilen kotiledon ve kök parçaları eksplant kaynağı olarak kullanılmadı, çünkü araştırmanın başında yapılan ön hazırlık çalışmalarında bu eksplant kaynakları ile rejenerasyon yeterli oranda temin edilemedi. Kotiledon eksplant ta oldukça yoğun hücresel proliferasyon ve hacim artışı gözlemlendi, bunun yanı sıra adventif tomurcuk oluşumu kısmen sağlandı, fakat bunlarda adventif tomurcuklanma hipokotil eksplant ile kıyaslandığında çok zayıf olarak belirdi ve sürgün uzaması da çok yavaş seyretti. Kökçük eksplantlarında ise kullanılan hormon kombinasyon ve konsantrasyonlarına bağlı olarak hiçbir zaman adventif tomurcuk oluşumu ve sürgün rejenerasyonu sağlanamadı. Bu yüzden ön hazırlık çalışmalarında en iyi adventif tomurcuk verimi ve sürgün rejenerasyonu görülen hipokotil eksplant üzerinde çalışma tamamlandı.

Bir çalışmada şeker pancarı bitkisinin mikropropagasyonunda en iyi sonucun ana gövdenin apeksinden alınan eksplantlarda tespit edildiği [14], bir başka çalışmada ise en iyi morfogenetik potansiyelin olgunlaşmamış embriyolardan köken alan kalluslarda gözlemlendiği [15] belirtilmektedir. Şeker pancarı bitkisinde sürgün uçlarının rejenerasyon

açısından en etkin eksplant tipi olduğu, çiçek tomurcuklarının rejenerasyon yeteneğinin % 20' nin üzerinde olduğu, buna karşın çiçek sapı segmentlerinin rejenerasyon performansının çok zayıf olduğuna dikkat çekilmektedir [17]. Bir görüşe göre de şeker pancarı ıslahında MS besi ortamı üzerinde doku kültürleri için en etkin eksplant tipi çiçek saplarının apikal ve sub-apikal parçalarıdır [20].

Beta vulgaris L. üzerinde yapılan in vitro çalışmalarda en kritik ve özel öneme sahip bileşiklerin besi ortamlarında kullanılan oksin ve sitokinler olduğu belirlenmiştir. Örneğin ilgili bir çalışmada oksin ve sitokininden bağımsız ve normal (hormona bağımlı) şeker pancarı kallus dokuları karşılaştırılmış; oksin ve sitokin içermeyen besi ortamında kültüre alınan kallus dokuları ve hücre süspansiyonlarının 0.1 mg l^{-1} 2.4-D ve 0.1 mg l^{-1} BA içeren besi ortamlarında kültüre alınanlardan çok daha az gelişme gösterdikleri belirlenmiştir [21].

Doku kültürü çalışmalarında bitki büyüme düzenleyicilerini farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda kullanarak isteğe bağlı yönlendirme yapılabilir. Özellikle in vitro şartlarda sürgün oluşturma derecesi besi ortamına ilave edilen sitokin miktarları ile kontrol edilmektedir ve genellikle adventif sürgünlerin oluşması besi ortamında oksine nazaran yüksek dozda sitokin bulunması durumunda gerçekleşebilmektedir [22]. Kimi durumlarda ise kullanılan sitokin çeşidi dahi o in vitro kültür çalışmasındaki başarıyı etkileyebilmektedir. Nitekim şeker pancarının 6 kültür varyetesinin petiol eksplantları kullanılarak yapılan bir çalışmada; BAP içeren bir besi ortamında kültüre alınan petiol eksplantlarının kinetin içeren bir besi ortamında kültüre alınan petiol eksplantlarına göre çok daha yüksek bir sürgün rejenerasyonu yüzdesine sahip oldukları ve sürgün rejenerasyonu için optimum BAP konsantrasyonunun litrede $0.5-1 \text{ mg}$ olduğu tespit edilmiştir [23]. Oysa çiçek tomurcuklarının mikro klonal çoğaltımı için litrede 2 mg BA içeren MS besi ortamları [24], aksiller tomurcuk ve sub-apikal sürgün meristemlerinin mikro klonal çoğaltımı için 2.2 mM BA ve petioller üzerinde adventif tomurcukların indüksiyonu için de 8.9 mM BA içeren Gamborg B5 besi ortamları [25] önerilmektedir. İn vitro'da yetiştirilen şeker pancarı yaprak ve yaprak tabanı eksplantlarından sürgün farklılaştırılması amacıyla yapılan bir çalışmada ise maksimum rejenerasyon cevabının 1 mg/l BA ilaveli Gamborg B5 besi ortamında meydana geldiği bildirilmektedir [26].

Bizim araştırmamızda adventif tomurcuk oluşumu ve sürgün rejenerasyonunda etkinliği denenilen besi ortamları arasında en iyi sonuç NAA+BAP kombinasyonu ile sağlandı. Bunu NAA+K kombinasyonu ile elde edilen sonuçlar izledi. Benzer sonuçlar daha önce şeker pancarı bitkisinin 6 kültür varyetesinin petiol eksplantları kullanılarak yapılan bir çalışmada elde edilmiştir [23]. Bu çalışmada BAP içeren bir besi

ortamında kültüre alınan petiol eksplantları çok sayıda adventif sürgün üretirken, K içeren ya da hiç bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen bir besi ortamında kültüre alınan petiol eksplantlarının ise hiç ya da çok az adventif sürgün ürettikleri belirlenmiştir. Çalışmamızda oksin olarak NAA 'nın tercih edildiği besi ortamları ile elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde NAA 'nın yüksek konsantrasyonda (1 mg/l) kullanıldığı besi ortamlarında (MS₃, MS₆) sürgün rejenerasyon hızında önemli ölçüde düşüş görüldü. Buradan da hipokotil eksplantları ile yapılan çalışmada optimum NAA konsantrasyonu 0.5 mg/l olarak tespit edildi. Oksin olarak 2,4-D kullanılan besi ortamlarında ise hiçbir zaman tomurcuk oluşumu ve sürgün rejenerasyonu sağlanamadı.

5. KAYNAKÇA

- [1] Başaran, D., Bitki Doku Kültürleri, Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları No:14, Diyarbakır, (1990).
- [2] Zhong, Z.X., Smith, H.G., Thomas, T.H., Micropropagation of Wild Beet (*Beta maritima*) from Inflorescence Pieces, Plant Growth Regulation, 12, 1-2, 53,(1993).
- [3] Abe, J., Nakashima, H., Mitsui, K., Mikami, T., Shimamoto, Y., Tissue Culture Response of Beta Germplasm: Callus Induction and Plant Regeneration, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 27: 2, 123-127, (1991).
- [4] Zhuzhzhlova, T.P., Znamenskaya, V.V., Effect of Genotype and Nutrient Medium on the Process of Micropropagation in Sugar Beet, Biolojiya, Kul'tiviruemykh Kletok i Biotekhnologiya, Novosibirsk, 159-160, (1988).
- [5] Majewska-Sawka, A., Nakashima, H., Mori, K., Isolation and Culture of Suspension -Devided Protoplasts of Beta vulgaris L., Biologia Plantarum, 36:1, 9-13, (1994).
- [6] Forti, E., Mandolino, G., Ranalli, P., Callus and Cell Culture in Sugar Beet, Acta Horticulturae, 280, 271-276, (1990).
- [7] Goska, M., Szota, M., Micropropagation of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Trisomics in in vitro Culture, Genetica Polonica, 33: 2, 115-118, (1992).
- [8] Sullivan, C.F., Finch, I., Dix, P.J., Burke, J.I., Studies of in vitro propagation systems for Sugar Beet Irish, Journal of Agricultural and Food Research, 32: 1, 27-35, (1993).
- [9] Potyondi, L., Callus Induction and Plant Regeneration in Haploid Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Lines, Acta Agronomica Ovariensis, 35: 3, 215-220,(1993).

- [10] Gurel, E., Wren, M.J., In vitro Development from Leaf Explants of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Rhizogenesis and the Effect of Sequential Exposure to Auxin and Cytokinin, *Annals of Botany*, 75: 1, 31-38, (1995).
- [11] Murashige, T., Skoog, F., A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Culture, *Physiol. Plant.*, 15, 473-497, (1962).
- [12] Kotowska, U., Morphogenetic Capacities of Inflorescence Shoot Tissues of Sugar Beet in in vitro Cultures. I. Organogenesis in vitro from Tissues of the Inflorescence Shoot, *Beitrage zur Biologie der Pflanzen*, 67: 2, 193-208, (1992).
- [13] Kotowska, U., Morphogenetic Capacities of Inflorescence Shoot Tissues of Sugar Beet in in vitro Cultures. II. The Division and Differentiation of Cells, *Beitrage zur Biologie der Pflanzen*, 67: 2, 209-223, (1992).
- [14] Abugaliev, I.A., Kozhakhmetov, M.K., Alimgazinova, B.S., Morphogenesis in the Culture of Isolated Apical Shoots of Sugar Beet, *Doklady Vsesoyuznoi Ordena Lenina i Ordena Trudovogo Krasnogo Znameni Akademii*, 3, 12-14, (1991).
- [15] Zubenko, V.F., Red'ko, V.I., Belous, V.E., Il'enko, I.I., Morphogenesis in Callus Tissue of Sugarbeet, *Doklady Vsesoyuznoi Ordena Lenina i Ordena Trudovogo Krasnogo Znameni Akademii*, 1, 21-24, (1990).
- [16] Ritchie, G.A., Short, K.C., Davey, M.R., In vitro Shoot Regeneration from Callus, Leaf Axils and Petioles of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.), *Journal of Experimental Botany*, 40: 211, 277-283, (1989).
- [17] Kruczkowska, H., Miszke, W., Pawlowska, H., Skucinska, B., Suitability of Different Explants of the Fodder Beet Seed Plant for Cloning in vitro, *Acta Agraria et Silvestria*, 28, 33-42, (1989).
- [18] Mezei, S., Jelaska, S., Kovacev, L., Vegetative Propagation of Sugar Beet from Floral Ramets, *Journal of Sugar Beet Research*, 27: 3-4, 90-96, (1990).
- [19] Mikami, T., Yanai, Y., Kinoshita, T., High Frequency of Organogenesis in Leaflet Culture of Sugar Beet, *Proceedings of the Japanese Society of Sugar Beet Technologists*, 31, 145-150, (1989).
- [20] Seman, I., Application of in vitro Techniques in Sugar Beet Breeding, *Sbornik-CSAZ*, 127, 53-59, (1989).
- [21] Hagege, D., Kevers, C., Gaspar, T., Thorpe, T. A., Abnormal growth of habituated sugarbeet callus and cell suspensions, *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 27: 112-116, 1991.

- [22] Gönülşen, N., Bitki Doku Kùltürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yayın no: 78, İzmir, (1987).
- [23] Zhong, Z.X., Smith, H.G., Thomas, T.H., In vitro Culture of Petioles and Intact Leaves of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Plant Growth Regulation 12, 1-2, 59-66, (1993).
- [24] Seilova, L.B., Amerkhanova, M.B., Microclonal Propagation in Studies with Sugar Beet, Problemy Teoreticheskoi i Prikladnoi Genetiki v Kazakhstane Materialy Respublikanskoi Konferentsii, 114-115, (1990).
- [25] Mezei, S., Kovacev, L., Microclonal propagation of Sugar Beet in vitro, Sauremena Poljoprivreda, 39: 1, 53-60, (1991).
- [26] Nemeth, B., Shoot redifferentiation from in vitro Cultivated Leaf and Leaf Base Explants in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L. var. altissima, Doell.), Novenytermeles, 40: 2, 97-104, (1991).