



## Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.)'nin Olgunlaşmamış Embriyo ve Kotiledon Eksplantlarından Adventif Sürgün Rejenerasyonu\*

Ülkü BİNBOĞA MERAL<sup>1</sup>

Geliş Tarihi: 03.10.2006

**Öz:** Ayçiçeğinin Ekiz genotipinden seçilen 10 hattın olgunlaşmamış embriyo ve kotiledon eksplantları 20 mg/l sukroz ve farklı oranlarda kinetin ve naftalen asetik asit (NAA) içeren Murashige and Skoog (MS) ortamında kültüre alınmıştır. Denemelerde 1. hafta sonunda rejenerasyonu olumsuz etkileyen kaçak kökler steril koşullarda eksplantlardan uzaklaştırılmıştır. Özellikle olgunlaşmamış embriyo eksplantında çalışılan tüm hatlarda ve ortamlarda kallus ve sürgün oluşumu görülürken olgunlaşmamış kotiledon eksplantında tüm ortamlarda iyi bir kallus oluşumu gerçekleşmiş ancak daha az sürgün elde edilmiştir. Kallus çapı ve ağırlığının sürgün gelişimine etkisi olmadığı görülmüştür. Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılan eksplantların sürgün gelişimi için önemli faktörlerden birisi olduğu gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Helianthus annuus* L., ayçiçeği, olgunlaşmamış embriyo, olgunlaşmamış kotiledon, *in vitro*

### Adventitious Shoot Regeneration from Immature Embryo and Cotyledon Explants of Sunflower (*Helianthus annuus* L.)

**Abstract:** Immature embryo and cotyledons of 10 lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.) were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 20 mg/l sucrose and different concentrations of Kinetin and  $\alpha$  Naphthalene acetic acid (NAA). Development of precocious roots was observed after one week of culture, which were removed aseptically to induce callus and shoot regeneration. Induction of healthy shoots was observed on cotyledon and embryo explants on MS medium containing any concentration of kinetin and NAA. This is an important development in the tissue culture research of sunflower.

**Key Words:** *Helianthus annuus* L., sunflower, immature embryo, immature cotyledons, *in vitro*

#### Giriş

Günümüz insanların sağlıklı beslenme isteği hayvansal ürünlerden çok bitkisel kaynaklı ürünlere yönelmelerini sağlamıştır. Önemli bir E vitamini kaynağı olan bitkisel yağlar genel olarak, beslenmedeki E vitamini ihtiyacının %'ünü karşılamaktadırlar (Verleyen 2001). Ayçiçeğinde doymamış yağ asitlerinin % 14-43'ünü oleik asit, % 44-75'ini linoleik, en fazla % 0,7'sini de linolenik asit oluşturmaktadır. Yağlarda linoleik asit miktarının fazla olması kaliteyi artırmaktadır (Wagner 2001). Linoleik asit yağın doygunluğunu azaltmakta, sindirimi ve kana geçmeyi kolaylaştırmaktadır. (Kolsarıcı ve ark.1995). Ayrıca ayçiçeği yağı Theamin, B1, B3, B6 vitaminlerince de zengindir (Lahaye ve ark. 2004). Ayçiçeği tohumlarında %17-18,3 oranında protein de bulunmaktadır. Ayçiçek yağı yemeklik kalitesi bakımından dünyada ve ülkemizde tercih edilen bitkisel yağlar arasında ilk sırada yer almaktadır.

Türkiye'de bugüne kadar ayçiçeğinde doku kültürü çalışmalarında çok fazla başarı elde edilememiştir. Ayçiçeği hibrit tohumları 1970'lerde kullanılarak ilk kültürleri yapılmıştır. (Dedio ve Putt 1980). Daha sonra rejenerasyon çalışmalarında kotiledon (Greco ve ark. 1984, Knittel ve ark. 1991, Chraibi ve ark. 1991, 1992a, b, Ceriani ve ark. 1992, Baker ve ark. 1999), embriyonik axes (Bohorova ve ark. 1985, Bidney ve ark. 1992, Knittel ve ark. 1994, Monnier 1978, Fiore ve ark. 1997), olgunlaşmamış embriyo (Power 1987, Espinasse and Lay 1989), hipokotil (Paterson and Everett 1985, Lupi ve ark. 1987), yaprak (Greco ve ark. 1984, Lupi ve ark. 1987) ve protoplastlar (Burrus ve ark. 1991; Krasnyanski ve Menczel 1993, Wingender ve ark. 1996), kullanılarak organogenesis başarılmıştır. Somatik embriyogenesis çalışmalarında yine hipokotil (Paterson ve Everett 1985, Freyssinet ve Freyssinet 1988, Pelissier ve

\*Doktora tezinden hazırlanmıştır.

<sup>1</sup>Gazi Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü-Ankara.

ark. 1990, Prado ve Berville 1990), olgunlaşmamış embriyo (Cooley ve Wilcox 1987, Finer 1987, Freyssinet ve Freyssinet 1988, Witzrens ve ark. 1988, Jeannin ve ark. 1995, Sujatha ve Prabhakaran 2001), anter (Thengane ve ark. 1994) ve döllenmemiş ovaryum (Gelebart ve San 1987, Badea ve ark. 1989) kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Bu çalışmanın amacı ayçiçeğinin olgunlaşmamış embriyo ve kotiledon eksplantlarından doku kültürü yöntemleri uygulayarak adventif sürgün rejenerasyonu elde etmektedir.

### Materyal ve Yöntem

**Bitki materyali:** Çalışmada kullanılan bitki materyali Ekiz genotipinden seçilen 12/15, 15/12, 24/19, 28/29, 48/33, 13/34, 34/26, 25/33, 5/6,13/3 numaralı hatlar A.Ü Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü'nden temin edilmiştir.

**Büyüme ortamları ve kültür koşulları:** Denemelerde büyüme ortamları MS besin ortamına (Murashige ve Skoog 1962), % 2'lik sukroz ilave edilerek hazırlanmıştır. Besin ortamının pH'sı, 1N NaOH ya da 1N HCl kullanılarak 5.6 - 5.8'e ayarlanmıştır. Otoklavlanmadan önce ortama % 0.8'lik agar (Type A, Sigma) ilave edilmiştir. Ortam hazırlığında çift distile saf su kullanılmış olup, gerektiğinde besin ortamına farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri (sitokin ve oksinler) de ilave edilmiştir. Ortamın sterilizasyonu otoklavda 1.2 atmosfer basınç ve 120 °C'de 20 dk. tutularak sağlanmıştır. Tüm kültürler Philips beyaz floresan ışığı (Preheat Daylight - 42 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) altında 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda 24 ± 1 °C sıcaklıkta tutulmuşlardır.

Ayçiçeğinin Ekiz genotipinden seçilen 10 hattının tozlaşmadan 6 gün sonra olgunlaşmamış embriyo ve kotiledonları taşıyan tohumlar tarladan alınarak uygulanan sterilizasyondan sonra steril petri kapları içerisinde, değişik oranlarda kinetin ve NAA (Çizelge 1) içeren MS ortamına yerleştirilmiştir

**Olgunlaşmamış embriyo ve kotiledon ile rejenerasyon çalışması:** Bütün ortamlardan kültüre alınan eksplantlarda kallus oluşturan eksplant yüzdesi, kallus ağırlığı, kallus çapı, petri başına sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısına ait sonuçlar, 8 hafta sonra incelenip varyans analizine tabi tutulmuştur.

İstatistiksel Değerlendirmeler: Denemelerde elde edilen veriler "SPSS for Windows" programı yardımıyla one way varyans analizine tabi tutulmuş, muamele

ortamlarını karşılaştırmak amacıyla Duncan testi kullanılmıştır. Yüzde değerler, istatistik analizinden önce arcsin değerlerine çevirilmiştir (Snedecor ve ark. 1967).

### Bulgular ve Tartışma

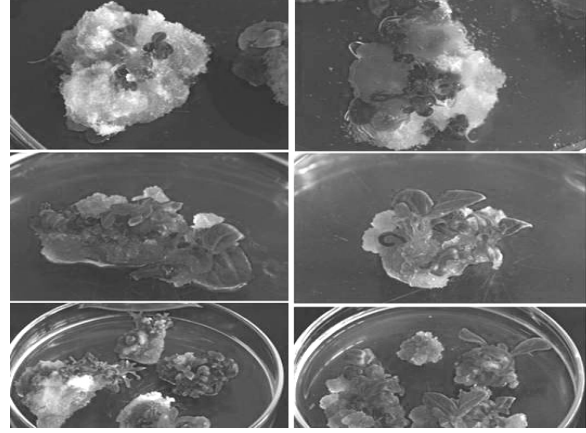
Denemede ilk 1 hafta içinde ortamlarda kök oluşumu gözlenmiştir. Eksplantlar üzerinde oluşan bu kökler *in vitro* koşullarda, steril kabinde bistüri ile temizlenip uzaklaştırılmıştır. Temizlenmiş eksplantlar alt kültüre alınmışlardır. 8 gün sonra eksplantlar üzerinde önce adventif sürgün uçları daha sonra sürgün gelişimi gözlenmiştir.

Olgunlaşmamış embriyoda kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından 24/19 hattında %100 kallus oluşumu görülmüştür. Bunun dışında 25/33, 12/15 ve 15/12 hatlarında sırasıyla %98,33, %90,00 ve %88,33 kallus oluşumu görülürken, en az kallus oluşumu 34/26 hattında %61,66 olarak belirlenmiştir. Kallus ağırlığı bakımından Çizelge 1'de görüldüğü gibi 0,4 mg/l Kinetin - 0,5 mg/l NAA içeren MS ortamında 13/34 hattında 0,5 mg/l kinetin - 0,4 mg/l NAA içeren MS ortamında 28/29 hattında 0,5 mg/l kinetin - 0,5 mg/l NAA içeren MS ortamında ve 0,5 mg/l kinetin - 0,6 mg/l NAA içeren MS ortamında ise 12/15 hattında en fazla kallus ağırlığı görülmüştür (Şekil 1).

Çizelge 1'de görüldüğü gibi kallus ağırlığının sürgün oluşumu üzerine olumlu veya olumsuz herhangi bir etkisi gözlenmemiştir. Petri başına sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından 0,4mg/l kinetin ve 0,5 mg/l NAA içeren MS ortamında ve 0,5 mg/l kinetin ve 0,4 mg/l NAA içeren MS ortamında sırayla 12/15 ve 24/19 hattında en yüksek sürgün oluşturma yüzdesi % 93,33 olarak belirlenmiştir. 0,5 mg/l kinetin ve 0,5 mg/l NAA içeren MS ortamında 13/3 ve 0,5 mg/l kinetin ve 0,6 mg/l NAA içeren MS ortamında ise en yüksek sürgün oluşturma yüzdesi yine 12/15 hattında görülmüştür. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından en fazla sürgün sayısı (10,01 adet), 0,5 mg/l kinetin ve 0,5 mg/l NAA içeren MS ortamında 12/15 hattında görülmüştür. Diğer ortamlarda eksplant başına sürgün sayısı bakımından dalgalı bir şekilde azalma görülmüştür. Jeannin ve ark., (1995),e göre olgunlaşmamış embriyoların farklı oranlarda sukroz içeren MS ortamlarına yerleştirilerek sürgün ve somatik embriyo oluşumuna bakılmış MS ortamında değişik oranlarda kullanılan sukrozun organogenesis ve embriyogenesiste etkili olduğu görülmüştür. Finer (1987), 14 günlük olgunlaşmamış hibrit embriyolardan bitki rejenerasyonu %6 sukroz, 1mg/l 2,4-D ve 3,3 mg/l dicamba içeren ortamda gözlenmiştir. Canpolat (1989), 10 günlük embriyolardan MS ve modifiye edilmiş Gamberg B<sub>5</sub> ortamında sürgün oluşumu gözlenmiştir.

Pover (1987), ayçiçeğinin olgunlaşmış kotiledon ve olgunlaşmamış embriyolarının kullanıldığı çalışmada 0,1 mg/l BAP, 0,5 mg/l NAA, 40mg/l adenin sülfat ve 500 mg/l casamin asit içeren MS ortamında organogeneziste başarı elde edildiği bildirilmiştir.

Gürel ve Kazan (1998), ayçiçeğinde etkin bir rejenerasyon sistemi geliştirmek amacıyla, farklı eksplantlar ve hormon tipleri kullanılarak, değişik rejenerasyon protokollerini karşılaştırmışlardır. Özellikle alt kısımlarının kullanıldığı kotiledon eksplantlarından somatik embriyogenesis elde edilmiş ancak genotipik varyasyonun hem somatik embriyo hem de kök üretimi için en kritik faktör olduğu gözlenmiştir. Bu varyasyonun etkisi 10 farklı ayçiçeğinin meristem eksplantlarından sürgün üretimi bakımından karşılaştırıldığında çok daha belirgin olarak ortaya çıkmıştır.



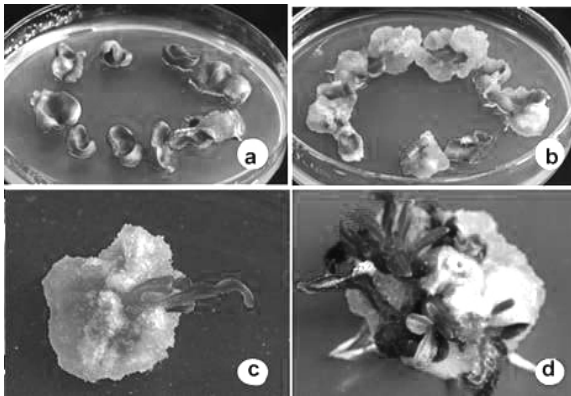
Şekil 1. Ekiz genotipinden seçilen 10 ayçiçek hattıyla yapılan olgunlaşmamış embriyo eksplantı ile *in vitro* adventif sürgün rejenerasyon çalışması (a,b) 12/15 hattına ait embriyo eksplantları üzerinde kültüre alındıktan 8 gün sonra kalluslar üzerinde sürgün oluşumu başlangıcı (c) 20 gün ve (d,e,f) 28 gün sonra sürgün gelişimi

Çizelge 1. Ayçiçeğinin olgunlaşmamış embriyo eksplantından kallus ve sürgün oluşumu

Hat	Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)	Kallus Ağırlığı (g)				Sürgün Oluşturan Eksplant yüzdesi (%)				Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)			
		0,4mg/l kinetin+0,5mg/l NAA	0,5mg/l kinetin+0,4 mg/l NAA	0,5mg/l kinetin +0,5mg /l NAA	0,5mg/l kinetin+ 0,6mg/l NAA	0,4mg/l kinetin +0,5mg /l NAA	0,5mg/l kinetin +0,4mg /l NAA	0,5mg/l kinetin+ 0,5mg/l NAA	0,5mg/l kinetin+0,6 mg/l NAA	0,4mg/l kinetin +0,5mg /l NAA	0,5mg/l kinetin+ 0,4mg/l NAA	0,5mg/l kinetin +0,5mg /l NAA	0,5mg/l kinetin+0,6m g/l NAA
12/15	90,00abc*	0,68 ha	1,64 a	3,05 a	2,75 a	93,33 a	73,33 abc	73,33 abc	86,66 a	3,98 ab	5,50 a	10,01 a	7,33 a
15/12	88,33 bc	1,93 a	1,13 b	2,00 ab	1,57 ab	73,33 b	66,66 abc	40,00 ab	26,66 bc	6,17 a	3,93 ab	2,16 d	2,50 bc
24/19	100,00 a	2,01 a	2,37 a	2,22 ab	1,51 b	86,66 a	93,33 a	46,66 ab	53,33 abc	5,68 a	4,65 ab	7,16 ab	3,03 bc
28/29	83,33 bc	1,83 a	2,56 a	1,54 b	2,49 ab	60,00 bc	86,66 ab	60,00 ab	80,00 ab	4,61 ab	3,85 ab	6,21 bc	5,05 ab
48/33	76,66 cd	1,17 a	2,28 a	2,01 ab	1,45 b	26,66 c	26,66 c	26,66 b	33,33 bc	1,33 b	1,10 b	4,33 bcd	1,53 bc
13/34	86,66 bc	2,11 a	2,39 a	2,19 ab	1,91 ab	46,66 bc	53,33 abc	66,66 ab	80,00 ab	1,13 b	3,50 ab	3,75 bcd	3,58 bc
34/26	61,66 d	1,55 a	2,15 ab	1,89 ab	1,60 ab	33,33 c	40,00 bc	33,33 ab	33,33 bc	2,00 b	1,93 ab	3,06 cd	4,50 abc
25/33	98,33 ab	1,96 a	2,07 ab	3,06 a	2,00 ab	86,66 a	53,33 abc	46,66 ab	26,66 bc	4,26 ab	2,26 ab	2,76 cd	4,16 abc
5/6	80,83 bc	1,96 a	2,42 a	1,93 ab	1,83 ab	53,33 bc	60,00 abc	60,00 ab	20,00 c	1,86 b	2,13 ab	2,83 cd	0,88 c
13/3	83,33 bc	2,04 a	2,38 a	1,75 ab	2,17 ab	86,66 a	60,00 abc	86,66 a	40,00 abc	6,86 a	5,01 a	4,90 bcd	2,00 bc

\*\*Aynı sütunda farklı harfle gösteren ortamlar arasında fark 0.01 düzeyinde önemlidir

Olgunlaşmamış kotiledon eksplantının kullanıldığı çalışmada kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından 12/15 hattında % 89,89 kallus oluşumu görülmüştür. Bunun dışında 13/3, 15/12 ve 28/29 hatlarında sırasıyla % 82,64, % 74,24 ve % 71,65 kallus oluşumu görülürken, en az kallus oluşumu 5/6 hattında % 60,52 olarak belirlenmiştir. Kallus ağırlığı bakımından 1,48 g ile en yüksek kallus ağırlığı 12/15 hattında görülürken bunu 1,44 g ile 13/3 hattı takip etmiş ve istatistiksel olarak aynı sütunda yer almışlardır. En düşük kallus ağırlığı 0,74 g ile 5/6 hattında gözlenmiştir (Çizelge 2). Sürgün oluşturan eksplant sayısı ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından fark önemsiz bulunmuştur. Sarrafi ve ark. (1996), SS-56 çeşidinin 2 günlük fidelerinden alınan kotiledon eksplantları 2 mg/l BAP, veya 2 mg/l 2,4-D, veya 0,7 mg/l Kinetin + 2,5 mg/l 2,4-D, 2 mg/l IAA+ Kinetin veya 2,5 mg/l NAA+ Kinetin içeren MS, LS, B<sub>5</sub> ve Blaydes ortamlarına yerleştirilmiş ve en yüksek kallus oluşumu MS ortamında gözlenirken en düşük kallus oluşumu Blaydes ortamında gözlenmiştir. Nestares ve ark. (1999)'a göre, MS ortamına 200 mg/l glutamin 1 mg/l IAA ve 2 mg/l Kinetin ilave edilip 5 şekilde kullanılmıştır. 1.2.3. ortam 9,11,13 g/l agar ile 4. Ortam 3 g/l gelrite ile katılaştırılmış 5. Ortama ½ MS 9 g/l agar konulmuştur. Ayçiçeğinin H300B ve RK456B çeşitlerinin olgunlaşmış tohumlarından elde edilen kotiledonlar 30 gün 25 °C de 12 saatlik fotoperyotla inkübe edilmiş ve ortamlar arasında önemli farklılıklar görülmüştür. 3.ortamda en az vitrifikasyon ve en iyi rejenerasyon gözlenirken en fazla vitrifikasyon 4. ve 5. Ortamda görülmüştür. Sonuçta besi ortamındaki tuz konsantrasyonu ve ortamı katılaştırmak için kullanılan jel maddelerinin vitrifikasyonda etkili olduğu ispat edilmiştir



Şekil 2. Ekiz genotipinden seçilen 10 ayçiçek hattıyla yapılan olgunlaşmamış kotiledon ile *in vitro* adventif sürgün rejenerasyon çalışması (a) 12/15 hattına ait kotiledon eksplantları üzerine kültürden 5 gün sonra kallus oluşumu başlangıcı (b) 10 gün sonra kallus oluşumu görüntüsü (c) 15 günlük kallus üzerinde gelişen sürgün (d) ve 28 günlük kallus üzerinde gelişen sürgünler.

Çizelge 2. Ayçiçeğinin olgunlaşmamış kotiledon eksplantından kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu

Hat	Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)	Kallus Ağırlığı (g)
12/15	89,89 a**	1,48 a
15/12	74,24 bc	1,38 ab
24/19	62,99 c	0,92 bc
28/29	71,65 bc	1,02 abc
48/33	62,61 c	1,04 abc
13/34	71,62 bc	0,94 bc
34/26	71,15 bc	1,15 abc
25/33	69,76 bc	1,37 ab
5/6	60,52 c	0,74 c
13/3	82,64 ab	1,44 a

\*\*\*Aynı sütunda farklı harfle gösteren ortamlar arasında fark 0.01 düzeyinde önemlidir

Bizim çalışmamızda da vitrifikasyon gözlenmiştir. Vitrifikasyonu azaltmak amacıyla ortamdaki sukroz miktarı 20 g/l'den 15g/l'ye düşürülmüştür. Ortamlardaki jel maddesi olarak agar kullanılarak ve sık aralıklarla alt kültüre alınarak vitrifikasyon önlenmeye çalışılmıştır.

Her iki eksplant içinde aynı ortamlar kullanılmasına rağmen eksplantların gelişim süreçlerinde farklılıklar görülmüştür. Olgunlaşmamış embriyo eksplantlarında ilk 8 gün içinde sürgün gelişimi görülürken kotiledon eksplantlarının sürgün gelişimi önemsiz olarak nitelendirilmiştir.

#### Kaynaklar

- Badea, E., M. Prisecaru and H. Angheluta. 1989. Studies on gynogenesis in intraspecific and interspecific hybrids in the genus *Helianthus*. *Cercet Genet Veg Anim*, 1:177-183.
- Baker, MC., N. Munoz-Fernandez and CD. Carter. 1999. Improved shoot development and rooting from mature cotyledons of sunflower. *Plant Cell Tiss. Org. Cult* 58:39-49
- Bidney, D., C. Scelonge, J. Martich, M. Burrus, L. Sims and G. Huffman. 1992. Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol.*, 18:301-313.
- Bohorova, N, A., A. Atanassov and J. Georgieva-Todorova. 1985. *In vitro* organogenesis, androgenesis and embryo culture in the genus *Helianthus*. *Z. Pflanzenzuchtg*, 95:35-44.
- Burrus, M., C. Chanabe, G. Alibert and D. Bidney. 1991. Regeneration of fertile plants from protoplasts of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell Rep.*, 10:161-166.

- Canpolat, N. 1989. Interspecific hybridization in the genus *Helianthus* through embryo rescue.", In partial fulfillment of the degree of master of science Colorado state university Fort Collins, Colorado, 1-94.
- Ceriani, MF., HE. Hopp, G. Hahne and AS. Escandon. 1992. Cotyledons: an explant for routine regeneration of sunflower plants. *Plant Cell Physiol.*, 33:157-164.
- Chraibi, KMB., J-C. Castelle, A. Latche, J-P. Roustan and J. Falot. 1992a. A genotype-independent system of regeneration from cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). The role of ethylene. *Plant Sci* 86:215-221
- Chraibi, KMB., J-C. Castelle, A. Latche, J-P. Roustan and J. Falot. 1992b. Enhancement of shoot regeneration potential by liquid medium culture from mature cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell Rep.*, 10:617-620.
- Chraibi, KMB., A. Latche, J-P. Roustan and J. Falot. 1991. Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitors, silver and cobalt. *Plant Cell Rep.*, 10:204-207.
- Cooley, GL. and A. Wilcox. 1987. Sunflower regeneration through embryogenesis. United States Patent, 4: 670, 392.
- Dedio, W. and ED. Putt. 1980. Sunflower. In: Hybridization of crop plants. W.R. Fehr and H H Hadley (eds). Amer Soc. Of agronomy, Madison, WI. pp 632-644.
- Espinasse, A. and C. Lay. 1989. Shoot regeneration of callus derived from globular to torpedo embryos from 59 sunflower genotypes. *Crop Sci.*, 29:201-205.
- Finer, J. J. 1987. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) on a high sucrose containing medium. *Plant Cell Rep.*, 6: 372-374.
- Fiore, MC., T. Trabace and F. Sunseri. 1997. High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons via somatic embryogenesis.", *Plant Cell Reports*, 16 (5) 295-298.
- Freyssinet, M. And G. Freyssinet. 1988. Plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature embryos. *Plant Sci.*, 56:177-181.
- Gelebart, P. and L. San. 1987. Obtention de plantlets haploids par culture in vitro d'ovaires non fecodes de tournesol (*Helianthus annuus* L.). *Agronomie*, 7:81-86.
- Greco, B., OA. Tanzarella, G. Carozzo and A. Blanco. 1984. Callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Sci Lett*, 36:73-77.
- Gürel, E. and K. Kazan. 1998. Development of an efficient plant regeneration system in sunflower (*Helianthus annuus* L.) *Tr. J. of Botany*, 22:381-387.
- Prado, E. and A. Berville. 1990). Induction of somatic embryo development by liquid culture in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Sci.*, 67:73-82.
- Jeannin, G., R. Bronner and G. Hahne. 1995. Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L) cultivated in vitro: role of the sugar. *Plant Cell Rep.*, 15:200-204.
- Knittel, N., AS. Escandon and G. Hahne. 1991. Plant regeneration at high frequency from mature sunflower cotyledons. *Plant Sci.*, 73:219-226.
- Knittel, N., V. Gruber, G. Hahne and P. Lenee. 1994 Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): a reliable protocol. *Plant Cell Rep.*, 14:81-86.
- Kolsarıcı, Ö., N. Bayraktar, N. İşler, M. Mert and B. Arslan. 1995. "Yağlı tohumlu bitkilerin Üretim Projeksiyonları ve Üretim Hedefleri." IV. Teknik Tarım Kongresi Bildiri Kitabı, cilt. I. Ankara, 467-483.
- Krasnyanski, S. and L. Menczel. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl protoplasts of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell Rep.*, 12:260-263.
- Lahaye, L., P. Ganier, J., Thibault and B. Sève. 2004. "Technological processes of feed manufacturing affect protein endogenous losses and amino acid availability for body protein deposition in pigs." *Animal Feed Science and Technology.*, 113: 141-156.
- Lupi, MC., A. Bennici, F. Locci and D. Gennai. 1987. Plantlet formation from callus and shoot-tip culture of *Helianthus annuus* (L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 11:47-55.
- Monnier, M. 1978. Culture of zygotic embryos. In: Int cong. Plant tissue cell culture. Univ. Of Calgary, Calgary, Alberta, Canada. Pp 277-278.
- Murashige, T. and F. Skkog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Nestares, GM., R. Zorzoli, LA. Mroginski and LA. Picardi. 1999. "Micropropagation and vitrification of sunflower genotypes.", *Phyton Buenos Aires*, 65:1-2, 107-112.
- Paterson, KE. and NP. Everett. 1985. Regeneration of *Helianthus annuus* inbred plants from callus. *Plant Sci.*, 42:126-132.
- Pelissier, B., O. Bouchfra, R. Pepin and G. Freyssinet. 1990. Production of isolated somatic embryos from sunflower thin layers. *Plant, Cell Rep* 9:47-50.
- Power, C. J. 1987. Organogenesis from *Helianthus annuus* inbreds and hybrids from cotyledons of zygotic embryos. *Amer. J. Bot.*, 74: 497-503.
- Sarrafi, A., AR. Bolandi, H. Serieys, A. Berville and G. Alibert. 1996. Analysis of cotyledon culture to measure genetic variability for organogenesis parameters in sunflower (*Helianthus annuus* L.)" *Plant Sciences Limerick*, 121 (2), 213-219.

- Snedecor, G.W. and W.G. Cochran. 1967. Statistical methods. The Iowa State Univ. Press, Iowa. USA.
- Sujatha, M. and A.J. Prabakaran. 2001. High frequency embryogenesis in immature zygotic embryos of sunflower. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 65:23-29.
- Thengane, SR., MS. Joshi, SS. Khuspe and AF. Mascarenhas. 1994. Anther culture in *Helianthus annuus* L., influence of genotype and culture conditions on embryo induction and plant regeneration. *Plant Cell Rep.*, 13:222-226.
- Verleyen, T., R. Verhe, L. Garcia, K. Dewettinck, A. Huyghebaert and W. De-Greyt. 2001. "Gas chromatographic characterization of vegetable oil deodorization. *Distillate J. Chromatography A*, 921:277-285.
- Wagner, K.-H., R. Tomasch and I. Elmadfa. 2001. Impact of diets containing corn oil or olive /sunflower oil mixture on the human plasma and lipoprotein lipid metabolism. *Eur J Nutr*, 40 : 161-167.
- Wingender, R., H-J. Henn, S. Barth, D. Voeste, H. Machlab, H. Schnabl. 1996. A regeneration protocol for sunflower (*Helianthus annuus* L.) protoplasts. *Plant Cell Rep.*, 15:742-745.
- Witzens, B., WR. Scowcroft, RW. Downes and PJ. Larkin. 1988. Tissue culture and plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus*) and interspecific hybrids (*H tuberosus* x *H. annuus*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 13:61-76.

---

**İletişim Adresi:**

Ülkü BİNBOĞA MERAL

Gazi Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü-Ankara.

E-posta: [ubmeral@yahoo.com](mailto:ubmeral@yahoo.com)