

Bazı Yonca Çeşitlerinde Farklı Temel Besin Ortamlarının Somatik Embriyogenesis Üzerine Etkisi

Nilgün EKİNCİ¹ , Satı UZUN¹ 

¹Erciyes Üniversitesi Seyrani Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, KAYSERİ

(Alınış / Received: 13.09.2019, Kabul / Accepted: 03.03.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 25.12.2020)

Anahtar Kelimeler

Medicago sativa,
Somatik embriyogenesis,
Sürgün rejenerasyonu,
Temel besin ortamı

Öz: Farklı yonca çeşitlerinin somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonuna tepkilerini belirlemek amacıyla yürütülen çalışmada Prosementi, Gea, Savaş, Ömerbey, OS66, Artemis ve Classe yonca çeşitleri kullanılmıştır. Çeşitlere ait fidelerden elde edilen kotiledon ve yaprak eksplantları 4 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L kinetin, 2 g/L prolin ve 30 g/L sukroz içeren, 8 g/L agar ile katılaştırılan dört farklı (MS, B5, SH ve N6) temel besin ortamında kültüre alınmıştır. Araştırma 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 10 eksplant olacak şekilde tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme desenine göre yürütülmüştür. Araştırma sonucunda petri başına kallus ağırlığı, petri başına somatik embriyo ve bitkicik sayıları sırasıyla 0.253-6.700 g, 0-19.667 adet ve 0-6.667 adet arasında değişim göstermiştir. Yaprak eksplantında en fazla petri başına somatik embriyo ve bitkicik sayısı Ömerbey yonca çeşidinde SH temel besin ortamında elde edilirken, Kotiledon eksplantında ise en yüksek petri başına somatik embriyo sayısı OS 66 çeşidinde N6 besin ortamında elde edilmiş olup, hiç bitkicik gelişimi belirlenmemiştir.

The Effects of Different Basal media on Somatic Embryogenesis in Some Alfalfa Cultivars

Keywords

Medicago sativa,
Somatic embryogenesis
Shoot regeneration,
Basal media

Abstract: In order to determine the responses of different alfalfa genotypes to plant regeneration through somatic embryogenesis, Prosementi, Gea, Savaş, Ömerbey, OS66, Artemis and Classe alfalfa cultivars were used. Leaflet and cotyledon explants of the cultivars were cultured on different basal media (MS, B5, SH and N6) containing 4 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L kinetin, 2 g/L proline and 30 g/L sucrose solidified with 8 g/L agar. The research was carried out in a randomized plots-factorial experimental design with 3 replications and 10 explants per replication. As a result of the research, callus weight per petri dish, the number of somatic embryos and plantlets per petri dish varied respectively between 0.253-6.700 g, 0-19.667 and 0-6.667. The maximum number of somatic embryos and plantlets per petri dish was obtained from Ömerbey alfalfa cultivar cultured on SH basal medium in the leaflet explant; whereas in the cotyledon explant, the highest number of embryos per petri dish was obtained from N6 medium in OS 66 cultivar and no plantlet regeneration was achieved from cotyledon explants.

*İlgili Yazar, email: scocu@erciyes.edu.tr

1. Giriş

Yonca (*Medicago sativa* L.) yeryüzünde en fazla tarımı yapılan, uzun ömürlü çok yıllık ve yabancı döllenmiş bir yem bitkisidir. Dik ya da yatık gelişen formları bulunabilir (1). Yonca çok geniş bir adaptasyon yeteneğine sahiptir. Yonca, iyi gelişmiş derinlere inen kök sistemi ile genel olarak kurağa dayanıklıdır. Ancak, yıl içinde çok sayıda biçim vermesi ve her biçimden sonra çok fazla yeşil aksam oluşturması nedeniyle diğer kültür bitkilerine oranla suya gereksinimi daha yüksektir. Yonca bölgenin vejetasyon süresine de bağlı olarak yıl içerisinde kurak alanlarda sulanarak yağışlı bölgelerde ise sulanmadan yağışa bağlı olarak 3-7 defa biçilebilir. Yem bitkilerinin kraliçesi olarak bilinen yonca %18-25 oranında protein içerir, hayvanlar için yaş ya da kuru ot olarak hem çok lezzetli hem de vitaminlerce çok zengindir. Özellikle; Tokoferol, Karotin, Ksantofil ve Vitamin A değerleri çok

yüksektir (2). Yonca; hayvan beslenmesindeki öneminin yanı sıra örtücü bitki, yeşil gübre ve toprak ıslahı açısından da çok önemlidir. Baklagil yem bitkisi olmasından dolayı havadaki azotu toprağa bağlar ve dolayısı ile kendisinden sonra ekilecek yüzlek köklü bitkilere organik madde ve azot bakımından zengin, su tutma kapasitesi yüksek kaliteli toprak bırakır. İyi gelişmiş kazık kök yapısı ile de toprağın derinlerindeki besin maddelerini üst katmanlara taşır (2).

Günümüzde doku kültürü teknikleri bitki ıslahında ve bitkilerin ticari üretiminde çok geniş kullanım alanına sahiptir. Bitki doku kültürü işlemlerinin temeli bitki rejenerasyonudur. Meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon; hücre veya dokulardan değişime neden olacak uygulamalarla sürgün taslakları oluşturmak (Organogenesis) veya somatik embriyogenesis yoluyla olmaktadır (3). Vejetatif hücrelerden gelişen embriyolar somatik embriyo olarak adlandırılmaktadır. Somatik embriyo oluşumu için somatik dokular yüksek oranda oksin içeren ortamda kültüre alındığında embriyo üretme yeteneği kazanmaktadır. Zigottan gelişen bitki embriyosunun gösterdiği gelişim safhalarını somatik embriyolar da gösterir. Ancak somatik embriyolar bir endosperm içermezler (3). Somatik embriyogenesis gen aktarım çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

Yoncada in vitro rejenerasyon genellikle somatik embriyogenesis ile yapılmaktadır (4). Somatik embriyogenesis yoluyla ilk rejenerasyon çalışması 1972 yılında Saunders ve Bingham tarafından (5) yapılmış ve günümüze kadar birçok araştırmacı tarafından somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu çalışması yürütülmüştür. Yoncada daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde; yaprak (6), yaprak sapı (7, 8), olgunlaşmamış embriyo (9), hipokotil (10), süspansiyon kültürü ve mezofil protoplastları (11) gibi farklı bitki kısımlarından somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu elde edilmiştir. Ancak yoncada yapılan somatik embriyogenesis çalışmalarında büyük ölçüde genotipe bağlı bir rejenerasyon görülmektedir (12). Bu nedenle bu çalışmada bazı yonca çeşitlerinde somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

Çalışmada; Prosementi Bologna, Gea, Savaş, Ömerbey, OS66, Artemis ve Classe yonca çeşitleri kullanılmıştır. Çeşitlere ait tohumlar steril kabin içerisinde manyetik karıştırıcı kullanılarak %50 ticari çamaşır suyu içerisinde 15 dakika süre ile sterilize edildikten sonra; tohumlar 3 defa 5'er dakika olmak üzere saf sudan geçirilip, 30 g/L sukroz, 8 g/L agar içeren MS besin ortamına çimlendirilmiştir.

Çimlendirme başlangıcından yaklaşık 15-25 gün sonra somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu elde etmek amacıyla çeşitlere ait steril bitkiciklerden elde edilen kotiledon ve yaprak eksplantları 4 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L kinetin, 2 g/L prolin ve 30 g/L sukroz içeren, 8 g/L agar ile katılaştırılan dört farklı (MS, B5, SH ve N6; 13-16) temel besin ortamında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından yaklaşık 50-60 gün sonra oluşan kalluslar 30 g/L şeker içeren 8 g/L agar ile katılaştırılmış MS besin ortamına aktarılmıştır. Araştırmada her petri kabına 10 eksplant yerleştirilmiş olup, petri başına kallus ağırlığı ve petri başına embriyo sayısı ve petri başına bitkicik sayısı parametreleri belirlenmiştir (Şekil 1.).

Çalışmada kullanılan petri, magenta, pens, bisturi, beher, saf su ve besin ortamlarının sterilizasyonunda otoklav kullanılmıştır. Otoklavda sterilizasyon işlemi 1.2 atmosfer basınç altında 121°C'de 20 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Tüm doku kültürü çalışmaları steril kabin içerisinde yapılmıştır. Hazırlanan besin ortamlarının pH'sı 1N NaOH ve 1 N HCl kullanılarak 5.6 ile 5.8 arasında ayarlanmıştır. Tüm kültürler 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyotta, 22±2°C'de ve 3000 lüks ışık yoğunluğundaki iklim dolabı içerisinde bekletilmiştir.

Denemeler tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme desenine göre 3 tekerrürlü her tekerrürde 10 eksplant, olacak şekilde yürütülmüştür. Araştırma sonucunda elde edilen verilerin varyans analizi "SPSS for Windows" programı ile yapılmıştır. Muamele ortalamaları Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile karşılaştırılmıştır.

3. Bulgular

Farklı yonca çeşitlerinde in vitro bitki rejenerasyonu elde etmek amacıyla yürütülen bu çalışmada Prosementi, Gea, Savaş, Ömerbey, OS66, Artemis ve Classe yonca çeşitleri kullanılmıştır. Çeşitlere ait yaprak ve kotiledon eksplantları 4 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L kinetin, 2 g/L prolin ve 30 g/L sukroz içeren, 8 g/L agar ile katılaştırılan dört farklı MS, B5, SH ve N6 temel besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Araştırma sonucunda tüm çeşitlerde her iki eksplantta da bütün ortamlarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Yapılan varyans analiz sonuçları petri başına kallus ağırlığında; çeşit, ortam, eksplant, çeşit x ortam, çeşit x eksplant ve çeşit x ortam x eksplant istatistiksel olarak 0.01 düzeyinde, ortam x eksplant 0.05 düzeyinde, petri başına somatik embriyo sayısında; eksplant, çeşit x ortam ve çeşit x ortam x eksplant 0.01 düzeyinde, petri başına bitkicik sayısında ise; eksplant, çeşit x ortam ve çeşit x ortam x eksplant 0.01 düzeyinde çeşit, ortam, çeşit x eksplant, ortam x eksplant 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur.

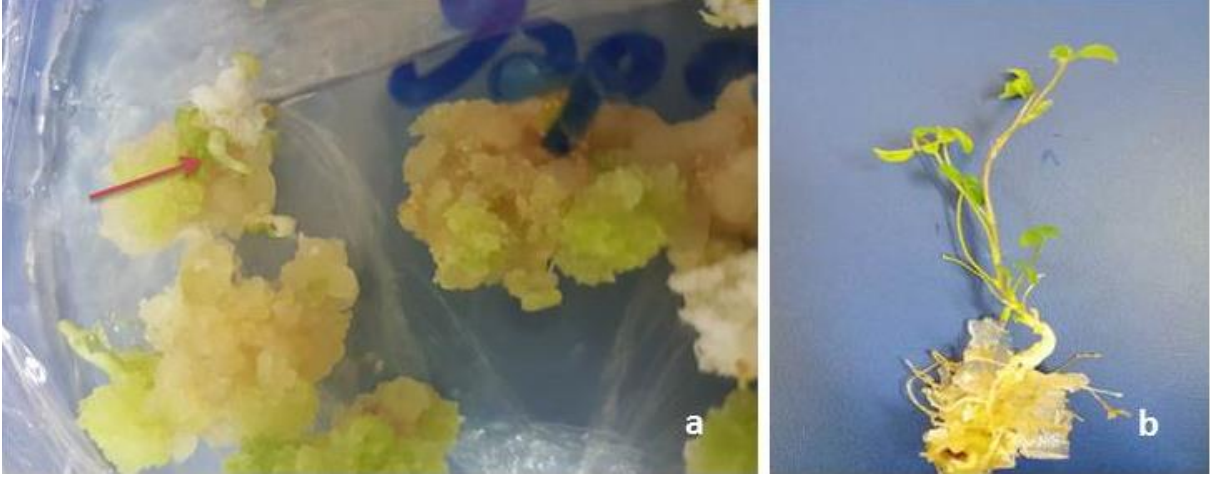
Tablo 1. Bazı yonca çeşitlerinde kotiledon ve yaprak eksplantlarından farklı temel besin ortamlarında elde edilen petri başına kallus ağırlığı, petri başına somatik embriyo sayısı ve petri başına bitkicik sayısına ait ortalama değerler

Çeşit	Temel Besin Ortamı	Petri Başına Kallus Ağırlığı (g/petri)		Petri Başına Somatik Embriyo Sayısı (adet/petri)		Petri Başına Bitkicik Sayısı (adet/petri)	
		Yaprak	Kotiledon	Yaprak	Kotiledon	Yaprak	Kotiledon
Prosementi	N6	3.213 bcd*	1.417 j-s	0 f*	0 f	0 d*	0 d
	MS	2.673 c-h	1.943 e-o	1.333 f	0 f	0 d	0 d
	SH	2.311 d-l	1.187 m-t	0.333 f	0 f	0 d	0 d
	B5	3.570 bc	1.320 l-s	12.00 bcd	0 f	3.667 b	0 d
Gea	N6	2.853 b-f	2.467 d-j	0.67 f	0 f	0 d	0 d
	MS	1.740 g-q	2.310 d-l	0 f	0 f	0 d	0 d
	SH	1.507 ı-s	1.623 h-r	13.00 abc	0 f	2.667bc	0 d
	B5	1.267 l-t	1.077 n-t	0 f	0 f	0 d	0 d
Savaş	N6	1.017 n-t	1.330 l-s	0 f	0.667 f	0 d	0 d
	MS	1.350 k-s	2.503 d-ı	0 f	0 f	0 d	0 d
	SH	0.503 st	0.807 p-t	0 f	0 f	0 d	0 d
	B5	0.617 rst	0.937 n-t	0 f	0 f	0 d	0 d
Ömerbey	N6	3.180 bcd	2.393 d-k	5.667 c-f	0 f	1.000 cd	0 d
	MS	1.717 g-q	2.703 c-g	0 f	0.333 f	0 d	0 d
	SH	1.327 l-s	1.533 ı-s	19.667 a	0 f	6.667 a	0 d
	B5	0.877 o-t	1.260 l-t	1.00 f	0.333 f	0 d	0 d
Artemis	N6	1.950 e-o	2.640 c-h	3.333 ef	0 f	0 d	0 d
	MS	6.700 a	0.253 t	3.00 ef	0 f	0 d	0 d
	SH	1.893 f-o	2.203 d-m	6.333 c-f	0 f	0.667 d	0 d
	B5	1.973 e-n	2.257d-l	1.000 f	0 f	0 d	0 d
Classe	N6	3.140 bcd	3.020 bcd	4.667 def	0 f	0 d	0 d
	MS	2.560 c-ı	3.783 b	10.333 b-e	0 f	0 d	0 d
	SH	0.757 p-t	1.143 m-t	4.667 def	2.000 de	0 d	0 d
	B5	1.530 ı-s	1.290 l-t	4.667 def	0 f	0 d	0 d
OS 66	N6	1.820 f-p	1.790 g-q	16.333 ab	5.333 cde	0 d	0 d
	MS	2.957 b-e	0.723 q-t	2.667 ef	0 f	0 d	0 d
	SH	1.500 ı-s	1.243 l-t	4.333 def	2.333 ef	0 d	0 d
	B5	1.523 ı-s	0.563 rst	3.333 ef	0 f	0 d	0 d

*: Aynı satırda ve sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemlidir.

Araştırma sonucunda en yüksek kallus ağırlığı petri başına 6.7 g ile Artemis çeşidinde yaprak eksplantında MS besin ortamında elde edilirken en düşük yine Artemis çeşidinde kotiledon eksplantında MS besin ortamında elde edilmiştir (Tablo 1.). En fazla petri başına somatik embriyo sayısı ise Prosementi çeşidinde B5 besin ortamında; Gea, Ömerbey ve Artemis çeşitlerinde SH besin ortamında; Classe çeşidinde MS besin ortamında ve OS-66 çeşidinde ise N6 besin ortamında yaprak eksplantında belirlenmiştir. Savaş çeşidinde ise sadece kotiledon eksplantında N6 besin ortamında somatik embriyo gözlenmiştir. En yüksek petri başına somatik embriyo sayıları yaprak eksplantında Prosementi, Gea, Ömerbey, Artemis, Classe ve OS-66 çeşitlerinde sırasıyla 12.00, 13.00, 19.667, 6.333, 10.333 ve 16.333 adet, kotiledon eksplantında ise Savaş, Ömerbey, Classe ve OS-66 çeşitlerinde sırasıyla 0.667, 0.333, 2 ve 5.333 adet olarak kaydedilmiştir.

Petri başına bitkicik sayıları incelendiğinde kotiledon eksplantında yonca çeşitlerinde hiçbir ortamda bitkicik gelişimi olmamıştır. Ancak yaprak eksplantında Prosementi çeşidinde 3.667 adet ile B5, Gea ve Artemis çeşitlerinde 2.667 ve 0.667 adet ile SH, Ömerbey çeşidinde ise 1.00 ve 6.667 adet ile N6 ve SH besin ortamlarında bitkicik gelişimi belirlenmiştir.



Şekil 1. Ömerbey yonca çeşidinde somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu
a. Kallus oluşumu ve embriyo gelişimi; b. Bitkicik gelişimi

4. Tartışma ve Sonuç

Daha önce yonca ile yapılan çalışmalarda somatik embriyo oluşumunda etkili olan faktörler genotip, eksplant kaynağı ve besin ortamının içeriği olarak bildirilmektedir (8). Brown ve Atanassov (17), yürüttükleri çalışmada; farklı yonca türlerinden 76 genotipi somatik embriyo ve kallus üretim kapasiteleri açısından kıyaslamışlardır. Kallus ve embriyogenesis açısından genotipler arasında büyük bir varyasyon gözlemlemişlerdir. Eksplant ve ortam protokolü ne olursa olsun yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip genotiplerin düşük rejenerasyon kapasitesine sahip genotiplerden daha fazla somatik embriyo ürettiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Chen ve Marowitch (18), *Medicago falcata*'da somatik embriyo oluşturmak amacıyla 17 ekotip incelemiş, eksplant kaynağı olarak ise kotiledon, kök, hipokotil ve yaprak kullanmışlardır. Araştırma sonucunda genotip ve rejenerasyon yeteneği arasında önemli bir ilişki olduğunu ve 17 ekotipin 10 tanesinin rejenerasyon yeteneğine sahip olduğunu bildirmiştir. Nolan vd. (19) ise *M. truncatula* türünde tohumdan gelişen bitkilerden alınan yapraklar eksplant olarak kullanıldığında rejenerasyon oranı düşükken rejenere olan bitkiler eksplant kaynağı olarak kullanıldığında rejenerasyon oranının yüksek olduğunu, Moltrasio vd. (4) de resiprokal melezler ve anaç klonların kendilenmiş döllerini ile yürüttükleri denemelerde somatik embriyogenesisin iki tamamlayıcı genin kontrolü altında olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer şekilde bu çalışmada da çeşitler arasında embriyogenesis açısından önemli farklılıklar gözlenmiştir. Şavaş çeşidi dışında diğer çeşitlerde yaprak eksplantında ortamlara göre değişen sayılarda somatik embriyo elde edilirken, Şavaş çeşidinde somatik embriyo oluşumu gerçekleşmemiştir.

Erişen (8) somatik embriyogenesis ile rejenerasyonun büyük oranda genotipe bağlı olduğu ancak kullanılan protokoller ve eksplant seçiminin de embriyo oluşumunda etkili olduğunu bildirmektedir. Erişen (8) rejenerasyon yeteneğine sahip Verco çeşidinde yaprak eksplantında eksplant başına 94 adet somatik embriyo elde ederken, yaprak sapı eksplantında 6 adet somatik embriyo elde etmiştir ve elde ettiği somatik embriyo sayılarının bu denemede elde edilen değerlerden oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bu çalışmada da eksplantlar arasında somatik embriyo sayıları bakımından farklılıklar gözlenmiş olup yaprak eksplantında petri başına daha fazla sayıda somatik embriyo sayılmıştır.

Temel besin ortamları incelendiğinde ise yaprak eksplantında çeşitlere göre değişmekle birlikte N6, B5 ve SH ortamlarında daha fazla petri başına somatik embriyo sayısı elde edilmiştir. En fazla petri başına bitkicik sayıları ise Prosementi çeşidinde B5 ortamında elde edilirken; Gea, Ömerbey ve Artemis çeşitlerinde SH ortamında elde edilmiştir. Takamizo vd. (20), 26 yonca çeşidinde somatik embriyo oluşumunu inceledikleri çalışmalarında B2, B5h, UM ve SH ortamlarını kullanmıştır. Araştırma sonucunda Tachiwakaba yonca çeşidinde hipokotil eksplantında somatik embriyo gelişimi için en uygun ortamın 4 mg/L 2,4.D ve BAP içeren UM ortamı olduğunu tespit etmişlerdir. Sangra vd (12) ise yoncada B5H-B5 kallus ve embriyo geliştirme ortamlarının yüksek embriyo verimi ve bitkiciğe dönüşüm oranı verdiğini bildirmektedir. Saha vd. (21) bitki türlerinde embriyo rejenerasyonu ve gelişimi için her elementin ayrı bir etkiye sahip olduğunu, ortamın makro ve mikro element içeriğinin embriyo oluşumunu ve gelişimini etkilediğini rapor etmişlerdir.

Bu çalışma kapsamında ülkemizde yetiştirilen bazı yonca çeşitlerinde öncelikle somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu amaçlanmıştır. Araştırma sonucunda kullanılan çeşitler değerlendirildiğinde en yüksek somatik embriyo ve bitkicik sayısı sırasıyla 19.667 ve 6.667 adet ile Ömerbey çeşidinden SH temel besin ortamında yaprak eksplantından elde edilmiştir. Petri başına somatik embriyo ve petri başına bitkicik sayılarında çeşit x

eksplant x ortam interaksyonu önemli bulunmuştur. Petri başına somatik embriyo ve bitkicik sayıları birlikte değerlendirildiğinde Ömerbey çeşidinin somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu için ümitvar bir çeşit olduğu söylenebilir.

Kaynakça

- [1] Elçi, Ş., 2005. Baklagil ve Buğdaygil Yem Bitkileri. T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Ankara, 486 s.
- [2] Serin, Y., Tan, M., 2001. Baklagil Yem Bitkileri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, Erzurum, 177 s.
- [3] Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, A.A., 2001. Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri, 1-35. In: Bitki Biyoteknolojisi- Doku Kültürü ve Uygulamaları (Eds: M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan). Selçuk Üniversitesi Vakfı
- [4] Moltrasio, R., Robredo, C. G., Gómez, M. C., Paleo, A. H. D., Díaz, D. G., Rios, R. D., Franzone, P. M. 2004. Alfalfa (*Medicago sativa*) somatic embryogenesis: genetic control and introduction of favourable alleles into elite Argentinean germplasm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77(2), 119-124.
- [5] Saunders, J.W. ve Bingham, E.T., 1972. Production of alfalfa plants from callus tissue. *crop science*, 12: 804-808.
- [6] Barbulova, A. Alantcheva, A., Zhiponova, M., Vlahoca, M., Atassanov A., 2002. Establishment of embryogenic potential of economically important Bulgarian alfalfa cultivars (*Medicago sativa* L.). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 16(1), 55-63.
- [7] Lai, F., Bryan D, McKersie. 1994. Regulation of storage protein synthesis by nitrogen and sulfur nutrients in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. *Plant science*, 103, 209-221.
- [8] Erişen, S. 2005. Yonca (*Medicago sativa* L.)'da somatik embriyogenesis aracılığıyla bitki rejenerasyonu, *Tarım Bilimleri Dergisi* ,11(3),311-315
- [9] Ninkovic, S., Miljus-Djukic, J., Neskovic, M., 1995. Genetic transformation of alfalfa somatic embryos and their clonal propagation through repetitive somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 42 (3), 255-260.
- [10] Meijer, E.G.M., Brown, D.C.W., 1987. Role of exogenous reduced nitrogen and sucrose in rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 10,11-19.
- [11] Atanassov, A., Brown, D.C., 1984. Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 3(2),149-162.
- [12] Sangra, A., Shahin, L., & Dhir, S. K. (2019). Long-Term Maintainable Somatic Embryogenesis System in Alfalfa (*Medicago sativa*) Using Leaf Explants: Embryogenic Sustainability Approach. *Plants*, 8(8), 278.
- [13] Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- [14] Gamborg, O. L., Miller, R., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151-158.
- [15] Schenk, R. U., Hildebrandt, A. C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50(1), 199-204.
- [16] Chu, C. C., Wang, C. C., Sun, C. S., Hsu, C., Yin, K. C., Chu, C. Y., Bi, F. Y. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen. *Sci. Sinica*, 18659-668.
- [17] Brown, D.C.W, Atanassov, A., 1985. Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 4,111-122.
- [18] Chen, T.H.H., Marowitch, J., 1987. Screening of *Medicago falcata* germplasm for in vitro regeneration. *Journal Plant Physiology*, 128, 271-277.
- [19] Nolan, K.E., Rose, R.J., Gorts, J.R., 1989. Regeneration of *Medicago trunculata* from tissue culture: increased somatic embryogenesis using explants from regenerated plants. *Plant Cell Reports*, 8, 278-281.
- [20] Takamizo, T., Sugino, K., Ohsugi, R., 1991. Somatic embryogenesis in a recalcitrant cultivar of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in an improved medium. *Bulletin of the National Grassland Research Institute (Japan)*, 44, 15-22.
- [21] Saha, P., Bandyopadhyay, S., Raychaudhuri, S.S., 2011. Formulation of nutrient medium for in vitro somatic embryo induction in *Plantago ovata* Forsk. *Biological Trace Element Research*, 140(2), 225-243.