

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENDEMİK *Centaurea tchihatcheffii* Fish.& Mey. (YANARDÖNER) BİTKİSİNDE
in vitro KOŞULLARDA POLİPLOİD BİTKİ ELDE ETME ÜZERİNDE
ARAŞTIRMALAR

Hanife ÖZLER

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Ş. Şebnem ELLİALTIOĞLU

TEMMUZ

2014

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Hanife ÖZLER

ONAY

Prof. Dr. Ş. Şebnem Ellialtıoğlu danışmanlığında Hanife zler tarafından hazırlanan bu alışma 31/07/2014 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ş. Şebnem Ellialtıoğlu

İmza:

ye: Prof. Dr. Yeşim Okay

İmza:

ye: Prof. Dr. Murat Zencirkıran

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ENDEMİK *Centaurea tchihatcheffii* Fish.&Mey. (YANARDÖNER) BİTKİSİNDE *in vitro* KOŞULLARDA POLİPLOİD BİTKİ ELDE ETME ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Hanife Özler

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Ş. Şebnem Ellialtıoğlu

Özet Metni

Dünyada sadece Ankara–Gölbaşı’nda sınırlı bir alanda yaşamakta olan ve uluslararası kayıtlarda nesli tükenme tehlikesi altında bitkiler grubunda yer alan endemik *Centaurea tchihatcheffii* Fish.&Mey. (Yanardöner, Sevgi Çiçeği, Sentorya) türünde *in vitro* çimlendirme, proliferasyon ve poliploidi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *Centaurea tchihatcheffii* Fish. & Mey. tohumlarının *in vitro* koşullarda çimlenmeleri üzerine farklı besin ortamı ve GA₃ konsantrasyonlarının etkileri araştırılmış, 1 mg/L ve 2 mg/L GA₃ ilave edilen MS besin ortamında en yüksek çimlenme oranları (sırasıyla %83.6, %85.2) elde edilmiştir. *In vitro* koşullarda çimlendirilen bitkilerden hazırlanan eksplantlardan hızlı vegetatif çoğaltım yapılmak amacıyla en uygun eksplant tipi, dikim şekli ve besin ortamı kompozisyonunun belirlenmesi üzerine denemeler yapılmıştır. Sürgün çoğaltımı aşamasında eksplant başına en yüksek sürgün oluşumu 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP kombinasyonunun 1. alt kültüründe elde edilmiştir (2.05 adet sürgün/eksplant). Hormonsuz MS ortamında %70, 1 mg/L IBA katkılı ortamda ise %86 oranında köklenme elde edilmiştir.

Poliploid bitki elde etmek amacıyla yapılan çalışmalarda ise farklı kolhisin konsantrasyonları ile uygulama sürelerinin etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla uygulanan 100 mg /L kolhisin içeren ortamda 7 gün bekletilen eksplantlarda yaşama oranı %100, gelişme oranı ise %50 olarak belirlenmiştir. Doku kültürü yoluyla çoğaltma konusunda önemli gelişmeler kaydedilen bu bitki türü, park-bahçelerde yerini alabilecek potansiyelde görülmüştür.

2014, 100 sayfa

Anahtar kelimeler: *Centaurea tchihatcheffii* Fish.&Mey, *in vitro*, çimlendirme, proliferasyon, poliploidi.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Investigations on the obtaining poliploid plants in endemic *Centaurea tchihatcheffii* (Fish.&Mey) under *in vitro* conditions.

Hanife Özler

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. Ş. Şebnem Ellialtıoğlu

Abstract Text

The *in vitro* germination, proliferation and polyploidy studies were carried out in the endemic species of *Centaurea tchihatcheffii* Fish. & Mey. (Yanardöner, Love Flower, Sentoria) that is locate in a limited area of Ankara-Golbasi and in danger of extinction in IUCN category. The effects of different nutrient medium and GA₃ concentrations were investigated *in vitro* germination of *Centaurea tchihatcheffii* seeds. The highest germination rates were obtained from the MS medium supplemented with 1 mg/L and 2 mg/L GA₃ as 83.6% and 85.2% respectively. The experiments were performed on the most suitable type of explant, form of planting and composition of nutrient medium for micropropagation by using *in vitro* seedlings as explant sources. In the stage of proliferation, the highest shoot formation per explant were obtained from the first subculture of 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP (2.05 per shoot / explant). The rooting was obtained on hormone free MS medium in 70% and added with 1 mg/L IBA medium in 86%.

In the studies in order to obtain polyploid plants, the different concentration of colchicine applications and the effects of application duration were investigated. For this purpose the explants are incubated 7 days containing 100 mg/L colchisine in the medium was obtained as 100% survival rate and as 50% growth rate. The possibility of multiplication with tissue culture on this plant if take the necessary steps was seen take place in parks and gardens in potential.

2014, 100 pages

Key words: *Centaurea tchihatcheffii* Fish.&Mey, *in vitro*, germination, proliferation, polyploidy.

TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesinden sonuçlanma aşamasına kadar değerli bilgi, deneyim ve görüşlerinin yanısıra her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Ő. Şebnem Ellialtıoğlu'na, çalışmam sürecinde özverili yardımlarıyla bana güç veren hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Cevdet Gümüş'e teőekkürlerimi sunarım. Bu uzun süreçte gösterdikleri anlayıştan dolayı Orser Kont. ve Sert. Ltd. Şti.'ne, deneylerin yürütölmesi esnasında yardımcı olan arkadaşlarıma ve herdaim yanımda olan aileme Őükranlarımlı sunarım.

Bu tez alışması Ankara Üniversitesi BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü) "Endemik *Centaurea tchihatcheffii* Fish.& Mey. (Yanardöner) ieğinin Süs Bitkileri Sektörüne Kazandırılması alışmaları" adlı ve 09B4347011 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ONAY	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	6
2.1. <i>Centaurea</i> cinsi ve <i>C. tchihatcheffii</i> hakkında bilgiler	6
2.2. Sentorya (Yanardöner= <i>C. tchihatcheffii</i>) Bitkisinin Tohumla Çoğaltımı	11
2.3. Mikroçoğaltım	12
2.4. <i>Centaurea</i> cinsi ile bazı tıbbi ve aromatik bitkilerde yapılan doku kültürü çalışmaları.....	16
2.5. Poliploid Bitkilerin Özellikleri ve Elde Edilme Yöntemleri	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM	31
3.1. Materyal.....	31
3.2. Yöntem	33
3.2.1. Genel doku kültürü şartları	33
3.2.2. Tohumların yüzeysel sterilizasyonu ve çimlendirilmesi	34
3.2.3. Tohum çimlendirme denemeleri.....	36

3.2.4. Proliferasyon aşaması için eksplantların dikimi	37
3.2.5. Proliferasyon (Sürgün Çoğaltma) denemeleri	38
3.2.6. Sürgünlerin köklendirilmesi	39
3.2.7. Bitkilerin dış koşullara alıştırılması.....	40
3.2.8. Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizler	41
3.2.9. Kolhisin uygulamaları	42
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	45
4.1. Tohum çimlendirme aşaması.....	45
4.2. Mikro çoğaltım aşaması	48
4.2.1. IBA + BAP Kombinasyonları ile yapılan denemeler	48
4.2.2. BAP + GA ₃ + IBA Kombinasyonları ile yapılan denemeler.....	54
4.3. Köklendirme aşaması	59
4.4. Bitkiciklerin Dış Koşullara Alıştırılması.....	63
4.5. Kolhisin Uygulamalarının Yaşama ve Gelişimi Oranları Üzerine Etkisi.....	66
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	70
KAYNAKLAR.....	81
ÖZGEÇMİŞ	93

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Centaurea tchihatcheffii</i> Fish.&Mey. bitkisinin görünümü	2
Şekil 1.2. <i>Centaurea tchihatcheffii</i> Fish.&Mey. çiçekleri.....	3
Şekil 2.1. Yanardöner (<i>Centaurea tchihatcheffii</i>) bitkisinin görünümü.....	10
Şekil 3.1.Gölbaşı'nda tohum toplanan sentorya arazisinden genel bir görünüş.....	31
Şekil 3.2. Tohum toplama aşamasında arazide yan yana bulunan bir sentorya çiçeği ve içerisinde tohumların olgunlaştığı olgun bir sentorya meyvesi.....	32
Şekil 3.3. <i>Centaurea tchihatcheffii</i> 'nin aken tipi meyvesi	32
Şekil 3.4. Sentorya bitkisinin tohum ekiminden başlayarak tüm doku kültürü aşamalarında yapılan çalışmalarda kullanılan aseptik koşullarda çalışmaların yapıldığı laminar akışlı kabinde çalışma anından bir görünüm.....	35
Şekil 3.5. Besin ortamına ekimi tamamlanmış bir sentorya tohumu ve çimlenmenin tamamlanmasından sonra oluşan <i>in vitro</i> fidecik.	36
Şekil 3.6. Proliferasyon aşamasında kullanılacak eksplantların hazırlandığı, <i>in vitro</i> koşullarda çimlendirilmiş sentorya fideleri	37
Şekil 3.7. Besin ortamlarına yerleştirilmiş sentorya eksplantları. Üstte solda: yatay yerleştirilen tek boğum eksplantları	38
Şekil 3.8. Köklendirme aşamasındaki sentorya sürgünlerine ait bir görünüm.....	40
Şekil 3.9. Torf doldurulmuş plastik saksılara aktarılmış sentorya bitkilerinin aktarımdan hemen sonraki görünümleri	41
Şekil 3.10. Vermikulit doldurulmuş plastik saksılara aktarılmış sentorya bitkileri ve aktarma işleminden bir hafta sonra üzerindeki kaptaki açılan büyük delikler	41
Şekil 3.11. Otoklavdan çıkmış ve sıcaklığı 70 °C civarına düşmüş besin ortamına, aseptik koşullar altında kolhisin çözeltisinin filtre sterilizasyonu yoluyla ilave edilmesi.....	43
Şekil 3.12. Kolhisin uygulama işlemlerine ait görünümler	44
Şekil 4.1. Hormonsuz MS ortamında çimlenen sentorya (<i>Centaurea tchihatcheffii</i>)	47
Şekil 4.2. 1 mg/L GA ₃ içeren ortamlarda çimlenen ve gelişen sentorya bitkileri	48
Şekil 4.3. Proliferasyon ortamına aktarılan eksplantlardan gelişen sürgünler	51

Şekil 4.4. Alt kültürlerde kullanılan ve birinci alt kültüre henüz aktarılmış tek boğum eksplantlarına bir örnek.....	52
Şekil 4.5. 0.5 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP içeren ortamlarda bir eksplant üzerinde 2.alt kültürün sonunda oluşan aksillar sürgünler	53
Şekil 4.6. 1.0 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP içeren ortam üzerinde gelişmiş bir sentorya eksplantı.....	53
Şekil 4.7. 1.0 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP içeren ortamlarda ikinci alt kültürde oluşan camsılaşmış ve rozetleşmiş eksplantlar	54
Şekil 4.8. 0.5 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L GA ₃ kombinasyonunun 1. alt kültüründe elde edilen aksillar sürgünler	55
Şekil 4.9. 0.5 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L GA ₃ kombinasyonunu içeren ortamda 2.alt kültürde bir eksplanttan oluşan ve 3.alt kültüre alınmak üzere hazırlanmış aksillar sürgünler	56
Şekil 4.10. 1.0 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L GA ₃ kombinasyonuna sahip ortamda gelişen 3. alt kültürdeki sentorya sürgünleri.....	56
Şekil 4.11. 3.0 mg/L BAP + 1.0 mg/L GA ₃ ilave edilen MS ortamında 2.alt kültür aşamasındaki sentorya sürgünleri.....	57
Şekil 4.12. Köklenmiş sentorya bitkileri	61
Şekil 4.13. 0.1 mg/L IBA içeren MS ortamlarına 3.alt kültürden aktarılan sürgünlerde köklenme ve ayrıca yapraklardaki camsılaşma eğilimi.....	61
Şekil 4.14. 1.0 mg/L IBA içeren besin ortamında meydana gelen köklenmelere örnekler..	62
Şekil 4.15. Hormonsuz MS ortamı üzerinde köklenmeye alınan sürgünler üzerinde çiçek tomurcuklarının oluşumu.....	64
Şekil 4.16. <i>In vitro</i> koşullarda açmış bir sentorya çiçeği.....	65
Şekil 4.17. Bitkilerin gelişimine ilişkin bazı görüntüler.....	65
Şekil 4.18. Kolhisin uygulamalarından gelişen sürgünler	66
Şekil 4.19. Gelişmelerine devam eden sürgünler	67
Şekil 4.20. Yaşama belirtisi gösteren ancak sürgün gelişimi sağlanamayan eksplantlar	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Türkiye florasında tür sayısı bakımından en zengin ilk 10 cins.....	7
Çizelge 3.1. MS temel besin ortamında bulunan besin maddeleri ve konsantrasyonları	34
Çizelge 4.1. 2011 ve 2012 yılları içerisinde denemelerde kullanılan <i>in vitro</i> bitkilerin elde edilmesi için yapılan sentorya tohum ekimlerinden elde edilen tohum çimlenme oranları 46	
Çizelge 4.2. Tohumlardan gelişen <i>in vitro</i> fidelerden hazırlanan Eksplantların farklı IBA+BAP kombinasyonlarından 5 hafta süre sonunda elde edilen sürgün gelişme oranları ve eksplant başına aksillar sürgün sayıları	49
Çizelge 4.3. IBA ve BAP'nin ikişer dozunun kombine edildiği ortam bileşimlerinde 3 alt kültür boyunca belirlenen sürgün veren eksplant oranı, eksplant başına toplamda elde edilen ortalama sürgün sayıları.....	58
Çizelge 4.4. IBA + BAP + GA ₃ 'ün kombine edildiği ortam bileşimlerinde 3 alt kültür boyunca belirlenen sürgün veren eksplant oranı, eksplant başına toplamda elde edilen ortalama sürgün sayıları.....	59
Çizelge 4.5. Hormonsuz MS veya 0.1 mg/L IBA ilave edilmiş MS ortamlarına aktarılan sentorya sürgünlerinin köklenme oranları	60
Çizelge 4.6. Kolhisin uygulamaları sonrasında eksplantların yaşama oranı, <i>in vitro</i> koşullarda sürgün oluşturarak gelişen eksplantların oranı ve serada gelişmesine devam eden bitki sayısı	68

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat
GA ₃	Gibberellik asit
ppm	Par per million (milyonda bir)
mm	Milimetre
BAP	6-Benzil amino pürin
TDZ	Thidiazuron
IAA	İndol-3-asetik asit
NAA	Naftalen asetik asit
mg	Miligram
L	Litre
v/v	Hacimce yüzde
µm	Mikrometre
dk	Dakika
cm	Santimetre
g/l	Gram/Litre
µM	Mikromolar
ml	Mililitre
CPA	4-clorofenoksiasetik asit
IBA	Indol-3-bütirik asit

1. GİRİŞ

Tüm canlı ve cansız sistemlerde, evrende yer alan tüm oluşumlarda büyük bir çeşitlilik ve sınırsızlık durumu hakimdir. Bunların içerisinde bir kavram olan biyolojik çeşitlilik ya da biyoçeşitlilik, ekosistemlere güç, canlılık, direnç, denge, renk kazandıran dinamik bir nitelik taşımaktadır. ‘Biyolojik çeşitlilik(1)’, türler içerisinde ve türler arasında genetik farklılıklardan dolayı görülen çeşitlilik(2); belirli bir alan, çevre, ekosistem veya dünyadaki canlıların genetik, taksonomik ve ekosistem çeşitliliği; bir bölgedeki genlerin, türlerin, ekosistemlerin ve ekolojik olayların oluşturduğu bir bütün(3) olarak çeşitli şekillerde tanımlanmaktadır. Türkiye Çevre Vakfı (2001)’na(4) göre, ‘Biyolojik çeşitlilik’ herhangi bir ekosistemde doğal olarak bulunan birden fazla canlı türü varlığıdır ve belirli genişlikteki bir ekosistemde bulunan türlerin sayısı, o ekosistemin biyolojik zenginliğinin ölçütü sayılmaktadır. Bitkilerin, hayvanların, mikroorganizmaların bütün türlerini, ekosistemleri ve bu ekosistemlerin parçaları olan ekolojik süreçleri içermektedir(5). Çepel (2003) ise bu kavramı, genetik farklılıklara sahip canlı türlerinden oluşan, değişik işlevlere sahip, çeşitli ekosistemlere dağılmış bulunan, sayı ve tür bakımından zengin canlılar toplumunun oluşturduğu yaşam dünyaları olarak tanımlamaktadır(6). Değişik boyutlarda ele alınmakta olan ve bir bölgedeki genlerin, türlerin, ekosistemlerin ve ekolojik olayların oluşturduğu bir bütün olan biyolojik çeşitlilik; çok sayıdaki hiyerarşik bileşenlerin toplamıdır ve belli bir bölgedeki ekosistemler, yaşam toplumları, türler, populasyonlar ve genlerin sayısını da ifade etmektedir(7,8). Biyolojik çeşitlilikteki bozulmaların ve bir türün yok olması biçimindeki kayıpların diğer türleri nasıl etkileyeceğini önceden tahmin etmek mümkün olmamakla birlikte, en önemli kaybın genetik çeşitliliğin azalması yönünde olacağı düşünülmektedir(9).

Türkiye, bitkisel çeşitlilik açısından dünya ülkeleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Ülkemizde 9222 bitki türü, 12006 takson, 2891 endemik bitki türü ve 3778 endemik bitki taksonu bulunmaktadır(10). Avrupa kıta florasının sahip olduğu tür sayısı 12000, endemik tür sayısı ise 2750 civarındadır(11). Sadece belli bir bölgeye özgün olup, başka hiçbir yerde bulunmayan endemik türlerin, aynı ortamdaki bütün canlı türler içindeki yüzde payı olarak ifade edilen endemizm oranı, bitkiler açısından, ülkemizde %30’dur(12,13). Bu oluşumun en önemli nedenleri; iklim farklılıkları, topografik, jeolojik ve jeomorfoloji çeşitlilikler, deniz, göl, akarsu gibi değişik su ortamı çeşitlilikleri, yükseklik ve ekolojik farklılıklardır(14,15). Endemik terimi, bitki bilimi içerisinde “kıta, ülke, bölge gibi sınırlı

yayıllara sahip” bitki gruplarını tanımlamak amacıyla kullanılmaktadır. Türkiye’de endemik türlerin fazlalığı her ne kadar büyük bir zenginlik potansiyelini göstermekteyse de, hayvan otlatma, ormanların tahribi, yerleşim alanlarının genişlemesi ve ekolojik dengelerin bozulması gibi nedenlerle endemik türler de tehdit altında olarak görülmektedir. Bu durum, hem biyolojik mirasımızın gelecek kuşaklara bırakılmasının, hem de sahip olunan doğal kaynaklarımızdan gereği gibi yararlanılmasının önemini ortaya koymaktadır.

Ankara florasında 99 familya, 495 cinse ait 1365 çiçekli bitki türü bulunduğu ve bunların %19.85’inin endemik olduğu kaydedilmiştir(16). Ankara’nın biyolojik çeşitlilik bakımından en önemli yerlerinden olan ve 22.10.1990 tarihinde 90/1117 sayılı Bakanlar Kurulu Kararıyla Gölbaşı Özel Çevre Koruma Bölgesi olarak tespit ve ilan edilen Mogan-Eymir Gölleri yakın çevresinde 52’si endemik olmak üzere 488 bitki türü ve 22’si yırtıcı olmak üzere 200 civarında kuş türü tespit edilmiştir. Bölgede biyoçeşitlilik açısından çok önemli olan endemik türlerden birisi de Sevgi Çiçeği adıyla bilinen veya Yanardöner olarak adlandırılan *Centaurea tchihatcheffii*’dir.

Asteraceae familyasında yer alan türlerden *Centaurea tchihatcheffii* Fish.&Mey., tek yıllık, 25-30 cm boylanabilen, Nisan sonlarında ve Mayıs’ta çiçek açan, çok güzel ve çarpıcı mor, kırmızı, pembe renkte çiçeklere sahip olan otsu bir bitkidir. 1848 yılında Afyon çevresinde yetiştiğine dair kayıt bulunmakla birlikte, *C. tchihatcheffii* günümüzde, sadece Ankara Gölbaşı’nda yetişen endemik bir türdür(17).



Şekil 1.1. *Centaurea tchihatcheffii* Fish.&Mey. bitkisinin görünümü(9,18)



Şekil 1.2. *Centaurea tchihatcheffii* Fish.&Mey. çiçekleri(9,18)

Daha önceki yıllarda Gölbaşı çevresindeki tarlalarda yaygın olarak görülen bu bitkinin popülasyon yoğunluğu, yetiştiği doğal habitatların yerleşime açılması sonucu ortaya çıkan yoğun yapılaşma, yol genişletme faaliyetleri, anız yakılması, yoğun herbisit kullanımı gibi bilinçsiz tarım uygulamaları, süs bitkisi olarak kullanılma potansiyeli dolayısıyla bilinçsizce yapılan sökümler ve Ankara pazarlarında kesme çiçek olarak satılması gibi nedenlerle hızla azalmaktadır. Günümüzde sadece Ankara Mogan Gölü civarında tesis edilen birkaç hektarlık Ankara Valiliği Çevre Koruma Vakfına ait ağaçlandırma alanı olan Süleyman Demirel Ormanı'nda 3-5 kilometrekare kadar olan sınırlı bir alanda yaşamakta olan bu endemik bitki, "Kırmızı Bülten'de 'Kritik (Critically Endangered-CR)'; IUCN (Dünya Doğayı Koruma Birliği) kriterlerine göre 'Nesli Tehlike Altında'; Bern Sözleşmesi'ne (Avrupa'nın Yaban Hayatı ve Yaşama Ortamlarının Korunması Sözleşmesi) göre de 'Kesin Korunan Bitki Türü' listesinde yer almaktadır(9,11,19-21).

Nesli tükenmekte olan türlerin etkin biçimde korunmasındaki yöntemlerden bir kısmı *in situ*, diğer bir kısmı *ex situ* kapsamındadır. Bu yöntemlerden hangisinin etkin olduğu tür bazında farklılık gösterebilmektedir(22). *In situ* koruma, nesli tükenme tehdidi altındaki türlerin doğal parklarda veya doğal alanlarda yani yerinde korunmasıdır. Milli parklar, tabiatı koruma alanları, üretim istasyonları, özel koruma bölgeleri bu kapsamda değerlendirilmektedir. Bu yöntemde türler ve dolayısıyla genler, doğal yaşama alanlarında diğer canlılarla birlikte, biyolojik bütünlük içinde korunur. Doğal çevrede devamlılık sağlamanın yararlarından biri, sorunlu türlerin kendi doğal fizyolojik ve biyolojik çevreleriyle bütünleşik olarak gelişmesidir(15,23).

Ex situ koruma, doğal habitatlarından uzaklaştırılarak bitkilerin doğal ortamlar dışında korunması anlamını taşımaktadır. Tohum bankaları, sperm ve yumurta bankaları, klon bankaları, doku kültürü koşullarında kriyoprezervasyon, botanik bahçeleri, arboretumlar gibi tesisler *ex situ* koruma alanında değerlendirilir. Kontrollü koşullarda materyalin uzun yıllar korunması sağlansa da yüksek teknolojiye ihtiyaç duyulması, doğal evrimin durması ve risklere açık olması gibi olumsuzluklar bulunmaktadır(15,24). Populasyonların *ex situ* güçlendirilmesi çalışmaları kapsamında in vitro teknikler de gündeme gelir(25).

Centaurea tchihatcheffii'nin endemik konumu ve korunması çerçevesinde bazı inceleme ve araştırmalar yapılmış olmakla birlikte(18,26,27), bu türün çoğaltılmasına ilişkin çalışmaların sayısı sınırlıdır. Tohumla çoğaltımında bazı sorunların olduğu bunun için bazı uygulamalar yapılması gerektiği, Okay ve Demir (2010) tarafından kaydedilmiştir(27). Yapılan literatür taramasında farklı *Centaurea* türlerinin doku kültürü yoluyla çoğaltılmasına ilişkin bazı bulgulara rastlanmıştır(15,28-31). Araştırmacılar, *C. tchihatcheffii*'nin doku kültürü ile çoğaltımına uygun koşulların optimize edilmesi gerektiğini ifade etmektedirler. *Centaurea tchihatcheffii* doğada tohumları ile çoğalmakta ancak tohumlar klasik yöntemlerle çimlenmeye alındığında sorunlarla karşılaşabilmektedir. Türün çoğaltımındaki engeller ve süs bitkisi olarak kullanılabilme potansiyeli dikkate alındığında, bu türün korunması ve çoğaltılmasında, doku kültürü ile çoğaltımın sorunsuzca hayata geçirilmesi yönündeki çalışmaların gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

C. tchihatcheffii'nin diğer ülkelerde yetişmemesi, yurtdışına ihrac potansiyelini de beraberinde getirmektedir. Ancak, ihracat aşaması için mutlaka üretim yapılması, doğal bitkilerin sökümünün kesinlikle durdurulması ve tohumlu örneklerin ihracatından kaçınılması gerekmektedir. Doğal formlar kullanılarak yapılacak bazı ıslah çalışmalarıyla, *C. tchihatcheffii*'nin daha büyük, katmerlere sahip olan bireylerinin de üretilebileceğini belirten Erik ve ark. (2005), ayrıca bu türün farmokognozi ve ekoturizm alanlarındaki katkılarına da dikkat çekmektedirler. Bu özellikleri ile çiçekçilik sektöründe *C. tchihatcheffii*'nin önemli bir yer tutacağı ve ekonomiye belirli ölçüde katkı sağlayacağı kuşkusuzdur (32).

Sentorya bitkisi, tohumla çoğalması nedeniyle geniş bir varyasyona sahiptir. Bu varyasyon bitkinin fenotipik özelliklerinin tümüne yansımaktadır. Süs bitkisi olarak

değerlendirme yapıldığında çiçek şekli, rengi, iriliği ile bitki yüksekliği, yayılımı gibi özelliklerde büyük bir çeşitlilik hemen göze çarpmaktadır. Bu çeşitlilik içerisinde bazı tiplerin seçilerek bunlara daha fazla döl verme şansı tanınması, yani seleksiyon yapılması yararlı olabilir. Ancak yine de yıllardan beri açık tozlanan bu tür içerisindeki heterozigoti varlığını koruyacaktır. Süs bitkisi olarak bir türün ticari önem kazanmasında ise bilindiği gibi birörneklilik (yeknesaklık) önde gelen tercih nedenlerinden olmaktadır. Vegetatif çoğaltma, klon şeklinde bitki çoğaltımına olanak sağlayan bir çoğaltma şeklidir. Doku kültürü yöntemleri ise, kısa sürede az miktardaki başlangıç materyalinden çok sayıda yeni birörnek bitki elde edilmesinde çok büyük avantajlar sağlamaktadır. Belirlenecek üstün nitelikli genotiplerin hızla çoğaltılarak bunlardan geniş parseller kurmak, parsel içindeki klon bitkilerin kendi içinde döllenerek homozigoti oranının artırılması ve çeşit geliştirme için yapılacak ıslah çalışmalarında süreyi kısaltıcı önemli bir teknik olarak devreye dahil edilebilecektir. Bu aşamaların hayata geçirilebilmesi için öncelikle bitkinin *in vitro* koşullarda hızlı çoğaltım aşamasının sorunsuzca optimize edilmesi gerekmektedir.

Planlanan araştırmada, *Centauera tchihatcheffii* Fish.&Mey. tohumlarının *in vitro* koşullarda çimlenmeleri ve *in vitro* çimlenen bitkilerden hazırlanan eksplantlardan hızlı vegetatif çoğaltım yapmak amacıyla en uygun besin ortamı kompozisyonunun belirlenmesi konularında çalışmalar yapılması sayesinde mikroçoğaltımın optimize edilmesi; ayrıca kolhisin uygulamaları ile *in vitro* poliploidinin teşvik edilmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Centaurea cinsi* ve *C. tchihatcheffii* hakkında bilgiler

Ankara'nın biyolojik çeşitlik bakımından en önemli yerlerinden olan ve 22.10.1990 tarihinde 90/1117 sayılı Bakanlar Kurulu Kararıyla Gölbaşı Özel Çevre Koruma Bölgesi olarak tespit ve ilan edilen Mogan-Eymir Gölleri yakın çevresi, Ankara ilinin yaklaşık 20 km mesafesinde yer almaktadır. Gölbaşı yerleşimi yakın çevresinde bulunan Mogan-Eymir gölleri doğal konumları gereği yer üstü ve yer altından birbirleri ile bağlantılı olup, Mogan Gölü kuzey çıkışından itibaren Eymir Gölü'ne bağlantılıdır. Eymir Gölü, Mogan Gölünden ortalama 4 m. daha alt kotlarda yer alır ve kuzey çıkışından itibaren İmrahor Vadisine boşalmaktadır. Bugünkü kayıtlara göre, Ankara florası 99 familya, 495 cinse ait 1365 çiçekli bitki türüne sahiptir. Bunların da 271'i (% 19.85) endemiktir. Sadece Ankara'ya özgü olan tür sayısı ise 22'dir. Ankara'da orman, bozkır, sulak alanlar ve tuzlu topraklar gibi tür zenginliğini destekleyen farklı yaşam ortamlarına (biyomlara) rastlanmaktadır(9).

Vural (2001), Ankara'ya özgü 22 bitki türünün bulunduğundan söz etmektedir(20). Bunlar: *Achilea ketenoglui*, *Aethionema dumanii*, *Astragalus physodes* subsp. *acikirensis*, *Astragalus beypazaricus*, *Astragalus demirizii*, *Astragalus densifolius* subsp. *ayashensis*, *Astragalus kochakii*, *Astragalus trichostigma*, *Astragalus yildirimlii*, *Campanula damboltiana*, *Campanula ekimiana*, *Centaurea halophila*, *Centaurea tchihatcheffii*, *Cytisus acutangulus*, *Isatis glauca* subsp. *Galatica*, *Muscari adili*, *Salsola grandis*, *Salvia aytachii*, *Sideritis galatica*, *Silene cserei* subsp. *aeoniopsis*, *Verbascum gypsisola*, *Verbascum heterobarbatum* olarak sıralanmaktadır. Ankara'dan isim alan bazı bitki türleri ise şunlardır: *Crocus anycrensis*, *Jurinea anycrensis*, *Paracaryum ancyritanum*, *Dianthus ancyrensis*, *Verbascum ancyritanum*.

Dar yayılışlı ve tükenme tehdidiyle karşı karşıya kalan türler, yayılış alanlarının genişliği ve miktarlarına göre tehlike sınıflarına ayrılmaktadırlar(20). Bu sınıflandırma içerisinde *Centaurea tchihatcheffii* 'Çok Tehlikede (CR)' olan türler arasında yer almaktadır. *Asteraceae* (Papatyagiller) familyasının tür sayısı bakımından en büyük cinsi olan *Centaurea*, tür sayısı ve toplam takson sayısı bakımından Türkiye florasında, *Astragalus* (Geven) ve *Verbascum* (Sığır kuyruğu) gibi cinslerden sonra 3. sırada yer almaktadır(32). En büyük 3. cins konumundaki *Centaurea*'nın diğer cinsler arasındaki yeri Çizelge 1.1'de

verilmiştir. Floradaki toplam 1223 cins arasından 3. sırada yer alan *Centaurea* 'nın floranın önemli cinslerinden biri olduğu görülmektedir.

Çizelge 2.1. Türkiye florasında tür sayısı bakımından en zengin ilk 10 cins(9,32)

Sıra No	Cinsler	Tür	Alt tür	Varyete	Takson
1	<i>Astragalus</i>	410	32	40	432
2	<i>Verbascum</i>	233	5	37	377
3	<i>Centaurea</i>	179	32	28	214
4	<i>Allium</i>	161	34	7	159
5	<i>Silene</i>	136	23	9	147
6	<i>Campanula</i>	114	9	10	113
7	<i>Galium</i>	105	23	2	116
8	<i>Hieracium</i>	99	-	-	99
9	<i>Trifolium</i>	96	4	40	119
10	<i>Alyssum</i>	95	10	22	104

Seçmen vd. (1995), Akdeniz Havzasında *Centaurea* (Asteraceae) cinsinin 700'den fazla türünün bulunduğunu, bunlardan 178 adedinin Türkiye'de tespit edildiğini belirtmektedirler(33). Çiçeklerinin güzelliği, bu bitki türünün süs bitkisi olarak değerlendirilmesi fikrini öne çıkartmakta, ancak bu türlerin tıbbi kullanımı da geleneksel tıpta yer bulmaktadır. Örneğin *C. cyanus* L. %5'lik infüzyon olarak kullanıldığında ishal ve karın ağrısına iyi gelmekte, enerji artırıcı ve iştah açıcı etki yapmaktadır(34). *C. behen* L. mide ağrıları ve adet sancılarının giderilmesinde faydalı olurken; *Centaurea calcitrapa* L. ateş düşürücü olarak, *Centaurea iberica* Trev. ex Spreng ise karın ağrılarının giderilmesinde, böcek ve yılan sokmalarında tedavi edici olarak kullanılabilir(35). Başka bazı *Centaurea* türlerinin yöresel tedavi yöntemleri olarak halk arasında ishal kesici, sindirimi artırıcı şeker düşürücü, romatizmal hastalıklarda ve iltihabi hastalıklarda yardımcı olabildiği kaydedilmektedir(36-38). *C. tchihatcheffii* Fischer & C.A.'nin ekstraktından kimyasal içeriklerin belirlenmesi ve bunların antiallerjenik, iltihap engelleyici etkileri Koca vd. (2009) tarafından araştırılmıştır(38). Farmakolojik teknik modeller kullanılarak, bitkiden ekstrakte edilen yaprak ve gövde özütlerindeki etkin

maddelerin dozlarına bağılı olarak etkileri incelenmiştir. Bitkide bulunan centaureidin isimli madde sayesinde anti-inflammatory (şişme, su toplama, iltihap gelişimini engelleyici) etkinin ortaya çıktığını belirten araştırmacılar, başka *Centaurea* türlerinde de benzer bulguların literatürde bulunduğunu ifade etmişlerdir. Bitkideki seskiterpen lakton bileşiklerinin ve flavonoid bileşiklerinin de sağıaltıcı etki üzerinde rol oynamış olabileceğinden bahsetmişlerdir.

C. tchihatcheffii ile birlikte halofit, endemik ve sadece tip örneğinden bilinen diğeri *Centaurea* türlerinin yayılışını inceleyen Erik vd. (2005), yayılışların rastgele olmayıp belirli bölgelerde yoğunlaştığını bildirmektedirler(32).

Tan ve Vural (2007) tarafından *Centaurea tchihatcheffii* türü, uluslararası bilimsel yayınlarda tanımlanarak bunun endemik bir tür olduğu, botanik özellikleri, yetiştiği yerlerin coğrafik olarak tanımlanması yapılmış, kromozom sayısının $2n=20$ olduğu, step ikliminde yaşadığı, Ankara ili için sınırlı sayıdaki bir endemik tür olduğu ifade edilmiştir(39).

Martin vd. (2009), Türkiye’den toplanan sekiz adet *Centaurea* türünde(40), Gömürgen vd. (2009) endemik *Centaurea goeksuensis*’te karyotip analizleri ve kromozom sayısı belirleme üzerinde çalışmış olmakla birlikte(41); *Centaurea tchihatcheffii* türündeki ilk karyotip çalışmasını Gömürgen ve Adıgüzel (2001) gerçekleştirmiştir(42). $2n=20$ kromozom sayısında olduğu karyotipik olarak belirlenen türle ilgili sitolojik bilgiler çalışmada ayrıntılı olarak verilmiştir.

Centaurea türlerinin genel olarak renkli ve güzel motifli küçük çiçekleri bulunmakla beraber, esas olarak bu bitkilerin içsel olarak bulundukları kimyasal maddeler ilgi çekmektedir. Doğada kendiliğinden yetişen pek çok bitkide olduğu gibi *Centaurea* türlerinde de, o türleri tıbbi bitki kapsamına dahil edebilecek birçok organik madde yer almaktadır. Baytop (1984), ülkemizde bazı *Centaurea* türlerinin (*C. cyanus* L., *C. behen* L., *C. calcitrapa* L., *C. iberica* L., *C. jacea* L.) ishal kesici, kuvvet verici, iştah açıcı, göğüs yumuşatıcı ve mide rahatsızlıklarını giderici olarak tıbbi amaçla kullanıldığını ifade etmektedir(43). Ayrıca *Centaureae* cinsine ait *C. rupestris* L.’in çiçek ve yapraklarının içerdiği flavonoidlerin antifitoviral, antibakterial ve antifungal aktiviteleri olduğu bildirilmektedir(44,45). Ancak doğal olarak yetişen populasyonlardan bu flavonoidlerin

izolasyonunun çok sınırlı olduğu vurgulanmaktadır. Altıntaş vd. (2004) *Centaurea* türlerinin uçucu yağlar bakımından da oldukça zengin bir çeşitlilik gösterdiğini bildirmektedirler(46). Koca ve Özçelik (2009), devam eden araştırmalarında, türe ait bitkilerden elde edilen ekstraların *Centaurea tchihatcheffii* ekstraktı *in vitro* antiviral, antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri yönünden taranmıştır(38). *C. tchihatcheffii* ekstralarında yapılan ilk antimikrobiyal aktivite çalışması olan bu araştırmada; tüm ekstralar test edilen Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere 2 -16 fig/mL minimum konsantrasyon aralığında antibakteriyel etkili iken 32->128 jUg/mL konsantrasyon aralığında izole suşlara aktif bulunmuştur. Ekstreler, *C. albicans* ve *C. parapsilosis* funguslarına ve bazı virüslere karşı da etkili olmuştur.

Zengin vd. (2010), *Centaurea* türlerinde yağ asitlerini ve antioksidant kapasitelerini incelemiştir. İncelenen üç tür arasında en yüksek antioksidant kapasitesi *C. pulchella*'da bulunmuş, bunu *C. patula* ve *C. tchihatcheffii* izlemiştir(47).

Ülkemizde yerel adıyla peygamber çiçeği olarak bilinen bitkinin cins ismi, Hipokrat tarafından ortaya atılan ve insan başlı at biçiminde mitolojik bir yaratık olan Centaur'dan kaynaklanmaktadır. Muhtemelen bitkinin çiçek yapısı ile bu yaratık arasında kurulan bir benzerlik sonucu, bitkiye cins ismi olarak Linnaeus tarafından yaygın olarak kullanılıyorsa da sadece Mogan Gölü çevresinde yetişen bu bitkinin çiçeği, yansıma açısına göre kırmızının farklı tonlarını yansıttığı için Gölbaşı çevresinde 'yanardöner' olarak da bilinmektedir (Şekil 2.1). Bu isim çiçek rengine çok uygundur; mor, pembe renklerde de çiçekler açan bitkiye, ayrıca 'Gölbaşı peygamberçiçeği', 'gelin düğmesi', 'türbe peygamberçiçeği', 'kırmızı peygamberçiçeği', 'yanardöner' ya da 'sevgi çiçeği' de denilmektedir(48-51), Bizim çalışmamızda ise bilimsel cins isminin Türkçe okunuşu, çalışmalarımız süresince benimsenmiş, bu tezin içerisinde de 'Sentorya' olarak kullanılmıştır.

Bu tür ilk olarak 1854' te Fisch. & Mey. tarafından bilim dünyasına tanıtılmıştır. Örnek tip, ilk kez 1848' de, Rus bilim insanı Pierre de Tchihatcheff tarafından Ankara: Gölbaşı, Gölbek-Yavrucak arasından toplandığından, bu araştırmacının adına atfen, bitkiye *Centaurea tchihatcheffii* adı verilmiştir(50). Bu cins Doğu Florası'nda, *Melanoloma tchihatcheffii* (Fisch. & Mey.) Boiss. adıyla farklı bir cins olarak belirtilmektedir. Merhum botanikçi Karamanoğlu'nun 1956' da farklı bir lokaliteden (Gölbaşı - ANKARA) topladığı örnek ise,

1957' de Huber- Morath tarafından *Centaurea purpleiradiata* Hub. - Mor. olarak adlandırılmıştır. Aynı bitki, aynı bölgeden Brown ve Kotte tarafından da toplanmıştır(9).



Şekil 2.1. Yanardöner (*Centaurea tchihatcheffii*) bitkisinin görünümü

Bitkinin sistematik sınıflandırması aşağıda belirtilmiştir(50):

Alem: Plantae

Bölüm: Magnoliophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Takım: Asterales

Familya: Asteraceae

Cins: *Centaurea*

Tür: *Centaurea tchihatcheffii*

Sevgi Çiçeği (*Centaurea tchihatcheffii*), Asteraceae (papatyagiller) familyasından, dünyada yalnızca Ankara'nın Gölbaşı ilçesi Hacı Hasan Köyü yakınında yetişen bir bitki türüdür. Tarım ilaçları, yetiştiği doğal habitatların yerleşime açılması sonucu ortaya çıkan yoğun yapılaşma, yol genişletme faaliyetleri, anız yakılması, yoğun herbisit kullanımı gibi

bilinçsiz tarım uygulamaları, süs bitkisi olarak kullanılma potansiyeli dolayısıyla bilinçsizce yapılan söküm ve Ankara pazarlarında kesme çiçek olarak satılması, güvercin sürüleri tarafından tohumlarının beslenmede kullanılması gibi nedenler yüzünden nesli yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kalınca Bern Sözleşmesi kapsamında koruma altına alınmıştır(11,19,21).

Günümüzde nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya kalan ve sadece Ankara Gölbaşı ilçesinde 1 km²'lik bir alanda hayatta kalma mücadelesi veren bu tür üzerinde çeşitli araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Günümüzde gerek üniversiteler gerek sivil toplum kuruluşları ve gerekse çeşitli kamu kurum ve kuruluşları bu türü korumak ve canlılığını devam ettirmek adına çeşitli faaliyetlerde bulunmaktadırlar. *Centaurea tchihatcheffii* türü üzerinde yapılan çalışmaların ise daha çok, botanik anlamda türün ve bitkisel özelliklerinin tanımlanması ile çoğaltımı üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir.

2.2. Sentorya (Yanardöner= *C. tchihatcheffii*) Bitkisinin Tohumla Çoğaltımı

C. tchihatcheffii tohumlarının yüksek sıcaklık derecelerinde çimlenemedikleri, ön soğuk uygulaması yapılan tohumlarda, -79 ± 2 °C sıcaklıkta bekletilme durumunda tohumların çimlenme yeteneklerinin kaybolmadığı ve çimlenmenin % 10 olduğu, toplandıktan sonra belli dormansi süresini geçiren tohumlarda çimlenmenin daha yüksek belirlendiği, araziden toplandıktan sonra yaklaşık 9 ay bekletilen tohumların toprak+perlit karışımındaki çimlenmelerinin 7-10 günde tamamlandığını ve çimlenme değerinin %90'a çıktığı, 50-55 günde ise çiçeklenme fazına ulaşıldığı, dormansinin laboratuvar koşullarında (20 °C, %50-60 nem) saklanan tohumlar için yaklaşık 9 ay sürdüğü ve dormansinin tohum kabuğundan değil de embriyodan kaynaklanabileceği ifade edilmektedir. Ayrıca, tohum çimlenmesi üzerine toprak pH derecesinin de etkili olabileceği bildirilmektedir(52,53).

Okay ve Günöz (2009), türün tohumlarının klasik yöntemler kullanılarak çimlendirilmeye alındığında, temel istekler yerine getirildiği halde çimlenme oranlarının çok düşük ve bitkinin kök gelişiminin de anormal olduğunu bildirmişlerdir(54). Schütz vd. (1997)(55) ile Taiz ve Zeiger (1998)(56), türün tohumlarında derin bir primer dormansi görüldüğünü ve bu tohumların çimlenebilmek için uzun bir vernalizasyon dönemine ihtiyaç duyduklarını belirtmişlerdir. Okay ve Günöz (2009) çalışmalarında *Centaurea tchihatcheffii* tohumlarını suda (12 saat ve 24 saat) ve GA₃ çözeltisinde (10 ppm ve 100 ppm'lik çözeltilerde 24 saat)

bekletmişler ve bu uygulamaların ardından ekim yapmışlardır. GA₃ içeren çözeltilerde bekletilen tohumlarda çimlenme sürelerinin kısa ve oranlarının yüksek olduğunu saptayan araştırmacılar, pH seviyelerinin etkilerini de incelemişler ve pH seviyesinin 6.5'tan 8.5'a artmasıyla çimlenme oranında düşüş meydana geldiğini ortaya koymuşlardır(54).

2.3. Mikroçoğaltım

Doku kültürü teknikleri kullanılarak bitki üretmek, yani mikroçoğaltım birçok bitki türünde olduğu gibi tıbbi ve aromatik bitkilerin de vegetatif olarak hızlı ve çok miktarda çoğaltılabilmesine olanak sağlayan bir üretim şeklidir. Mikroçoğaltım, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre ya da polen tanesi vb.) yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesi olarak tanımlanmaktadır(57). Bitkilerin *in vitro* üretimi, kullanılan eksplantın özelliğine göre (embriyo, meristem, anter, hücre veya protoplast kültürü vb.) adlandırılır. Ancak çoğunlukla üretimde tek-boğum yöntemi, aksiller dallanma, adventif sürgün ya da tomurcukların rejenerasyonu, kallus, hücre ve protoplastlardan bitki rejenerasyonu gibi yöntemler kullanılmaktadır(58). Eğer bitkilerin uygun besin maddeleri ihtiyaçları, hormon ve kültür istekleri yeterince biliniyorsa, mikroçoğaltım tekniği kullanılarak tüm bitki türlerinin üretilmesi mümkündür(59). Mikroçoğaltım bitki yetiştiriciliği ve genetiği yönünden önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu avantajlar; hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyal elde edilmesi, kitlesel üretimde üretilen bitkilerde fenotipik ve genotipik benzerlik (homojenite) olması, alışlagelen yöntemlerden daha kısa kültür süresine ihtiyaç duyulması, zor üretilen türlerin daha kolay üretimi, seçilen belirli/üstün genotiplerin hızlı üretimi, üretimde daha az verici (donör) kullanılması gibi yararları ve somaklonal varyasyonlardan dolayı yeni çeşitlerin elde edilmesi şeklinde sıralanabilir. Ayrıca kısa sürede fazla bitkinin elde edilebilmesi de diğer bir avantajdır(57)

Başarılı bir mikroçoğaltım beş aşamada gerçekleşmektedir: 1) hazırlık aşaması, 2) kültür başlangıç aşaması, 3) sürgün çoğaltım aşaması, 4) sürgünlerin köklendirilmesi ve 5) bitkilerin dış ortam koşullarına alıştırılması(60).

1) *Hazırlık aşaması*: Esas olarak bulaşma problemlerinin en aza indirilmesi amacıyla verici (donör) bitkinin hijyenik koşullarda yetiştirilmesini kapsamaktadır. Verici (donör)

bitkinin vejetatif gelişme evresinde olması mikroçoğaltımda başarıyı etkileyen etkenlerden bir diğeridir. Kültür için sürgün gelişiminin hızlı olduğu ve aktif büyümenin bulunduğu dönemler seçilmelidir. Mikroçoğaltımın başarısı eksplantların alındığı verici (donör) bitkinin genotipi, sağlık durumu ve yetiştirme koşulları (beslenme, ışık, sıcaklık, bitki büyüme düzenleyicilerinin uygulanması, yetiştirme mevsimi) ile doğrudan ilişkilidir.

2) *Kültür başlangıç aşaması:* Eksplant seçimi ve sterilizasyonu, kültür ortamlarının seçimi ve kültürün yürütüleceği çevresel koşulların belirlendiği aşamadır. Mikroçoğaltımda çoğunlukla eksplant olarak tepe (apikal) ve koltuk altı (aksiller) tomurcuklar seçilmekle birlikte, farklı organlar da eksplant olarak kullanılmaktadır. Örneğin 2-3 mm büyüklüğündeki kök parçaları(61), sürgün ucu(62), yaprak, yaprak sapı ve çiçek sapı parçaları(63,64), rizomların terminal ve lateral uçları(65), yaprak ve gövde eksplantları(66), soğan pulları ve yaprakları(67-70) başarıyla kullanılmıştır.

Werbrouck ve Debergh (1994), eksplant seçiminde uyulması gereken bazı özelliklere dikkat çekmektedirler: -Bitkilerin toprak üstü kısımları toprak altı kısımlarından, bitki iç parçaları bitki dış parçalarından daha az kontamine edilmiştir;

- Eksplantlar gelişme mevsiminin başlangıcında aktif büyüyen sürgünlerden alındığında başarılı sonuçlar elde edilmektedir;

- Verici (donör) bitkinin yetiştirme ortamındaki ışık ve sıcaklık koşulları, beslenme durumu ve yaşı eksplantın büyüme ve gelişme başarısını etkilemektedir(71).

Araştırmacılar, sürgün büyüklüğünün de önemli olduğunu ve sürgün ucundan alınan eksplantın virüssüz olacak kadar büyük, rejenerasyon yeteneğini yitirmeyecek kadar küçük olması gerektiğini vurgulamaktadırlar. Terminal tomurcuk içeren çelikle ve bütün tomurcuk, 0.5-1 mm'lik sürgün uçlarına nazaran daha yüksek oranda kontamine olmaktadır. Küçük sürgün ucu eksplantlar düşük canlılık oranına ve başlangıçta yavaş gelişme özelliğine sahip olmakla birlikte, virüslerle kontrol edilen bazı karakterleri yok etmektedir(72).

Mikroçoğaltımda kullanılan eksplantlar aseptik koşullara konulmadan önce tam anlamıyla sterilize edilmelidir. Sterilizasyon yöntemleri verici (donör) bitkinin yetiştiği ortamın

özelliklerine ve eksplantın alındığı organa göre farklılık göstermektedir. Kullanılacak dezenfektan maddenin cinsi, konsantrasyonu ve uygulama süresi sterilizasyonun başarısını etkilemekte ve bitki türüne göre değişmektedir. Ayrıca bitki dokularının zarar görmemesine dikkat edilmelidir(58).

Her bitki türü için kullanılan besin ortamları benzer madde içermektedir. Bunlar, inorganik maddeler (makro ve mikro elementler), organik maddeler (myo-inositol, tiamin-HCl, adenin sülfat, pridoksin-HCl, nikotinik asit) bitki büyüme düzenleyicileri (sitokininler, oksinler, gibberellinler) ve şeker, agar gibi diğer maddelerdir. Fakat kültür amacına ve bitki özelliklerine bağlı olarak ortam bileşimi ve konsantrasyonlarında değişiklik olabilmektedir(73).

Murashige ve Skoog (MS) ortamı(74) birçok bitki için hem kültür başlangıcında, hem de sürgün çoğaltımında kullanılmaktadır.

Kültür odasındaki ışık, sıcaklık ve nem gibi çevresel faktörler bitki türlerinin isteğine göre değişmekle birlikte 18-28 °C arasında fakat çoğunlukla 23 °C sıcaklık, 16 saat ışık 8 saat karanlık fotoperiyot, genellikle 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sn}^{-1}$ ışık ve çoğunlukla beyaz floresan lambalar optimum koşullardır(57,71).

3) *Sürgün çoğaltım aşaması:* Genel olarak başlangıç için kullanılan ortamlar çoğaltım aşamasında da kullanılmakla birlikte, bazı durumlarda değişiklik yapılabilmektedir. Bitki dokularından organ farklılaşmasında oksin ve sitokininler önemli rol oynamaktadır. Sitokinin/oksin oranının yüksek olması sürgün oluşumunu, oksin/sitokinin oranının yüksek olması kök oluşumunu, oksin ve sitokinin aynı miktarda kullanılması ise kallus oluşumunu desteklemektedir. 6-benzil amino pürin (BAP) çok sık kullanılan ve genellikle olumlu sonuçlar veren bir sitokinidir. Genel olarak 1-2 mg/ L sitokinin çoğu sistemde yeterlidir. Yüksek düzeyler, adventif sürgün oluşumunu artırma eğilimindedir. Thidiazuron (TDZ) düşük konsantrasyonlarda (0.05-1.0 mg/L) etkili olduğu için umut veren bir sitokinidir. İndol-3-asetik asit (IAA) ortamda çok az stabil olduğundan, sentetik oksinlerden naftalen asetik asit (NAA) ve indol-3-butirik asit (IEA) tercih edilmektedir. Bunların sürgün çoğaltım aşamasında kullanılan oranları 0.1-1.0 mg/L'dir. Kallus oluşumunu artırma eğiliminde olan 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D)'in kullanımından ise kaçınılmaktadır(71).

Bitkilerin çok hızlı çoğaltılması onların totipotensi (tek hücreden yeni bir birey oluşturma) özelliğine bağlıdır. Kültüre alınan hücrelerden bitkilerin farklılaşması sürgün-kök oluşumu ya da somatik embriyogenesis ile meydana gelir. Kallustan sürgün çoğaltılması yöntemi ile bitkilerin klonlanmasında; hücrelerin stabil olmaması, poliploid ve aneuploid bitkiler meydana gelmesi ve birçok tür için uygulanmaz oluşu gibi bazı engellemeler bulunmaktadır. Ayrıca dokunun başlangıçtaki bitki rejenerasyon kapasitesi zamanla alt kültürlerde azalmakta ve sonunda yok olmaktadır.

Yaprak koltuk altı (aksiller) ya da sürgün tepelerinin (apikal) dışında herhangi bir yerde oluşan tomurcuklar adventif tomurcuk olarak adlandırılır. Kalluslardan sürgün farklılaşması da adventif tomurcuk olarak ele alınmasına rağmen, bu tomurcuklar kallus evresine gerek kalmadan doğrudan bir organ ya da organ parçasından oluşabilmektedir. Bitki türlerinin klonal üretiminde organlardan doğrudan adventif sürgün oluşumu kallus yönteminden daha iyi sonuçlar vermektedir. Doğrudan bir organ ya da organ parçasından oluşan adventif tomurcuklar (sürgünler) tek düze diploid bireyler oluşturmaktadır.

Aksiller tomurcuklar genellikle yaprak koltuklarında bulunur ve her tomurcuk bir sürgün geliştirme potansiyeline sahiptir. Mikroçoğaltımda, aksiller dallanmayla sürgün çoğaltımının artırılması uygun konsantrasyonda ve tipte sitokinin içeren (oksinli ya da oksinsiz) besin ortamlarında yapılır. *In vitro* şartlarda oluşan sürgünler taze ortamlara aktararak aksiller dallanma ile sürgün çoğaltılması sürdürülebilir.

Aksiller dallanma ile sürgün çoğaltımı, kallustan sürgün oluşumu veya doğrudan adventif sürgün oluşumuna göre başlangıçta daha yavaştır. Fakat her alt kültürde sürgün sayısı logaritmik olarak artarak bir yıl içinde astronomik rakamlara ulaşmaktadır. Bu yöntemin klonal çoğaltımda ticari olarak yaygınlaşmasının bir diğer nedeni ise sürgün ucu hücrelerinin tek düze diploid olması ve kültür koşulları altında genotipik değişikliklere çok az yatkın olmasıdır.

Aksiller dalları kullanılarak yapılan mikroçoğaltımda ana bitkiden alınan tek boğumlu gövde veya dal segmentleri sterilizasyona tabi tutulduktan sonra besin ortamında kültüre alınır. Ortamdaki büyüme düzenleyicilerinin etkisiyle, aksiller tomurcuklar bir veya birden fazla sürgün meydana getirir. Daha sonra tekli sürgünler ayrılarak taze sürgün çoğaltım ortamına aktarılır ve burada 3-4 hafta içerisinde birçok yeni sürgün elde edilir. Yeterli

sayıda sürgün elde edildikten sonra bunların bir kısmı ile çoğaltım işlemi devam ettirilirken diğer bir kısmı köklendirme ortamına aktarılır. Yeterli kök sistemi geliştikten sonra, bitkiler iyi drene olmuş saksı toprağına aktarılır ve ilk 10-15 gün boyunca yüksek nem altında tutulur(72).

4) *Köklendirme aşaması:* Tam bir bitki oluşturmak için sürgünler, sürgün oluşturma ortamından farklı bir hormonal kompozisyona sahip olan yeni bir ortama aktarılmaktadır. Sürgünler belli bir uzunluğa eriştikten sonra köklenme ortamına alınır. Türlerin çoğunda köklenmenin desteklenmesi için NAA ya da IBA (0.1-1.0 mg/l)'e gereksinim duyulur. Makro ve mikro tuzların konsantrasyonu ve uygulama zamanı bu yöntemin başarısını belirler. Yüksek şeker konsantrasyonu (% 3-4) köklenmeyi ve bitkilerin kalitesini artırır. Adventif ve aksiller sürgün gelişimi ortamlarında sitokinin varlığı köklenmeyi engellemektedir(57).

5) *Bitkilerin dış ortam koşullarına alıştırılması aşaması:* Steril koşullarda, düşük ışık yoğunluğunda, yüksek nem içeren ve tüm besin maddelerinin bulunduğu bir ortamda geliştirilen bitkilerin, daha düşük nem, daha yüksek ışık düzeyi ve steril olmayan koşullara sahip dış ortama aktarılması çok dikkat isteyen bir işlem olup, bunun aşamalı olarak yapılması gerekmektedir. *In vitro* koşullarda gelişen köklenmiş bitkicikler dikkatli bir şekilde dış koşullara aktarılmalı ve yüksek nem (% 90-100) sağlanmalıdır. Aşamalı olarak saksıların üzerine yerleştirilen cam kaplar açılarak hava sirkülasyonu sağlanmalı daha sonra seradaki özel alanlarına alınmalıdır(75).

Mikroçoğaltım aşamalarının başarıyla tamamlanması bitkiye uygun eksplant tipi, sterilizasyon yöntemleri, besin ortamı bileşimi ve hormon kombinasyonları ile kültür koşullarının belirlenmesiyle mümkün olabilmektedir.

2.4. Centaurea cinsi ile bazı tıbbi ve aromatik bitkilerde yapılan doku kültürü çalışmaları

C. tchihatcheffii türünün çoğaltmasında doku kültürü çoğaltım yöntemleri oldukça etkili olabilir. Ayrıca doku kültürü teknikleri ile yeni çeşit geliştirebilmek ve mevcut çeşitlerde genetiksel iyileştirme çalışmaları da mümkün olmaktadır. Kaybolmakta olan bazı türlerin korunmasında ve çoğaltılmaları zor olan bazı türlerin üretilmesinde çeşitli doku kültürü

yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır. Bu nedenle soyu tükenmekte ve tehdit altında olan; aynı zamanda tıbbi bitki ve süs bitkisi olarak ticari öneme sahip olma potansiyeli taşıyan *Centaurea tchihatcheffii*'nin ve diğer *Centaurea* türlerinin *in vitro* çoğaltımı ve adventif sürgün rejenerasyonu üzerinde de değişik araştırmacılarca çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Hammatt ve Evans (1985), tehdit altında bulunan *Centaurea junaniana*'da yaprak sterilizasyonu çalışmışlar ve yapraklara %20 v/v NaOCl'de 20 dakika süre ile yüzey sterilizasyonu uygulanması ve daha sonra 4 kez 5'er dakika süre ile steril bidistile saf su ile durulama sonrasında başarılı olmuşlardır(76). Araştırmacılar *Centaurea junaniana* bitkisinin yaprak, kök, hipokotil ve kotiledonlarının sürgün rejenerasyon kapasitesini araştırmışlardır. En iyi sürgün oluşumunun 5 mg/L BAP ve 0.2 mg/L NAA içeren MS ortamında gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir.

Takashi ve Daisuke (1997), *Centaurea macrocephala* bitkisinin koltuk altı meristemlerinde hızlı çoğaltım çalışmışlardır. 25 µm IBA içeren hypnex ortamında sürgünlerin %70 oranında köklendiğini bildirmişlerdir(77).

Cuenca vd. (1998), ilkbaharda çiçeklenen meristematik sürgünleri doğadan toplayarak *Centaurea paui*' de sterilizasyon çalışması yürütmüşlerdir. Araştırmada 50 mm'lik gövde eksplantları, 20 mm uzunluğunda 1-2 boğumlu parçalar halinde kesilmiş ve ortama yerleştirilmiştir(78). Araştırmacılar *in vitro* çalışmada en iyi sürgünün bitki büyüme düzenleyicilerinin olmadığı ortamda gerçekleştiğini belirlemişlerdir. En iyi köklenmenin ise 2.0 mg/L IAA ve 2.0 mg/L IBA içeren MS ortamından elde edildiği ve köklenmenin 4 hafta sonra %40 oranında olduğu saptanmıştır.

Cuenco and Marco (2000), tehdit altında olan endemik *Centaurea spachii*'nin çiçekli meristemlerinde hızlı çoğaltım yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada %15 kontaminasyon gözlenmiştir. 1 mg/l BAP içeren MS besin ortamında yüksek oranda sürgün oluşumu gözlenmiş fakat oluşan sürgünlerin boylarının uzamadığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar, iki çeşit oksin kullanımında, en iyi sonuçların 2 mg/l IAA ve 2mg/l IBA içeren MS ortamında oluştuğunu ve %60 oranında köklenme elde edildiğini bildirmişlerdir(28).

Özel (2002), *Centaurea tchihatcheffii* tohumlarının yüzey sterilizasyonunda farklı dozlarda ve sürelerde ticari çamaşır suyu kullanıldığını belirtmektedir. En iyi sonuç % 50'lik çamaşır suyu 30 dakika ve % 60'lık çamaşır suyu 10-20-30 dakikada ve % 93.33 oranında saptanmıştır. *Centaurea tchihatcheffii*'nin olgunlaşmamış embriyolarının yüzey sterilizasyonu için ise kapitulalar % 50'lik dozda ticari çamaşır suyu ile farklı sürelerde muamele edilmiştir. En iyi sonuç (% 80 bulaşık olmayan) % 50'lik çamaşır suyu 30 dakikalık uygulama süresinde sağlanmıştır. Doğadan toplanan bitkilerin yüzey sterilizasyonunda ilk 3 denemede 10 dk sabunlu su, 20 dk durulama ve 1 dk etanol ön muamelesinden sonra, sırasıyla %25-15 dk, % 35-15 dk ve %75-15 dk yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. 4. denemede ön muamelede sabunlu suda bekletme süresi 1 dakikaya düşürülmüş ve etanol kullanılmamış % 25 çamaşır suyunda 15 dk yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Diğer 8 denemede ise sabunlu su ve alkol ön muamelesi yapılmamıştır. Sterilizasyonun 2. günü, 1. gün uygulanan çamaşır suyu dozunun ve süresinin ½' si oranında ve süresinde ikinci bir sterilizasyona tabi tutulmuştur. En iyi sonuç ve en yüksek değer çift sterilizasyonla % 30 - 5 dk, % 30 - 10 dk, % 40 - 5 dk olurken; tek sterilizasyonda % 35 - 15 dk olmuştur. Hızlı çoğaltım aşamasında çift sterilizasyon % 30 – 5 dk'nın tercih edilmesi gerektiği bildirilmektedir(30). Araştırmacılar, *C. tchihatcheffii*'nin doku kültürü ile çoğaltımına uygun koşulların henüz tam anlamıyla optimize edilemediğini ifade etmektedirler. *Centaurea tchihatcheffii*'nin doğada tohumları ile çoğaldığı, ancak tohumlar klasik yöntemlerle çimlenmeye alındığında, temel istekler yerine getirildiği halde sonucun olumsuz olduğu belirlenmiştir. *Centaurea tchihatcheffii*'nin 13 gün + 4 C° de bırakılan ve karanlık inkübatörde 18 C° de bekletilen tohumlarından yalnızca 1 tanesi 150 gün sonra çimlenmiş, oluşan bitkinin kök gelişiminin de anormal olduğu gözlenmiştir. Araştırmacı, bitkinin tohumdan zor çimlendiğini ifade etmektedir(30).

Özel (2002)(30) ve Özel vd. (2006b)(79) tarafından gerçekleştirilen araştırmalarda *ex vitro* koşullarda elde edilen 8-10 cm'lik 9'arlı genç sürgünler, farklı dozlardaki (0, 500 ve 1000 ppm) IBA çözeltisi içerisinde farklı sürelerde (0, 5, 10 ve 15 dk) bekletilerek serada steril kum içeren saksılarda köklendirmeye bırakılmışlar ve köklenen bitkiler saksılara geçirilmişlerdir. 10. günden itibaren kök oluşumunun başladığı, 2. hafta sonunda ise kontrol denemesi dışındaki tüm hormon ve uygulama sürelerinde kök oluşumunun gözlendiği bildirilmektedir. En iyi kök oluşumu 500 ppm IBA ve 10 dakika uygulama süresinde elde edilmiştir.

Özel (2002) tarafından gerçekleştirilen yüksek lisans tez çalışmasının da dahil olduğu(30), Ankara Üniversitesi ve DPT tarafından desteklenen projeler kapsamında yapılan çalışmalar (Özel 2006 a ve b), *Centaurea tchihatcheffii* endemik türü üzerinde yapılan ilk *in vitro* çalışmaları içermektedir(79,80). Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar genel bir bakışla özetlenecek olursa; tohumların *in vitro* koşullarda çimlenmesi konusunda enfeksiyon nedeniyle sıkıntılar yaşanması sonucunda yeşil bitkilerden doğadan eksplant alınması veya olgunlaşmamış embriyolardan sürgün rejenerasyonu yoluyla bitki çoğaltımı yapıldığı; köklenme çalışmalarının ise *ex vitro* koşullarda serada oksin uygulamaları ile birlikte gerçekleştirildiği söylenebilir.

Tıprıdamaz vd. (2006) tarafından gerçekleştirilen araştırmada ise, *C. tchihatcheffii*'nin tohumları *in vitro* koşullarda 6 g/L veya 9 g/L agar içeren MS ortamlarında kültüre alınarak çimlenme üzerine farklı agar dozlarının etkisi incelenmiştir(31). Ayrıca *in vitro* 'da gelişen fidelerden alınan sürgün eksplantları 9 g/L agar ve 1 mg/L GA₃ + 0.25mg/L BAP kombinasyonlarını içeren MS ve 1/2 MS ortamlarında inkübe edilerek ortam kuvvetin sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. MS ortamına dikilen eksplantların %40.7'si sürgün oluşturmuş, %29.5'i sürgün oluşturmadan sadece kendi gelişmeye devam etmiştir. 1/2 MS ortamında ise eksplantların %42.3'ü sürgün oluştururken %38.4'ü kendi gelişmeye devam etmiştir. Eksplant başına elde edilen sürgün sayısı ise her iki ortam için 2.27 olarak belirlenmiştir. Oluşan sürgünlerin köklendirilmesi, dış koşullara alıştırılması, bitkinin çoğaltım katsayısı ve sürgün gelişiminin gözlenebileceği alt kültür sayısı belirleme çalışmaları ile farklı ortam kombinasyonlarında sürgün rejenerasyon çalışmalarının sürdürüldüğü belirtilmektedir. *C. tchihatcheffii*'nin doku kültürüyle çoğaltım bakımından elverişli bir tür olduğundan söz edilmektedir.

Centaurea macrocephala Pushk. ex Willd. türünün mikroçoğaltımını araştıran Hosoki and Kimura (1997) sürgün rejenerasyonu için aksillar tomurcukları bölerek 0.44 µM BA ilave edilmiş MS temel besin ortamında kültüre almıştır. Proliferasyon oranını 16 günlük kültür periyodu başına 2 olarak belirlemiştir(81). Araştırmacılar *in vitro*'da elde edilen mikroçeliklerin 25 µM IBA içeren değiştirilmiş Hyponex ortamında %70 oranında köklendiğini ve tüm bitkiciklerin kolay bir şekilde dış koşullara alıştırıldığını belirtmiştir.

Pevalek-Kozlina (1998), Hırvatistan'ın endemik türlerinden *Centaurea ragusina* L.'da hızlı çoğaltım yöntemi geliştirmiştir. Araştırmada aseptik olarak çimlendirilen tohumlardan

elde edilen sürgünler kullanılmış, en yüksek çoğaltım oranı 4 hafta içerisinde eksplant başına 4.6 sürgün ile 1.0 μM 6-benzylaminopurine ve 2.9 μM giberellik asit ilave edilmiş yarı kuvvetteki MS ortamında tespit edilmiştir. Ayrılan sürgünler ise 2.5 μM indole-3-butyric acid ilave edilmiş aynı besin ortamı üzerinde köklendirilmiştir. Köklenen bitkicikler başarılı bir şekilde transfer edilerek dış koşullara alıştırılmıştır(82).

Perica (2003), içerdiği bir flavonoid nedeniyle güçlü antifitoviral, antibakteriyal ve antifungal etkiye sahip olan ve balkan Apennine endemik türü olan *Centaurea rupestris*'te hızlı klonal çoğaltım için, aseptik olarak çimlendirilen tohumlardan elde edilen sürgünleri kullanmıştır. Araştırmada en yüksek çoğaltım oranı 4 haftalık kültür periyodunda eksplant başına 11.88 sürgün ile 1 μM 6-benzylaminopurine ve 2.9 μM giberellik asit ilave edilmiş MS besin ortamında, en iyi köklenme ise 3 μM indole-3-butyric acid ilave edilen yarı kuvvetteki MS ortamında belirlenmiştir. Araştırmada ayrıca köklenen bitkiciklerin saksı toprağına transfer edilerek dış koşullara alıştırıldığı ifade edilmiştir(29).

Kurt and Erdağ (2009), *Centaurea zeybekii* Wagenitz türünde çimlenme, fide gelişimi ve aksillar sürgün üretimi üzerine çalışmışlardır. Doğal populasyonlarından toplanan tohumları yüzey sterilizasyona tabi tutarak farklı *in vitro* çimlendirme ortamlarında kültüre almış ve çimlenme üzerine sıcaklık ile fotoperiyodun etkisini araştırmıştır. Çalışmada 6 hafta sonra vitaminler ile 1 mg/L GA₃'in ilave edildiği distile su üzerinde yüksek bir çimlenme frekansı elde edilmiştir. Çimlenme fotoperiyot tarafından etkilenmemiş, en yüksek çimlenme 24 \pm 2°C'de meydana gelmiştir. 1 mg/L BA içeren MS ortamında ise yüksek bir aksillar sürgün proliferasyonu elde edilmiştir. Köklenme 6 hafta sonra yalnızca 0.5 mg/L IBA içeren MS ve 1/2 MS besin ortamında gerçekleşmiştir. Araştırmacılar ayrıca köklenme sürecinin çok yavaş olduğunu, sürgünlerin köklenme oranının da çok düşük kaldığını (%15) vurgulamıştır(15).

Mallon vd. (2011), nesli tehlike altında olan *Centaurea ultreiae* türünde sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla yaprak ve kökleri kullanarak etkili bir yöntem geliştirmiştir. Çalışmada, yaprak ve kök eksplantları dört farklı sitokin (BA, zeatin, kinetin, 2İP) ile bunların beş farklı dozunun ilave edildiği yarı kuvvetteki MS ortamında kültüre alınmış, tüm uygulamalarda sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. En iyi sonuçlar 0.55 μM BA uygulamasından elde edilmiş olup, yaprak eksplantlarının %90'ı eksplant

başına 2.48 adet, kök eksplantlarının ise %94.3'ü eksplant başına 5.60 adet sürgün vermiştir(83).

Yuzbasioglu vd. (2012), IUCN kategorisine göre DD (veri yetersiz) olarak değerlendirilen *Centaurea arifolia* türünde yaprak eksplantlarından *in vitro* çoğaltım çalışmışlardır. Bu amaçla *in vitro* koşullarda yarı kuvvetteki MS ortamında çimlendirilen tohumlardan elde ettiği bitkilerden alınan yaprak eksplantlarını, 1 mg/L BAP + 0.1 mg/L NAA ve 2 mg/L BAP + 0.2 mg/L NAA içeren MS besin ortamında kültüre almış, kültür başlangıcından 3 hafta sonra kallus, bundan 3 hafta sonra da adventif sürgün rejenerasyonu elde etmiştir. Oluşan adventif sürgünlerin 1 mg/L IBA içeren MS ortamında köklendiğini belirtmiştir(84).

Araştırmamızın temel konusu olan *Centaurea tchatcheffi* türü dışında gerek *Asteraceae* gerekse diğer familyalara ait türlerde yapılan ve araştırmamıza ışık tutabilecek nitelikteki sürgün rejenerasyonu, *in vitro* köklendirme ve dış koşullara aktarma çalışmaları da incelenmiş, çalışmamızda bunlardan bazılarına yer verilmiştir.

Asteraceae familyasına ait bir papatya cinsi olan *Chamomilla recutita* türünde yapılan araştırmada farklı dokuların (yaprak, gövde, meristematik uç, kök, çiçek ve tohum) rejenerasyon kabiliyetleri incelenmiş, bu amaçla eksplantlar Kinetin, BAP, Kinetin + BAP veya BAP + NAA içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. 4 haftalık kültür sonrası en fazla sürgün sırasıyla tohum, meristematik uç ve yaprak sapı eksplantlarından oluşan kallus dokularından elde edilmiş, sürgünlerin köklendirilmesi ise MS ortamında gerçekleştirilmiştir(85).

Trejgell vd. (2009), Asteraceae familyasından bir bitki olan *Carlina acaulis* subsp. Simplex türünde etkili bir üretim sistemi elde etmeyi amaçlayan çalışmada başlangıç materyali olarak 10 günlük fidelerden izole edilen sürgün ucu, hipokotil, kotiledon ve kök kısımlarını kullanmıştır. Eksplantlar BA (13.3 µM), kinetin (13.9 µM), zeatin (13.7 µM) ve NAA (0.54 µM) ilave edilmiş proliferasyon ortamında kültüre alınmış, en iyi morfogenetik tepki BA ilave edilmiş kültürlerde gözlenmiştir. Maksimum proliferasyon oranı yaklaşık %94 ile sürgün ucu eksplantlarında tespit edilmiştir(86). Araştırmacılar oksin kullanmaksızın bitkiciklerin yaklaşık %94'ünün köklendiğini, oksin (NAA ya da IAA) ilavesinde ise kök sayısı ve köklenme yüzdesinde artış (%100) olduğunu fakat gelişmelerinin engellendiğini

saptamışlardır. Araştırmada kök sayısı fazla olan bitkiciklerin diğerlerine nazaran hayatta kalma şansının daha iyi olduğu, bitkilerin çiçek ve tohum oluşturduğu belirtilmiştir.

Lauzer ve Vieth (1992), Kuzey Amerika'da yetiştirilen Green Globe enginar (*Cynara scolymus*) çeşidinde hızlı çoğaltım ve vitrifikasyon üzerine çalışmışlardır. Bu amaçla *in vitro*'da tohumdan elde edilmiş sürgün uçları 0.5 mg/L NAA ve farklı konsantrasyonlarda BAP içeren, MS ortamında kültüre alınmış ve sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Araştırmacılar hızlı çoğaltım aşamasında meristematik yaprakların besin ortamına değmesinin vitrifikasyona yol açtığını, besin ortamına değmelerin engellenerek vitrifikasyonu önlediklerini vurgulamışlardır. Köklendirmede ise 1 mg/L NAA ilave edilen MS besin ortamı kullandıklarını ve 2 ay sonra % 65 oranında köklenme elde edildiğini bildirmişlerdir(87).

Cenkci vd. (2009), Fabaceae familyasının nesli tehlike altındaki bir türü olan *Thermopsis turcica*'da klonal çoğaltım için konvansiyonel ve *in vitro* üretim tekniklerini kullandığı araştırmasında, rizom çelikleri ve epikotil eksplantları ile çalışmıştır. Epikotil eksplantlarında, NAA uygulaması kallus ve adventif kok oluşumunu, 6-benziladenin (BA) uygulaması sürgün oluşumunu teşvik etmiş, en yüksek değerler 10 µM BA ve 0.5 µM NAA ilave edilen MS besin ortamından elde edilmiştir. Araştırmada en yüksek rejenerasyon oranı % 86.6, eksplant başına ortalama fide sayısı 3.05 ve ortalama fide uzunluğu 2.3 cm olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar elde edilen sürgünlerin, 0.3 µM NAA ilave edilen MS ortamında yaklaşık % 83 oranında köklendiğini belirtmiştir(88).

Genellikle tıbbi bitki olarak çiçek ekstrelerinden elde edilen kremi spor yaralanmaları sonucu ortaya çıkan morarma, ezilme ve burkulmanın tedavisinde kullanılan *Arnica montana* bitkisinin hızlı çoğaltımı üzerine çalışan araştırmacılar, MS ve B₅ besin ortamlarına 1 mg/L BAP ile 0.1 mg/L NAA ilave etmiş, 6. hafta sonunda MS besin ortamından 7.7 adet, B₅ ortamından ise 9.0 adet sürgün elde etmişlerdir. NAA içermeyen ortamlarda alt kültüre alınan örneklerde sürgün sayısının belirgin bir düşüş gösterdiği gözlenmiştir. Köklenme 0.1 mg/L NAA içeren MS ortamında gerçekleşmiş ve elde edilen bitkilerin %95'i seraya başarı ile aktarılmıştır. Kış aylarında araziye aktarılan bitkilerin ise %93 oranında canlılığını koruduğu ve izleyen yaz döneminde % 64'ünün çiçeklendiği tespit edilmiştir(89).

Hızlı çoğaltım üzerine yapılan diğer bir çalışma, içerdiği antifungal ve pestisidal bileşiklerin yanı sıra diyabetin tedavisinde de kullanılan *Polymnia sonchifolia* bitkisinde Estrella and Lazerte (1994) tarafından yapılmıştır(90). Araştırmacılar bu amaçla lateral meristemleri BAP ve IBA içeren MS besin ortamında kültüre almışlar, 10 gün sonra %90 rejenerasyon oranı ve eksplant başına 12.4 adet sürgün elde etmişlerdir.

Geslot vd. (1989), altı değişik nane türünde (*M.spicata*, *M.suaveolens*, *M.aquatica*, *M.piperita* var. *citrata*, *M.piperita* f. *rubescens* ve *M.piperita* f. *pallescens*) sürgün ucu (apex) kültürü ve mikro çelikleme yöntemini kombine ederek bir çoğaltma yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem, sürgün uçlarının kültüre alınması, *in vitro* gelişen sürgünlerin çeliklenerek yeniden IBA ve BA içeren MS ortamlarında 6'şar haftalık aralarla alt kültüre alınmasından oluşmaktadır(91).

Türker vd. (2010), *Verbena officinalis* L. tıbbi bitkisinde *in vitro* çoğaltım üzerinde çalışmıştır(92). Araştırmacılar bu bitkinin *in vitro* çoğaltımında boğumarası eksplantlarını kullanmıştır. Petiol eksplantının da yer aldığı çalışmada, boğumarası eksplantlarından adventif sürgün oluşumu çok daha etkin meydana gelmiştir. BA konsantrasyonundaki artışlar 13.31 µM dozuna kadar sürgün oluşumunu artırmış fakat bu dozdan sonra ani bir düşüş meydana gelmiştir. Eksplant başına en yüksek sürgün verimi ortalama 17.1 ile 13.20 µM BA ve 5.71 µM IAA içeren ortamlardan elde edilmiştir. Köklenmenin de başarılı bir şekilde sağlandığı çalışmada 5.71 µM IBA kullanımı halinde *in vitro* köklenmenin %100 oranında meydana geldiği rapor edilmiştir.

2.5. Poliploid Bitkilerin Özellikleri ve Elde Edilme Yöntemleri

Canlılarda temel kromozom sayısının katlarına çıkmasına, ya da bir başka deyişle kromozom sayılarının üç veya daha fazla kata yükselmesine poliploidi adı verilmektedir. Bir mutasyon şekli olan poliploidi, bitki ıslahında önemli bir yere sahiptir. Poliploid bitkilerin, diploidlere göre bazı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikler bakımından farklılıkları bulunmaktadır.

Zeven (1980), tetraploid bitkilerin genellikle yüksek protein, yağ ve karbonhidrat içerdiklerini ifade etmektedir(93). Sullivan ve ark. (1986), çavdarın (*Secale cereale* L.), çevre şartlarına dayanıklılığı ve miktarı üzerinde poliploidinin etkisini incelemişlerdir. 3'ü

diploid, 3'ü tetraploid olmak üzere 6 değişik genotip kullandıkları araştırmalarında, tetraploid formların zor çevre koşullarına daha dayanıklı olduğu ve yüksek tohum bağlama kapasitesi ile birlikte yüksek verime sahip oldukları belirlenmiştir(94).

Schwanitz (1966), *Fragaria vesca* (2n=14), *F.moschata* (2n=24) ve *F.grandiflora* (2n=56) gibi farklı kromozom sayısına sahip çilek türlerinde meyve iriliği bakımından, *Prunus cerasifera*'nın ise diploid ve tetraploid formları arasında çiçek boyutlarının ve petal sayısının artışı yönünden farklılıklar bulunduğunu kaydetmiştir(95).

Mukherjii (1986), diploid ve poliploid *Chenapodium album* üzerinde yaptığı çalışmada, poliploid formlarda bitki boyunda artış kaydedildiğini, çiçeklenme zamanının geciktiğini, yaprak ve stoma boyutlarının arttığını, polenlerin ise irileştiğini belirtmektedir(96).

Hömmö ve Valanne (1987) diploid ve triploid kavak (*Populus tremula* L.)'ta polen ve stomaların morfolojik incelemesi sonucunda, triploid kavak polenlerinin diploidlere nazaran daha iri; stomalarının da daha büyük ve birim alandaki sayılarının daha az olduğunu belirlemişlerdir(97).

Çavdar bitkisinde diploid (2n=14) ve tetraploid (2n=28) bitkilerin sitolojik, anatomik, dış morfolojik, fizyolojik ve palinolojik özellikleri ışık ve elektron mikroskoplarında karşılaştırılmal olarak incelenmiştir(98). Buna göre tetraploid *Secale cereale* L., diploidlere oranla boyları daha uzun, yaprak ene ve boyu ise daha fazla olan bitkilerdir. Yaprak gövdeleri daha kalın, tohumları ise daha iridir. Yaprak epidermis hücrelerinin ve stomalarının eni, boyu ve mezofil hücrelerinin hacimleri daha fazladır. Sancak stoma ve tüy sıklığı diploidlerden daha azdır. Tetraploidlerde mezofil hücrelerinin sitoplazmik organelleri gerek büyüklük, gerekse sayı bakımından diploidlere oranla daha zengindir. Ayrıca bunlarda kloroplast sayısı da daha fazladır. Bundan dolayı tetraploidlerin toplam klorofil, klorofil a ve klorofil b miktarları diploidlerden daha fazla bulunmuştur. Tetraploidlerin polenleri de diploidlerden daha iri olup por sayıları fazladır.

Molin vd. (1982), yonca bitkisinde poliploidinin etkisiyle yapraklarda fotosentez aktivitesinin, kloroplast sayısının, klorofil miktarının arttığını saptamışlardır(99).

Hepaksoy vd. (1987), diploid *Triticum monococcum* L., tetraploid *T.durum* Desf. cv. Gediz ve hekzaploid *T.aestivum* L. cv. Cumhuriyet gibi farklı ploidi düzeylerindeki buğday türlerinde oksin (IAA) ve absisik asit (ABA) miktarlarını kantitatif olarak incelemişler ve en yüksek IAA ve ABA içeriklerine, tetraploid *T. durum* cv. Gediz'de rastlamışlardır(100).

Poliploidler doğada kendiliğinden meydana geldiği gibi, yapay olarak da elde edilebilmektedir. Bitkilerin yapay olarak poliploidiye uğratılmalarının nedenlerinden birisi tarımsal amaçlarla verimliliği artırmaktır. Bunun için daha çok vegetatif organlarından faydalanılan bitkiler kullanılmaktadır. Çünkü poliploid bitkilerin yaprak, gövde, çiçek, meyve ve tohum gibi organları, diploid formlarından daha iri olmaktadır. Ekmek yapımında tohumlarından, hayvan beslenmesinde de vejetatif organlarından faydalanılan çavdar, poliploid yapılarak daha verimli hale getirilmiştir.(98)

Doğada oluşan türler arası melezlerin F1 döllerini, genellikle kısır olabilmektedir. Bunun nedeni, ebeveynler arasında kromozom sayısı bakımından önemli farkların olması ve F1 döllerinde mayoz bölünme ve gamet oluşumu sırasında tam bir eşleşme olmamasıdır. Kısır, verimsiz F1 bitkilerini yapay olarak poliploidiye uğratmak yoluyla verimli duruma getirmek olasıdır(101). Poliploidlerde karşılaşılan en güç sorun, sterilitedir. Poliploid bitkilerde kısırlık mayoz bölünme sırasında univalentlerin oluşumu ve gametlerin arızalı şekilde dağılmasıyla ortaya çıkmaktadır. Univalent oluşumu, aneuploid gametlerin meydana gelmesine neden olmaktadır. Bu durum esas alınarak yapılmış bir araştırmada *Festuca arundinacea* (Kamışsı yumak) ile *Lolium perenne* (Çok yıllık çim veya İngiliz çimi) türler arası hibritinin kısır bitkilerinden verimli poliploidlerin elde edilmesi amaçlanmıştır, ancak bunun istenen düzeylerde elde edilmesinde kısıtlamalar ortaya çıkmıştır (102).

Poliploid hale getirilmiş bitkilerin ekstrem çevre koşullarına daha iyi uyum sağladıkları(103) ve dolayısıyla stres koşullarına dayanıklılıkta bu tip bitkilerden yararlanılabileceği bildirilmektedir(104).

Poliploid bitkilerin meydana gelmesinde esas olarak iki yol bulunmaktadır(98):

1. Üreme hücrelerinde mayoz sırasında, kromozom sayısının yarıya inmesini önleyerek, somatik hücrelerdeki kadar kromozom sayısına sahip gametlerin

meydana gelmesini sağlamaktır. Bu olay, kromozomların ikiye ayrılarak kutuplara gitmesi safhasında, iğ iplikçiklerinin oluşmasını engelleyerek hücre duvarının oluşmamasını sağlamak ve sonuçta kromozomların aynı hücrede kalarak, sayılarını iki katına çıkarması ile mümkün olmaktadır.

2. Zigotun ilk bölünmeleri esnasında hücre duvarının oluşumuna engel olmak yoluyla, kromozomların aynı hücrede kalmasını sağlayarak kromozom sayısının iki katına yükseltilmesi ile de poliploid bitki elde etmek mümkün olabilmektedir. Bu yolla poliploidi yapmak için, yine iğ iplikçiklerinin oluşumunun engellenmesi gerekmektedir.

Kromozom katlanması bazı bitki türlerinde kendiliğinden meydana gelmekle birlikte, pratikte çoğunlukla kimyasal madde uygulamalarıyla gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla azot protoksit, kafein, kloral hidrat, asenaften, sulfinilamid, etil merkuriklorid, heksaklorosikloheksan ya da kolhisin gibi antimitotik özellik gösteren kimyasallardan yararlanılmaktadır. Yine bu amaçla 2,4 D ve NAA gibi hormonlar ve trifluralin ve orizalin gibi bazı herbisitler de kullanılabilir. Günümüzde kromozom katlaması için bitki ıslahçıları tarafından en yaygın kullanılan kimyasal madde, kolhisindir. Bu madde *Liliaceae* familyasına ait *Colchicum autumnale* L. (güz çiğdemi) bitkisinin köklerinden elde edilen, alkaloid yapısında kuvvetli bir zehir olup; alkol, kloroform ve soğuk suda eriyen, buna karşılık sıcak suda ve eterde erimeyen bir maddedir. Kimyasal formülü $C_{22}H_{25}O_6$ olarak gösterilen 'kolhisin', değişik kaynaklarda 'kolkisin', 'kolşisin' veya 'kolçisin' olarak da ifade edilebilmektedir. Kolhisin, uygulandığı dokuların hücrelerinde mitoz bölünmenin metafaz safhasında iğ ipliklerinin oluşumunu engeller ve dolayısı ile replikasyona uğramış kromozomların kutuplara çekilmesini önleyerek, kromozom sayısının iki katına çıkmasını sağlar. *In vitro* tekniklerle elde edilmiş haploid bitkilerin kromozom sayısının katlanması yani dihaploidizasyon için değişik bitki türlerinde farklı yöntemler uygulanmıştır. Bunlar;

- Mısır ve güzelaavrat otunda olduğu gibi kallus dokusu veya hücre süspansiyonuna kimyasal madde uygulamaları,

- Kuşkonmaz, gerbera ve buğday'da olduğu gibi kolhisinin kültür ortamına katılması,

- Buğday, arpa ve çim türlerinde olduğu gibi haploid bitkilerin köklerine kolhisin uygulaması,

- Şeker pancarı, pamuk, patlıcan ve biber’de olduğu gibi haploid bitkilerin aksiller tomurcuklarına kolhisin uygulaması,

- Kavun, karpuz ve hıyar’da olduğu gibi *in vitro* bitkiciklerin veya bunların çeliklerinin belli bir süre kolhisin çözeltisi içinde bekletilmesi,

-Kavunda olduğu gibi tepe tomurcuklarının kolhisin çözeltisi içerisine *in vivo* koşullarda bandırılması şeklinde olabilmektedir. Bu uygulama biçimlerinin tümü, katlanmış haploidlerin elde edilmesinde kullanılabileceği gibi, diploid bitkilerden yeni poliploidlerin elde edilmesi amacıyla da kullanılabilir.

Demir (1975) ise kolhisinin uygulama biçimini şu şekilde anlatmaktadır: “Kolhisin eriyiği ile tohumlar doğrudan doğruya muamele edilebileceği gibi gelişmekte olan bitkilerin tomurcukları üzerine de konabilir. Eriyiğin etkisini artırmak için Aerosil adındaki çok ince beyaz bir tozla eriyik hafif bir bulamaç hale getirilir. Pipetle bu bulamaç bitkilerin vejetasyon noktalarına konur. Kurumayı önlemek için arasıra üzerine su püskürtülür. Bazı bitkilerin vejetasyon konilerine dışarıdan doğrudan ulaşamaz. Bu gibi hallerde, Mayıs çiçeğinde olduğu gibi, enjektörle kolhisin eriyiği vejetasyon noktasına ulaştırılır.” Ayrıca dikkat çekilen bir konu, kolhisin uygulanmayan diğer tomurcukların mutlaka köreltilmesi gerektiğidir. İlk başlarda uygulama ile kromozom sayısı katlanmış sürgünlerin yavaş geliştiği ve bu nedenle tetraploid gül sürgünlerinde olduğu gibi bunların gelişmelerini sağlamak için diğer tüm tomurcuk ve sürgünlerin defalarca temizlenmesi gerektiğidir(105).

Şehirali ve Yazgan (1986) da kolhisinin poliploid bitki elde etmek amacıyla kullanılmasını açıklamışlardır. Bu maddenin tohum, kök ve sürgünlere uygulanabileceğinden bahseden yazarlar, uygulanacak bitki organına, bitki türüne göre uygulama süresi ve dozunun farklı olması gerektiğini açıklamakta ve örnekler vermektedirler(106).

Kimyasal madde uygulamalarının yanı sıra, ekstrem sıcaklık kullanmak suretiyle yani sıcaklık şoklarından da yararlanılabilmektedir. Bunların uygulanmasıyla bölünmekte olan hücrelerin arasında hücre zarı oluşumu engellenmekte ve böylece kromozom sayısı

katlanmaktadır. Ancak bu yöntemde başarı %3-5 gibi çok düşük oranlarda kalmaktadır. Poliploid oluşturmada kullanılan çok eski ve güvenilir olmayan bir başka yöntem de rejenerasyon yöntemidir. Yaralanan dokularda oluşan kallus tabakasından çıkan tomurcukların bazen poliploid oldukları gözlenmiştir. Bitkilerde büyüme uçları yapay olarak zedelenmekte ve bunlarda yeni sürgünlerin gelişmesi sırasında poliploid yakalamaya gayret edilmektedir(106). Kimyasal madde uygulamalarının dışındakiler, başarı frekanslarının çok düşük olması ve tesadüflerin beklenmesi nedeniyle pratik görünmemektedir. Kimyasal uygulamaları da çoğunlukla *in vivo* koşullarda açık arazi veya sera koşullarında yapılmakta, tekrarlamaları gerektirmektedir.

Doku kültürü ortamında yani *in vitro* koşullarda poliploid bitkilerin elde edilmesi yeni yeni uygulanmaya başlanmış ve bazı bitkilerde olumlu sonuçları alınmış bir uygulamadır. Griesbach (1990), *Anigozanthos* adında (kangaroo paw) soğanlı süs bitkisinin 11 farklı türünün kendi aralarında rahatlıkla döllenerek hibrit oluşturduklarını, ancak bundan sonra döllerin verimli olmadığını, kısırılık sorunuyla karşılaştığını bildirmekte; buna çözüm olarak verimli poliploid bitkilerin elde edilmesi yoluna gidildiğini açıklamaktadır. Araştırmacı, kısır hibrit bitkilerden aldığı aksillar vegetatif tomurcukları, önce kendi geliştirdiği bir yetiştirme ortamında kültüre alarak sürgün gelişmesini sağlamış, daha sonra bu sürgünleri bir hafta süreyle %0.1 oranında kolhisin içeren besin ortamında bekletmiş ve nihayet sürgünleri yeniden kolhisin içermeyen taze yetiştirme ortamlarına alarak buradan poliploid sürgünlerin gelişmesini sağlamıştır. Bu çalışma sonucunda, verimli tetraploid *Anigozanthos* bitkileri elde edilmiş, tetraploid bitkilerin daha iri yapılı, çiçeklerinin de daha büyük ve gösterişli oldukları fotoğraflanarak gösterilmiştir(107).

Poliploid bitkilerin özellikle süs bitkileri ıslahında özel bir yerinin olduğu görülmektedir. Poliploidinin tipik özelliklerinden olan koyu yeşil renklilik ve iri, gösterişli çiçekler süs bitkileri alanında önem taşımaktadır. Bu nedenle poliploid bitki elde etme çalışmalarının son yıllarda *in vitro* koşullarda süs bitkilerinde yoğunlaştığı dikkat çekmektedir. Rose ve Tobutt (2000), odunsu süs bitkilerinde tetraploid bitki elde etme yolları ve bunların avantajlarından bahsetmektedir. Tetraploid bitki elde etmenin üç ana amacı olduğunu belirten araştırmacılar bunları şöyle sıralamışlardır: Ploidi seviyeleri eşit olmadığından aralarında melezleme yapılamayan farklı grupların ploidi seviyelerini eşitlemek; kısırılık sorunu olan türler arası melez (hibrit) bitkilerin verimli hale getirilmesini sağlamak ve organ büyüklüğü ya da bitki habitüsü bakımından değişiklikler elde etmek(108). Bu

araştırmada, üç değişik cinste boğum eksplantları *in vitro* koşullarda kolhisin uygulamalarına tabi tutulmuş ve gelişen sürgünlerde flow sitometri yöntemiyle tetraploid olanların belirlenmesine çalışılmıştır. *Syringae vulgaris*, *Buddelia globosa* ve *Sorbus aucuparia* bitkilerinde *in vitro* kolhisin uygulamalarının çok kısa sürede tetraploid bitki elde edilmesinde başarıyla kullanılabil-diği ve diğer türlerde de yöntemin uygulamaya geçirilmesine başlandığı rapor edilmiştir.

Vainöla ve Repo (2000) adlı araştırmacılar da *Rhododendron* çeşitlerinde *in vitro* koşullarda poliploid bitki elde etmeyi ve bunların soğuğa karşı dayanıklılıklarını belirleme konusunda bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Kromozom katlamalarının çoğunlukla daha büyük çiçekler, daha yoğun renkler, daha kuvvetli bir bitki gelişmesi ve daha uzun bir çiçeklenme periyodu ile sonuçlandığını belirten araştırmacılar, iki adet diploid *Rhododendron* çeşidi ve bunlardan geliştirilen autotetraploidlerin soğuk koşullara dayanıklılığını incelemeyi amaçlamışlardır. *In vitro* koşullarda ikişer dozu kullanılan kolhisin ve orizalin, 24 veya 48 saat süreyle bitkilere uygulanmıştır. Orizalin, poliploidi oluşturma konusunda kolhisinden çok daha etkin bulunmuştur. Çok fazla sayıda miksploid bitki elde edilmiş, en yüksek oranda saf tetraploid bitki, 24 saat %0.005 orizalin uygulanan költürlerden elde edilmiştir. Donma deneyleri yapıldıktan sonra poliploidinin soğuğa dayanımda çok başarılı bir yol olmadığı, ancak yine önceki gibi değişik morfolojik karakterler yönüyle değerlendirilmesi gereken bir yöntem olduğu kanısına varılmıştır(109).

Tepe vd. (2002) tarafından yapılan çalışmada, nane bitkisinde *in vitro* kolhisin uygulamaları ile poliploid bitkilerin elde edilmesi amaçlanmıştır. *Mentha longifolia* türüne ait açık arazide yetişen nane bitkilerinden alınan tek boğum eksplantları aseptik koşullarda, 30 g/l sukroz, 6 g/l agar, 0.5 mg/l BA içeren MS besin ortamlarında költüre alınmıştır. Bir ay sonra, gelişen *in vitro* sürgünlerden tek boğum eksplantları ve sürgün uçları hazırlanarak 100 veya 150 mg/l kolhisin içeren besin ortamlarında 5, 7 ve 10 gün süreyle yetiştirilmiş, bu uygulamanın ardından kolhisin içermeyen taze besin ortamlarına aktarılmışlardır. İki ay süreyle gelişen bitkiler serada dış koşullara alıştırılmış, kök uçlarında kromozom sayımları yapılarak poliploidi oluşum oranları belirlenmiştir. Kolhisin uygulamalarında hem sürgün ucu, hem de tek boğum eksplantının kullanılabil-eceği, eksplantların 5 gün 100 mg/l kolhisin uygulamasının ardından kolhisin içermeyen ortamlara aktarılması halinde %25-27 oranında poliploid bitkiler elde edilebileceği ortaya konmuştur. Kolhisin uygulamaları sonucunda değişik ploidi düzeyleri kaydedilmiştir. Bazı

bitkilerin ise miksploid yapıda oldukları belirlenmiştir. Uygulama süresinin 10 güne çıkarılması hem gelişme oranını, hem de dikilen eksplant başına elde edilen poliploid bitki oranını düşürmüştür. Ayrıca yaprak morfolojileri de incelenerek stoma sayısı ile kromozom sayısı arasında bir ilişki kurulabileceği saptanmıştır(110).

Zhang vd. (2008), *Phlox subulata* L. türünde tetraploid bitkiler elde edebilmek amacıyla in vitro kolhisin uygulamaları yapmıştır. Sürgün uçları, %0.005, 0.01, 0.02 ve 0.04 kolhisin ilave edilmiş MS besin ortamlarında değişik sürelerle inkübe edilmiştir. 4.54 µM TDZ ve 0.49 µM IBA içeren ortamlarda kolhisinli uygulamalarda bekletme süresi 10, 20 veya 30 gün olarak seçilmiştir. Canlı kalan sürgün sayısının üzerinde kolhisin dozu ve uygulama süresinin etkisi belirgin olmuştur. Yüksek doz ve uzun süre uygulanan kolhisin, canlılık oranının azalmasına neden olmuştur. Tetraploid bitkiler tüm uygulamalardan elde edilmiş olmakla birlikte bunların oranı %25'ten %75'e kadar farklılık göstermiştir. En etkili uygulama olarak %0.005 kolhisin içeren ortamlarda 20 gün bekletme olarak belirlenmiş, bu ortamlarda %30 yaşama oranı ve 6 adet tetraploid bitki/10 adet sürgün ucu eksplantı oranı elde edilmiştir. Bitkiler serada başarıyla yetiştirilmiştir. Diploid bitkilerin çiçek çapı 2.24 cm iken, tetraploid bitkilerde çiçek çapı 2.91 cm olarak ölçülmüştür(111).

In vitro kolhisin uygulamaları ile birçok bitki türünde poliploid bitki elde edilmesi konusunda yayın bulunmaktadır(112-119).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırma, 2011-2013 yılları arasında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ait doku kültürü laboratuvarı ile iklimlendirme odası koşullarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

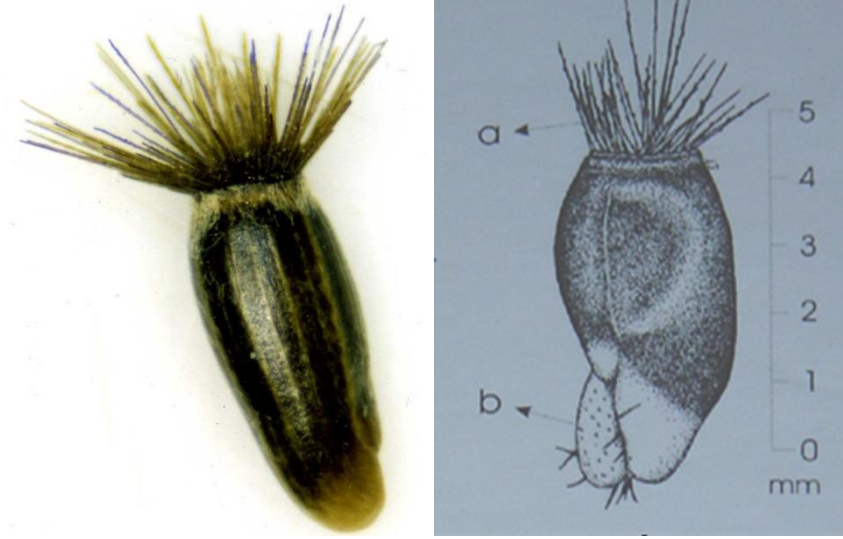
Araştırmada bitkisel materyal olarak, Ankara- Gölbaşı'nda türün doğal yayılım alanlarından biri olan(49) T.C. Kültür Bakanlığı Devlet Opera ve Balesi Genel Müdürlüğü arazisinde yer alan *Centaurea tchihatcheffii* populasyonları ile yine Ankara -Gölbaşı'ndan toplanan tohumlar kullanılmıştır. 2010 yılı Haziran ayı içerisinde doğal populasyondan toplanan (Şekil 3.1) *Centaurea tchihatcheffii* bitkisine ait tohumlar (Şekil 3.2) oda sıcaklığında, gazete kağıtları üzerinde bir hafta süreyle serilerek kurutulmuş, benzer morfolojik özelliklere ve büyüklüğe sahip olanlar sayılarak uygulamalar için gereken tohumlar ayrılmıştır(9). Tohumlar ekim zamanına kadar oda sıcaklığında tohum saklama kaplarında muhafaza edilmiştir. Bitkiye ait tohumların görünüşü ve kısımlarının şematik gösterimi ise Şekil 3.3'te olduğu gibidir.



Şekil 3.1.Gölbaşı'nda tohum toplanan sentorya arazisinden genel bir görünüş



Şekil 3.2. Tohum toplama aşamasında arazide yan yana bulunan bir sentorya çiçeği ve içerisinde tohumların olgunlaştığı olgun bir sentorya meyvesi



Şekil 3.3. *Centaurea tchihatcheffii*'nin aken tipi meyvesi (solda), Aken tipi meyve a. Pappus, b. Hilum(32) (sağda).

3.2. Yöntem

3.2.1. Genel doku kültürü şartları

Doku kültürü uygulamalarının tümü aseptik koşullar altında yapılmış, bunun için steril kabin kullanılmıştır. Kullanılan bistüri bıçağı ve pensler önceden steril edilmiş ve dikim işlemi sırasında da %96'lık etil alkole batırılıp alevden geçirilerek steril koşulların devamı sağlanmıştır. Besin ortamı olarak esas olarak MS(74) temel ortam bileşimi kullanılmıştır. Tohum çimlendirme aşamasında 15 ml besin ortamı doldurulmuş cam deney tüpleri ve diğer kültür aşamalarında da 40 ml besin ortamı doldurulmuş 6.5x7.5 cm boyutlarındaki cam kavanozlardan faydalanılmıştır. MS ortam reçetesine göre mineral tuzların ve vitaminlerin cins ve dozları Çizelge 3.1'de olduğu gibidir. Çimlendirme ortamı olarak kullanılan MS(74) önceden otoklavda steril edilen 15x2cm'lik tüplere, laminar akışlı kabin içerisinde 15'şer ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Ortamın otoklavda sterilizasyonu, 1.2 atmosfer basınç altında, 121°C sıcaklıkta 20 dakika sürede yapılmıştır. Denemelerde kullanılan cam ve metal malzemelerin sterilizasyonu için 1.2 atmosfer basınç, 121°C sıcaklıkta 90 dakika süre kullanılmıştır. Ortama karbon kaynağı olarak 30g/l sakaroz, katılaştırmak için 6g/l agar ilave edilmiştir. Besin ortamının pH'ı 5.7'ye ayarlanmıştır. Denemenin değişik aşamalarında besin ortamlarına büyüme düzenleyici madde katkıları yapılmıştır.

Çizelge 3.1. MS temel besin ortamında bulunan besin maddeleri ve konsantrasyonları(74)

Makro elementler	(mg/l)
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
Mikro elementler	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Vitaminler ve aminoasitler	
Myo-inositol	100
Tiamin	0.100
Nikotinik asit	0.5
Piridoksin HCl	0.5
Fe-şelat	
Na ₂ EDTA	37.30
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85

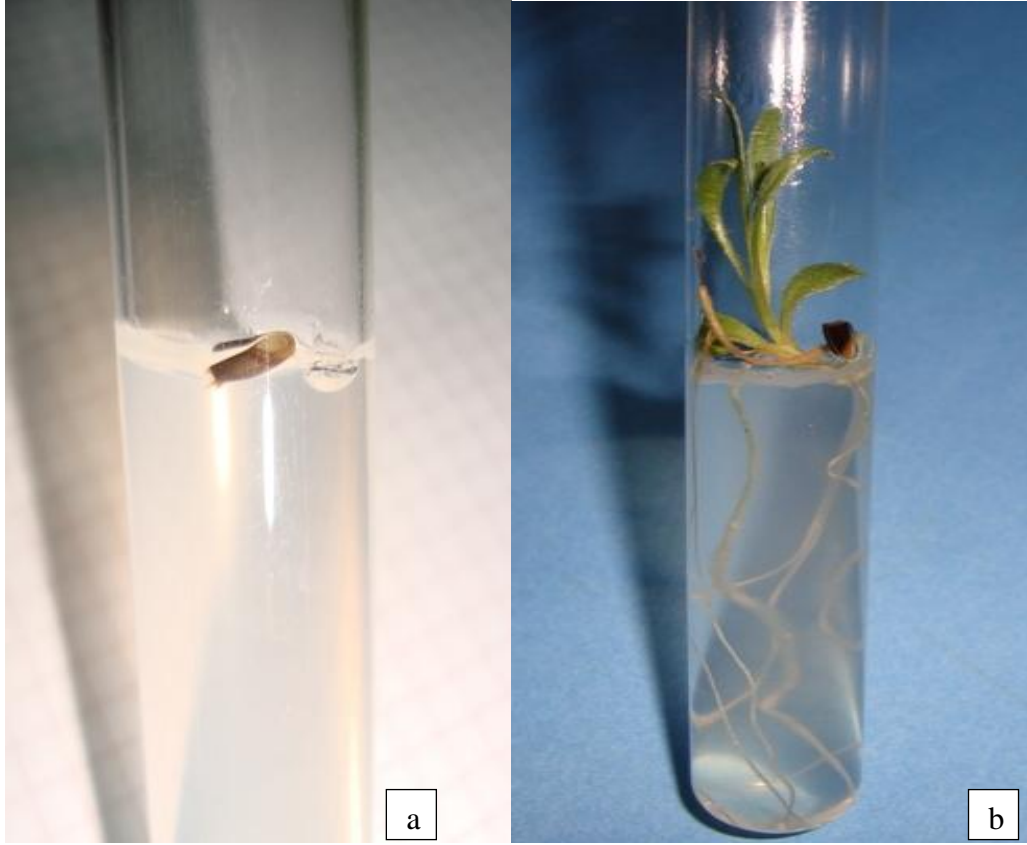
3.2.2. Tohumların yüzeysel sterilizasyonu ve çimlendirilmesi

Sentorya tohumlarının yüzeysel sterilizasyonu, Babaoğlu vd. (2001)'nin(58) önerdiği yöntem ve aşamalarına dikkat edilerek gerçekleştirilmiştir. Buna göre tohumlar, birkaç damla Tween-20 ilave edilmiş %15'lik ticari sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) içinde 25 dakika çalkalanarak dezenfekte edilmiş, bunun ardından, 3 defa 5'er dakika steril saf su ile durulama işlemine tabi tutulmuştur. Sterilizasyon işleminin yapıldığı cam kavanozdaki son durulama suyu süzildükten sonra tohumlar steril kurutma kağıdı üzerine alınarak fazla suları kurutma kağıdına emdirilmiş ve tohumlar, besin ortamlarında çimlendirmeye alınmışlardır. Tüm bu işlemler, sonraki aşamalardaki tüm aktarım, alt kültür ve yeni dikim işlemlerinde olduğu gibi laminar akışlı kabinde aseptik koşullarda yapılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Sentorya bitkisinin tohum ekiminden başlayarak tüm doku kültürü aşamalarında yapılan çalışmalarda kullanılan aseptik koşullarda çalışmaların yapıldığı laminar akışlı kabinde çalışma anından bir görünüm

Cam tüpler içerisine birer adet tohum ekilmiştir. $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve sürekli karanlık koşullarda çimlendirilen fideler, kökçük uzunluğu yaklaşık 5 mm olduğu zaman 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmış fotoperiyodik düzene ve 2000 lux floresan ışığına sahip iklim odasına aktarılmışlardır. Şekil 3.5 a ve b’de besin ortamına dikimi tamamlanmış bir sentorya tohumu ve çimlenmenin tamamlanmasından sonra oluşan *in vitro* fidecik gösterilmiştir. Tohumlarda çimlenme oranı yüzde “%” olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.5. Besin ortamına ekimi tamamlanmış bir sentorya tohumu ve çimlenmenin tamamlanmasından sonra oluşan *in vitro* fidecik. a. *In vitro* koşullarda ekilmiş bir sentorya tohumu, b. *In vitro* koşullarda çimlenerek gelişmiş bir sentorya bitkisi

3.2.3. Tohum çimlendirme denemeleri

Tohum çimlendirme amacıyla farklı tarihlerde (27.01.2011, 17.04.2011, 08.11.2011, 11.12. 2011 ve 17.03.2012) beş adet deneme kurulmuştur. Bunlardan ilk iki tarihte yapılan ekimler, hormonsuz MS ortamı üzerine gerçekleştirilmiştir. 3. ekim tarihindeki ortamların bir kısmına 1 mg/L dozunda GA₃ ilave edilmiştir. 4. ve 5. ekimlerde ise tekrarlamalı olarak üç farklı GA₃ dozunun çimlenme üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu dozlar 1, 2 ve 3 mg/L olarak kullanılmıştır. Enfeksiyon oranını azaltmak amacıyla tohumların pappusları kesilmiş ve her tüpe bir adet tohum olacak şekilde ekilmiştir. Denemelerde ekimi yapılan tohum sayısı sırasıyla 305, 273, 464, 268 ve 376 adettir. Kültürler 23±2 °C sıcaklıkta ve karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Tohum ekiminden itibaren iki hafta aralıklarla (2, 4, 6 ve 8. hafta) çimlenme sayımları yapılmıştır. 8. haftanın sonunda çimlenmeyen kültürlerde denemeye son verilmiştir.

3.2.4. Proliferasyon aşaması için eksplantların dikimi

Aseptik koşullarda çimlendirilen tohumlardan gelişen sentorya fideleri, dört haftalık inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Proliferasyon aşamasında kullanılacak eksplantların hazırlandığı, *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş sentorya fideleri

Bu amaçla, daha önceki çalışmalarımızda otsu bir bitki olan ve gelişmeleri bakımından benzerlik gösteren nane (*Mentha* sp.) türünde kullanılan tek boğum (single node) eksplantları(120) ve kekik (*Origanum* sp.) türünde olumlu sonuçlar veren sürgün ucu (shoot tip) eksplantları (Özkum 2006) kullanılmıştır. Tek boğum eksplantlarının hazırlanması için öncelikle fideciklerde kökboğazından kesim yapılarak kökler uzaklaştırılmış, gövde bölgesi üzerinde yaklaşık 15-20 mm'lik parçalar kesilmiş ve her birinin üzerinde bir adet boğum bulunmasına dikkat edilmiştir. Sürgünlerin en uç kısmında yaklaşık 15 mm'lik genç kısım bırakılıp daha yaşlı olan yaprak ve dokular uzaklaştırılarak sürgün ucu eksplantları hazırlanmıştır. Hazırlanan eksplantlar besin ortamlarına dikilmiştir. Tek boğum eksplantları besin ortamına yatay olarak yerleştirilmiş(120), sürgün uçları ise dikey biçimde yerleştirilmişlerdir (Şekil 3.7). Ancak daha sonra sürgün çoğaltımı aşamasına aktarılan tüm sürgün ucu veya tek boğum eksplantları besin ortamına dikey pozisyonda yerleştirilmiştir. Eksplantların cam kavanozlardaki besin ortamlarına

dikilmesinden sonra tüm kültürler, 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ve 25 °C ±1 sıcaklık düzenine ayarlanan ve 2000 lux şiddetinde aydınlatılan iklim odasında gelişmeye bırakılmışlardır.



Şekil 3.7. Besin ortamlarına yerleştirilmiş sentorya eksplantları. Üstte solda: yatay yerleştirilen tek boğum eksplantları, Üstte sağda: dikey yerleştirilen sürgün ucu eksplantları, Alttta: Cam kavanozlardaki proliferasyon ortamlarına dikimleri tamamlanmış sürgün uçları ve tek boğum eksplantları

3.2.5. Proliferasyon (Sürgün Çoğaltma) denemeleri

IBA + BAP kombinasyonları: İklim odasında üç hafta süreyle inkübe edilen kültürlerde gelişen sürgünlerden üç haftanın sonunda yeniden tek boğum eksplantları hazırlanarak alt kültürlerle alınmıştır. Tüm besin ortamı bileşimlerinden gelen sürgünler, iki hafta süreyle

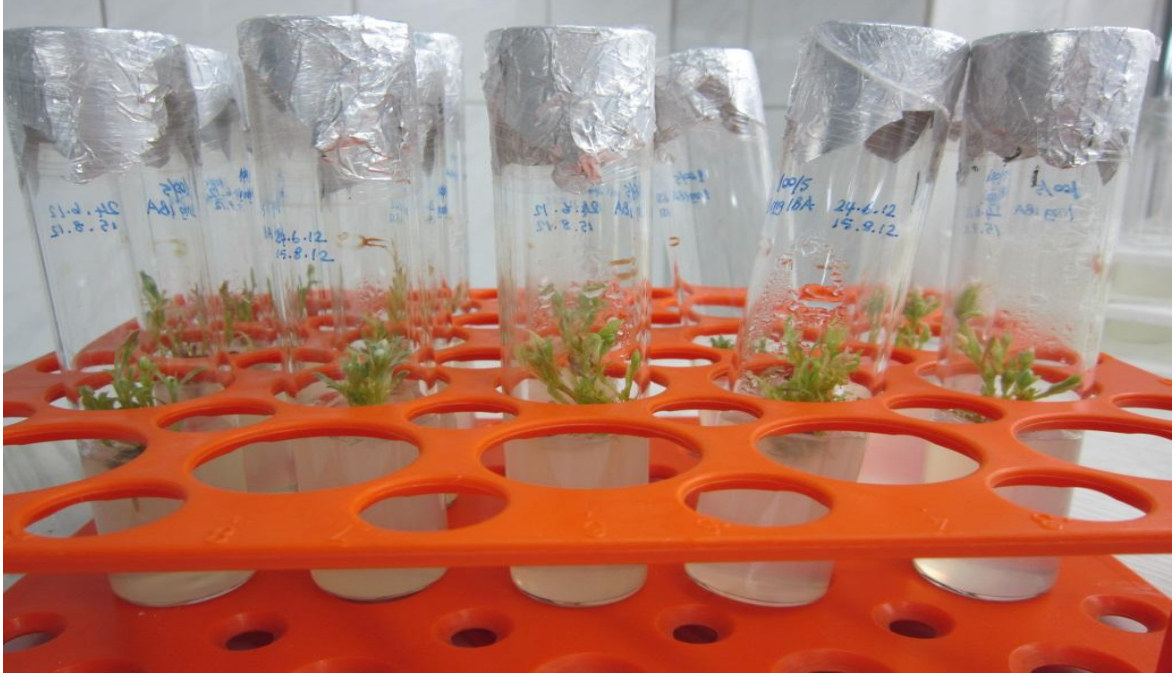
öncelikle hormonsuz MS ortamında yetiştirilmiş, ardından dört farklı büyüme düzenleyici kombinasyonu içeren MS ortamlarına aktarılmışlardır. Bu ortamlardaki büyüme düzenleyici içerikleri şöyledir: 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP; 0.5 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP; 1.0 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP; 1.0 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP. Tek boğum eksplantları ilk 6 hafta süreyle bu ortamlar üzerinde bırakılmış ve oluşan sürgün sayıları belirlenmiştir.

IBA + BAP + GA₃ kombinasyonları: Çimlendirilen tohumlardan gelişen bitkilerden hazırlanan tek boğum eksplantları, denemenin ikinci aşamasında BAP'nin tek başına, GA₃ ile birlikte veya hem IBA hem de GA₃ ile birlikte kullanıldığı kombinasyonlarda denenmiştir. Kullanılan kombinasyonlar şu şekildedir: 1 mg/L BAP; 1 mg/L BAP + 1 mg/L GA₃; 1 mg/L BAP + 3 mg/L GA₃; 3 mg/L BAP + 1 mg/L GA₃; 3 mg/L BAP + 3 mg/L GA₃. Tek boğum eksplantları dörder hafta süreyle bu ortamlar üzerinde bırakılmış ve oluşan sürgün sayıları belirlenmiştir.

Mikroçoğaltım aşamasında, her bir ortamda gelişen sürgünler, çoğaltım katsayısını belirlemek amacıyla aynı bileşimdeki ortamlara dörder haftalık aralıklarla üç kez daha aktarılmış (alt kültüre alınmış) ve her bir alt kültür aşamasında oluşan sürgün sayıları belirlenmiştir.

3.2.6. Sürgünlerin köklendirilmesi

Aksillar sürgünler birbirinden ayrıldıktan sonra hormonsuz veya içerisine 0.1 mg/L IBA ya da 1.0 mg/L IBA katılmış MS ortamlarında köklendirme aşamasına alınmıştır. Köklendirme aşaması 2. alt kültürden ve 3. alt kültürden çıkan sürgünlerle gerçekleştirilmiştir. Herhangi bir ortamdaki sürgünler üç eşit sayıya bölünerek her üç köklendirme ortamına eşit sayıda dağıtılmıştır. Hem 2. Alt kültürden hem de üçüncü alt kültürden toplamda değişik proliferasyon ortamlarından gelen 20'şer sürgün üç farklı köklendirme ortamında köklendirme aşamasına alınmıştır. Şekil 3.8'de köklendirme aşamasından bir görüntüye yer verilmiştir. Dört hafta sonunda köklenme durumları incelenmiş ve % olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.8. Köklendirme aşamasındaki sentorya sürgünlerine ait bir görünüm

3.2.7. Bitkilerin dış koşullara alıştırılması

Hormonsuz veya IBA'lı ortamlarda köklenen sürgünler tam bir bitkiye dönüştükten sonra, köklerindeki agarlı besin ortamı yıkanıp temizlenmiş ve dış koşullara alıştırılmak üzere iklim odasında vermikulit ve torf doldurulmuş plastik bardaklara aktarılmıştır. Her iki substrat da kullanılmadan önce, bez torbalara doldurulmuş şekilde 1 saat süreyle 120°C'de otoklav içerisinde sterilize edilmiştir. Bitkicikler plastik bardaklara doldurulmuş ortamlara dikildikten hemen sonra steril musluk suyu ile sulanmışlar, el pülverizatörü ile üzerleri nemlendirilmiş ve her bir bitkinin üzeri boş bir plastik bardak ile kapatılmıştır (Şekil 3.9). Boş kapların üzerlerine küçük delikler açılmıştır. Sentorya bitkileri, ilk günler günde 3-4 kez, daha sonraki günlerde 1-2 kez su pülverize edilmesiyle nemli tutulmuştur. Burada yeni yapraklar geliştiren ve kök sistemi güçlenen sentorya bitkilerinin üzerindeki kapak görevi yapan plastik kabın açık kısımları giderek büyütülmüş (Şekil 3.10), yaklaşık 10 gün içerisinde tamamen üzerleri açılmıştır. Bitkilerin vermikulit veya torf içeren kaplara dikiminden 15 gün sonra, iki substratın 1:1 oranındaki karışımını içeren harç doldurulmuş 10 cm çapındaki plastik saksılara aktarma işlemi yapılmıştır. Bitkilerin sulanmasında, ikinci sulamadan itibaren musluk suyu ile hazırlanmış ½ kuvvetinde MS ortamı tuzlarını içeren çözelti kullanılmıştır.



Şekil 3.9. Torf doldurulmuş plastik saksılara aktarılmış sentorya bitkilerinin aktarımdan hemen sonraki görünümüleri



Şekil 3.10. Vermikulit doldurulmuş plastik saksılara aktarılmış sentorya bitkileri ve aktarma işleminden bir hafta sonra üzerindeki kapta açılan büyük delikler

3.2.8. Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizler

Bütün denemeler Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre 3 tekrarlı olarak yürütülmüştür. Çimlendirme, mikroçoğaltım, alt kültür, bitkilerin köklendirilmesi ve dış koşullara alıştırılması işlemleri iklim odasında gerçekleştirilmiştir. Farklı çimlendirme ortamlarının çimlenme oranı üzerine etkileri, farklı eksplant dikim pozisyonları, hormon

kombinasyonlarının sürgün veren eksplant başına ortalama sürgün sayıları, gelişen eksplant oranı, sürgün veren eksplant oranı (%) gibi değerler belirlenmiştir. Gelişen eksplant oranı, gelişen eksplant sayısının dikilen eksplant sayısına bölünüp 100 ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır. Çoğaltım katsayısı, mikroçoğaltım aşamasındaki eksplant başına ortalama sürgün sayısının, 1., 2., 3. alt kültür aşamalarındaki eksplant başına ortalama sürgün sayısı ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır. Eksplant pozisyonlarının ve hormon kombinasyonlarının oluşan sürgün sayısı üzerindeki etkileri, köklendirme aşaması denemeleri için ise IBA katkısının kök oluşumu üzerindeki etkilerinin önemi, varyans analizleri ile incelenmiştir. Varyans analizleri Statistica 7.0 paket programıyla(121) yapılmıştır. Uygulamalar arasındaki farklılıkların önem kontrolü ise “Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi” ile ortalamalar arasındaki farklar karşılaştırılarak belirlenmiştir(122).

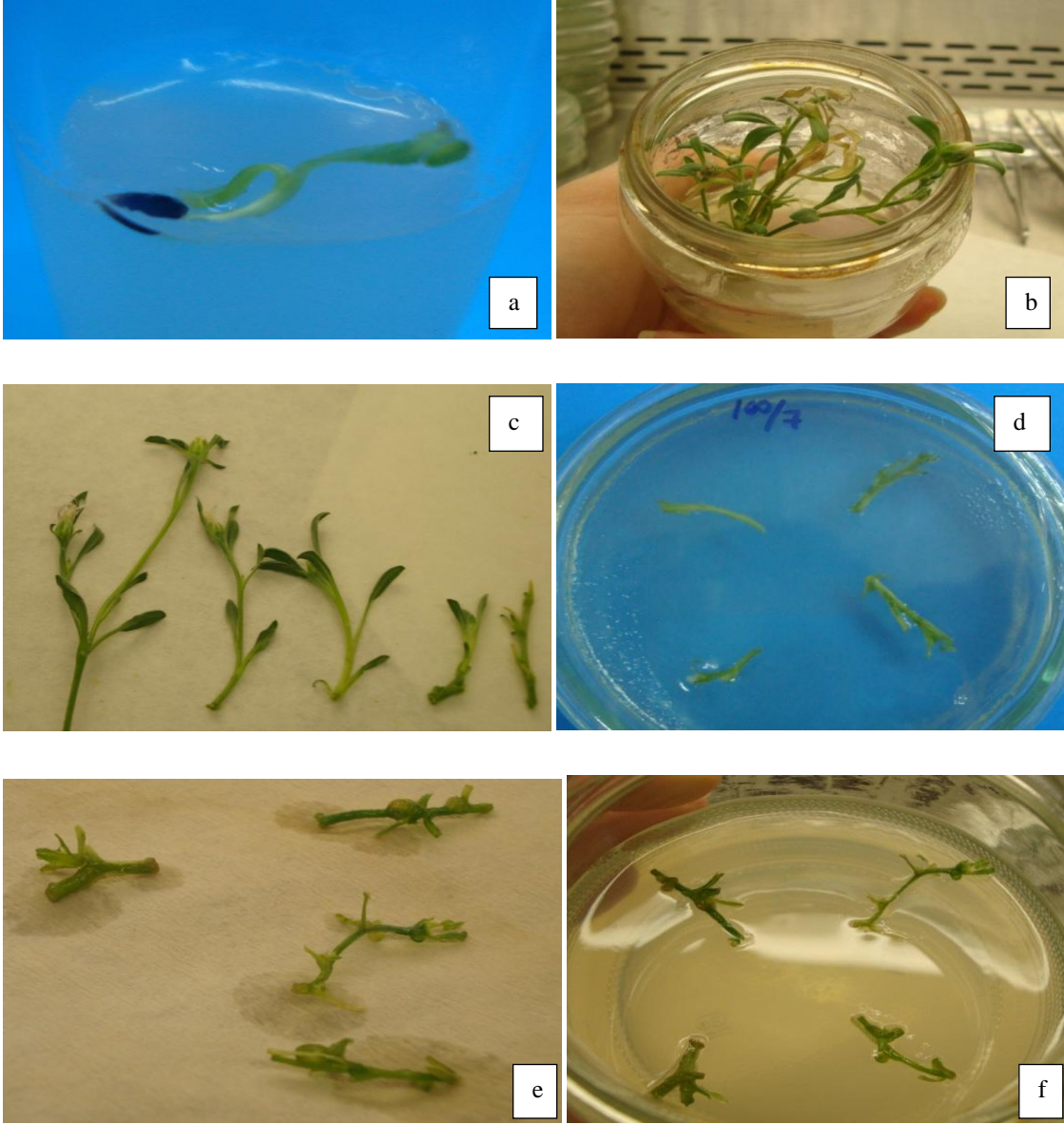
3.2.9. Kolhisin uygulamaları

Poliploid bitki oluşumunu uyarmayı amaçladığımız bitki türü olan *Centaurea tchihatcheffii* ile yapılan mikro çoğaltma denemeleri sonucunda elverişli bir besin ortamı bileşimi, eksplant tipi ve hatta eksplantın besin ortamına yerleştirme pozisyonu belirlenmiştir. Buna göre in vitro koşullarda çimlendirilmiş *Centaurea tchihatcheffii* tohumlarından gelişen fidelerden tek boğum eksplantları hazırlanarak kolhisin ilave edilmiş besin ortamlarına yerleştirilmiştir. Besin ortamı olarak 1.0 mg/L GA₃, %3 sukroz ve %0.6 agar ilave edilmiş Murashige ve Skoog (1962)(74) bileşimi kullanılmıştır. Dikime hazırlanan sentorya sürgünlerinden tek boğum eksplantları oluşturularak bunlar besin ortamına yatay konumda dikilmişlerdir. Gelişen sürgünlerden oluşan bitkiler tek tek ayrılarak alt kültürlerle alınmış ve burada gelişmeleri sağlanmayı çalışılmıştır. Ortamlar erlenmayerler içinde otoklavlandıktan sonra jel kıvamına gelmeden hemen önce 100 ve 150 mg/l dozunda kolhisin çözeltisi filtre sterilizasyonu yönteminden faydalanarak ilave edilmiş (Şekil 3.11) ve cam kavanozlara 30’ar ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Kolhisin katılmayan bir miktar ortam da kontrol olarak kullanılmıştır. Eksplantlar 5, 7 veya 10 gün süreyle bu ortamlarda inkübe edilmiştir. Her uygulama süresi ve kolhisin dozu kombinasyonunda 20’şer adet tek boğum eksplantı olacak şekilde dikim yapılmıştır. Kolhisinli ortamda bekletme süresi tamamlanan doku parçaları, kolhisin içermeyen aynı bileşimdeki taze ortamlara transfer edilmiştir. Açıklanan işlemlerin yapılışı sırasında elde edilen görüntüler Şekil 3.12’de sunulmuştur.



Şekil 3.11. Otoklavdan çıkmış ve sıcaklığı 70 °C civarına düşmüş besin ortamına, aseptik koşullar altında kolhisin çözeltisinin filtre sterilizasyonu yoluyla ilave edilmesi

Cam kavanozlarda gelişmeleri için gözlemleri devam ettirilen sürgünler üç haftada bir taze ortamlara alınmışlardır. Bitkiye dönüşen ve normal gelişme sürdürenler vermikulit içeren plastik kaplara aktarılmış ve önceki bölümde açıklanan biçimde dış koşullara aktarılması için gayret edilmiştir.



Şekil 3.12. Kolhisin uygulama işlemlerine ait görünümeler: a. Poliploidi uygulamalarında kullanılacak materyalin temini için *in vitro* tohum ekimi ve çimlenmiş sentorya bitkiciği, b. Gelişmiş ve olgunlaşmış *in vitro* sentorya bitkisi, c. *In vitro* bitkilerden eksplantların hazırlanma aşaması, d. Hazırlanan tek boğum eksplantlarının kolhisinli ortamlara dikimi, e. Kolhisin içeren ortamlarda 5, 7 veya 10 gün bekletilen eksplantların süre sonundaki görünümeleri, f. Uygulama yapılmış eksplantların kolhisin içermeyen ortamlara aktarılmış durumu

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Ankara'nın Gölbaşı çevresinde yetişen ve bu lokasyonda endemik olarak bulunan sentorya bitkisi (*Centaurea tchihatcheffii*) tohumlarının doku kültürü koşullarında çimlendirilmesi ve bunun ardından steril fidelerden hazırlanan eksplantların kullanıldığı sürgün çoğaltma aşamalarına ilişkin bulgular bu bölümde verilmiştir. Elde edilen *in vitro* sürgünlerin köklendirilmesi ve dış koşullara adaptasyonu konusunda yapılan deneme sonuçları da verilerek tartışılmıştır.

4.1. Tohum çimlendirme aşaması

Yüzeysel sterilizasyon işleminden geçirilerek besin ortamlarına dikilen tohumlarla yapılan tohum çimlendirme aşaması uygulamaları toplam beş kez gerçekleştirilmiştir. Bunlardan ilk iki dikimde hormonsuz MS ortamı kullanılmıştır. Üçüncü dikimde besin ortamına 1 mg/L gibberellik asit ilavesi yapılmış, bu uygulamanın olumlu etkisi gözlemlenince dördüncü ve beşinci tohum ekimlerinde üç farklı gibberellik asit dozunun çimlenme üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çizelge 4.1'de, beş farklı ekim tarihinde yapılan ve ikişer hafta ara ile toplamda 8 hafta boyunca çimlenme gözlemleri yapılan denemelerin sonuçları bir arada verilmiştir.

2011 yılının Ocak ayında yapılan 1. ekim döneminde, gözlemler yapıldıktan sonra 8 haftanın sonunda tohumlar hormonsuz MS ortamında toplam %58.40'lık bir çimlenme oranına sahip olmuşlardır. Bu ekimde enfeksiyon oranı, yapılan tüm uygulamalar içerisinde en yüksek miktarda oluşmuş ve ekilen tohumların %18.03'ü elden çıkmıştır. Çimlenme oranları, temiz kalan tohum sayısı üzerinden hesaplanmıştır. Bundan sonraki aşamalarda daha deneyim kazanılarak, pappusların çıkarılmasında daha etkin ve titiz çalışma ile enfeksiyon oranı düşmüş, %0-8.33 arasında seyretmiştir. Şekil 4.1'de hormonsuz MS ortamında çimlendirilmiş sentorya tohumları görülmektedir.

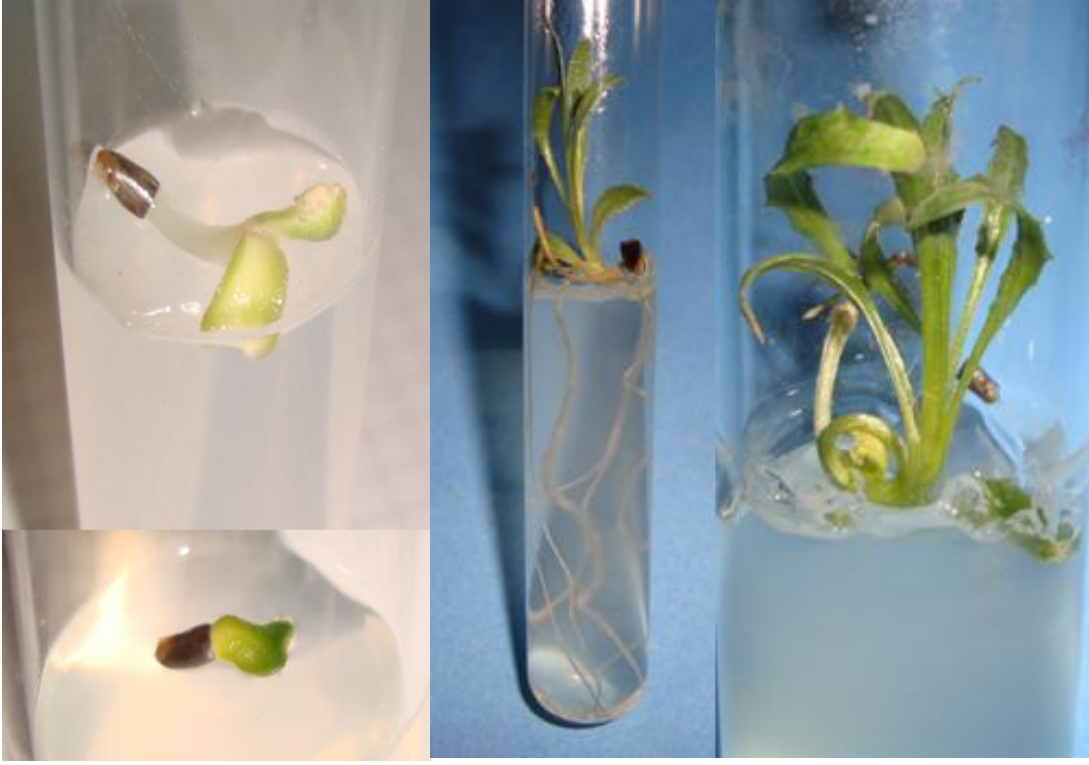
Çizelge 4.1. 2011 ve 2012 yılları içerisinde denemelerde kullanılan *in vitro* bitkilerin elde edilmesi için yapılan sentorya tohum ekimlerinden elde edilen tohum çimlenme oranları

Ekim Tarihi	Besin Ortamı	Enfeksiyon Oranı (%)	Çimlenme Oranı (%)			
			2. Hafta	4. Hafta	6. Hafta	8. Hafta
1.Ekim (27.01.2011)	MS	18.03	39.02	50.08	51.08	58.40
2. Ekim (17.04.2011)	MS	1.46	26.39	49.44	54.27	56.13
3. Ekim (08.11.2011)	MS	6.88	20.45 b	43.18 b	49.43 b	55.11 b
	MS+1 mg/L GA ₃	4.81	48.88 a	84.27 a	84.27 a	87.64 a
4. Ekim (11.12.2011)	MS+1 mg/L GA ₃	7.81	25.42 a	49.15 a	69.49 a	86.90 a
	MS+2 mg/L GA ₃	3.17	11.47 c	34.42 b	67.21 b	81.20 b
	MS+3 mg/L GA ₃	1.59	19.35 b	33.87 b	64.51 c	76.50 c
5. Ekim (17.03.2012)	MS	2.77	20.00 b	43.50 b	62.86 d	64.30 d
	MS+1 mg/L GA ₃	8.33	54.54 a	61.10 a	72.86 b	83.60 a
	MS+2 mg/L GA ₃	0	44.44 a	67.80 a	84.85 a	85.20 a
	MS+3 mg/L GA ₃	8.33	24.24 b	42.9 b	75.00 b	77.20 c



Şekil 4.1. Hormonsuz MS ortamında çimlenen sentorya (*Centaurea tchihatcheffii*)

Hormonsuz MS ortamının ikinci kez kullanıldığı çimlendirme çalışmasında 8 haftanın sonunda ulaşılan çimlenme oranı %56.13 olmuştur. %15'lik ticari sodyumhipoklorit çözeltisinde 20 dakika tutulan tohumlarda sorunsuzca kültür yapabilmek mümkün olmuştur. Çalışmamızda enfeksiyon, sorun yaratan bir faktör olarak ortaya çıkmamıştır. Bu durumun, tohum materyalinin alınması sırasında ve kurutularak saklanması sırasında yapılan işlemler ile alakalı olduğu, titiz ve sağlıklı materyalden alınan ve sağlıklı koşullarda kurutularak saklanan tohumlardaki enfeksiyon oranının çok düşük olacağı ve *in vitro* çimlendirmede sorun çıkartmayacağını söylemek mümkündür.



Şekil 4.2. 1 mg/L GA₃ içeren ortamlarda çimlenen ve gelişen sentorya bitkileri

Aralık 2011’de yapılan 4. ekimde GA₃ dozları denenmiştir. 1, 2 veya 3 mg/L GA₃ ilave edilen ortamlarda sentorya tohumlarının çimlenmeleri incelendiğinde 8 hafta sonunda sırasıyla %86.9, 81.2 ve 76.5 oranında çimlenme elde edilmiştir. GA₃ dozlarındaki artış, çimlenmeyi olumlu etkilememiştir. Aynı dozlar Mart 2012’de bir kere daha ve bu defa hormonsuz MS ortamı ile birlikte karşılaştırılarak denenmiştir. Bu denemede de en düşük çimlenme oranı hormonsuz MS ortamından elde edilmiş (%64.3), 3 mg/L GA₃ içeren ortamdaki çimlenme oranı bunu takip etmiştir (%77.3). 1 mg/L GA₃ içeren ortamdaki çimlenme oranı (%83.6) ile 2 mg/L GA₃ içeren ortamdaki çimlenme oranı (%85.2) birbirine çok yakın bulunmuş ve aralarındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

4.2. Mikro çoğaltım aşaması

4.2.1. IBA + BAP Kombinasyonları ile yapılan denemeler

In vitro koşullarda çimlendirilen ve gelişme gösteren fidelerden hazırlanan eksplantların besin ortamlarına dikilmesi sonucunda elde edilen ilk veriler, eksplantların dikim

pozisyonları ile ilgilidir. IBA ve BAP'nin ikişer dozunun kombine edildiği toplam dört farklı içeriğe sahip besin ortamında yatay veya dikey olarak besin ortamına yerleştirilen sentorya tek boğum eksplantlarının gelişme oranları ve 5 hafta sonundaki gözlem sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

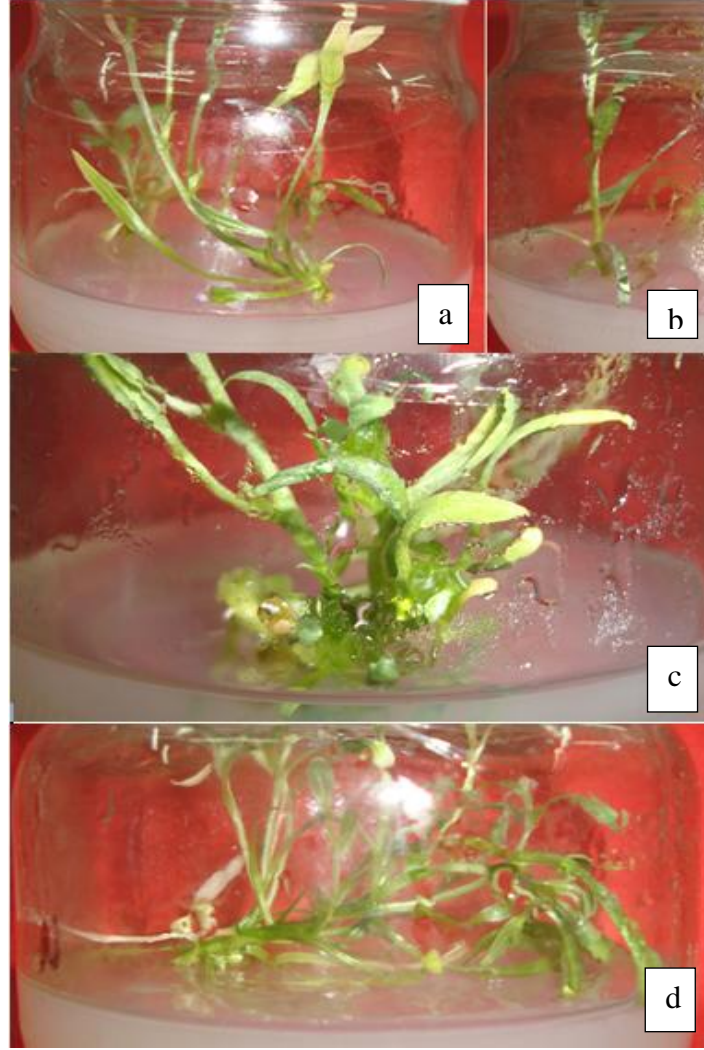
Çizelge 4.2. Tohumlardan gelişen *in vitro* fidelerden hazırlanan Eksplantların farklı IBA+BAP kombinasyonlarından 5 hafta süre sonunda elde edilen sürgün gelişme oranları ve eksplant başına aksillar sürgün sayıları

IBA+BAP Kombinasyonu (mg/L)	Dikim Şekli	Dikilen Eksplant Sayısı (Adet)	Gelişen Eksplant Sayısı (Adet)	Sürgün Gelişme Oranı (%)	Oluşan Toplam Sürgün Sayısı (Adet)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)
0.5+ 0.5	Yatay	36	22	61.11	45	2.05
	Dikey	18	8	44.44	20	2.50
0.5+ 1.0	Yatay	36	13	36.11	13	1.00
	Dikey	22	11	50.00	11	1.00
1.0+ 0.5	Yatay	36	13	36.11	13	1.00
	Dikey	24	15	62.50	22	1.47
1.0+ 1.0	Yatay	36	7	19.44	7	1.00
	Dikey	24	9	37.50	9	1.00

IBA ve BAP'nin birlikte bulunduğu besin ortamlarında eksplantların gelişerek sürgün oluşturma oranları en az %19.44, en fazla %62.50 olmuştur (sırasıyla 1.0 + 1.0/ Yatay ve 1.0 + 0.5/ Dikey kombinasyonlarında). Genel olarak Dikey pozisyonda besin ortamına yerleştirilen eksplantlarda gelişme oranı ve/veya eksplant başına oluşan sürgün sayısı daha yüksek olmuştur. Görsel olarak yapılan tespitlerde de dikey olarak dikimi yapılan eksplantların daha hızlı ve gürbüz geliştiği izlenimi edinilmiştir. İlk kez proliferasyon ortamlarına alınan eksplantlardan gelişen sürgün sayıları sadece 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP içeren ortamlarda ortalama 2 ve üzerinde bulunmuştur. Diğer kombinasyonlarda ise ortalama sürgün sayısı 1-1.50 arasında kalmıştır. Şekil 4.3'te, bazı farklı içerikteki besin ortamlarına yerleştirilen eksplantlardan gelişen sürgünler gösterilmiştir.

En yüksek eksplant başına sürgün oluşumu 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP kombinasyonuna dikey olarak yerleştirilen eksplantlardan elde edilmiştir (2.50 adet/eksplant). Bunu 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP kombinasyonuna yatay olarak yerleştirilenler takip etmiş (2.05 adet/eksplant); diğer ortam bileşenlerinin bir tanesi hariç (1.0 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP: 1.47 adet/eksplant) tümünde sadece dikimi yapılan eksplant gelişerek tek bir sürgüne dönüşmüş fakat aksillar sürgün vermemiştir.

Gelişen sürgünlerin her birinin, beş haftanın sonunda aynı bileşimlerde hazırlanan toplam dört farklı kombinasyona ve yeni hazırlanan taze ortamlara aktarılmasıyla 1. alt kültür kurulmuştur. Şekil 4.4'te alt kültüre dikimi yapılmış bir tek boğum eksplantı gösterilmiştir. Aynı şekilde dörder haftalık aralarla 2. ve 3. alt kültürlere aktarım işlemleri yapılmıştır. Bu işlemlerin sonucunda elde edilen sonuçları içeren bulgular, Çizelge 4.3'te verilmiştir. Çizelgenin incelenmesinde de görüleceği gibi 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP içeren ortamlar, en stabil ve tutarlı gelişmenin ortaya çıktığı kombinasyonu oluşturmuştur. Her bir alt kültüre alınan 40'ar adet tek boğum eksplantından sırasıyla %100, %93 ve %95 adedi sürgün oluşturmuş, geri kalanlar ise sadece kendisi gelişerek canlılığını sürdürme eğiliminde olmuştur.



Şekil 4.3. Proliferasyon ortamına aktarılan eksplantlardan gelişen sürgünler; a. 0.5 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP/Dikey, b. 1.0 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP/Dikey, c. 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP/Dikey, d. 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP/Yatay

En yüksek ortalama sürgün sayısı 1. alt kültürde elde edilmiş (5.44 ± 0.45 adet sürgün/eksplant), 2 ve 3. alt kültürlerdeki sürgün sayısı bir miktar azalmıştır (4.22 ± 0.56 ve 4.94 ± 0.23 adet sürgün/eksplant). 0.5 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP içeren ortamlarda eksplant başına elde edilen sürgün sayısı bir önceki ortama göre daha yüksek olmuştur. Hatta bu bileşim, genel olarak ilk iki alt kültür esas alındığında denemedeki en iyi sonuçları vermiştir (8.64 ± 0.36 ve 9.04 ± 0.73 adet sürgün/eksplant). Şekil 4.5'te, 2. alt kültürde oluşmuş yüksek sayıdaki aksillar sürgünleri üzerinde bulunduran bir eksplant gösterilmiştir. Üçüncü alt kültürde ise 0.5 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP içeren ortamlarda çok fazla sayıda rozet şeklinde sürgünler oluşmuş ancak bunların bir kısmı camsılaşmış ve bir kısmı da 0.5 cm'den küçük olmaları dolayısıyla aktarılmaya müsait bulunmamışlardır.

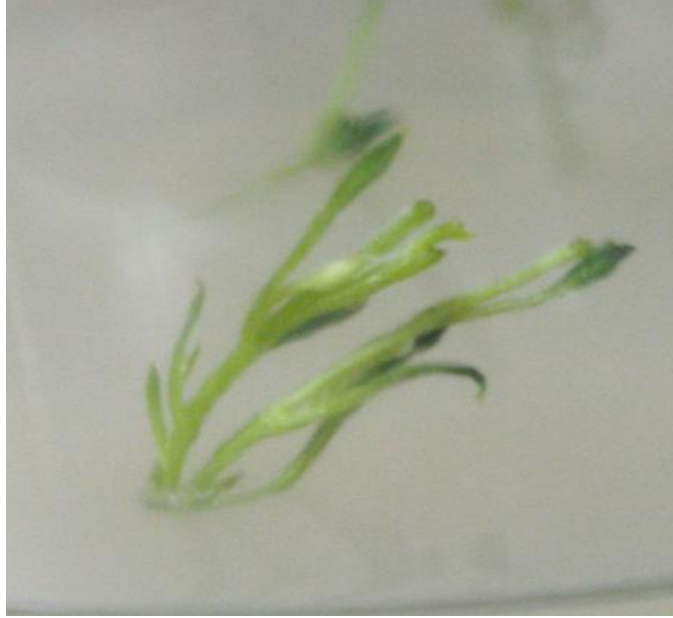
Bu ortamlarda dikimi yapılan tüm eksplantlarda sürgün oluşumu meydana gelmiştir. 1.0 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP içeren ortamlar, sürgün vermeye eğilimli olduğu kadar tek bir bitki olarak büyümeye de yönelen eksplantlara sahip olmuşlardır. Üç alt kültürde %10-24 arasındaki oranlarda tek sürgün ile canlılığını sürdüren ve köklü bitkicikler oluşturan eksplantlar dikkati çekmiştir. Bununla birlikte üç alt kültürün ortalaması olarak 2.76 adet/eksplant aksillar sürgün oluşumu kaydedilmiştir. Şekil 4.6'da, boğumdaki iki adet yan tomurcuğun gelişmesiyle iki adet sürgün oluşturmuş ve hatta sürgün ucunda çiçek tomurcuğu meydana getirmiş bir eksplant gösterilmiştir. 1.0 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP içeren ortamlar, denemenin en yetersiz sonuçlarını veren bileşim olarak belirlenmiştir. İlk alt kültürde sadece 2.74 ± 0.34 adet sürgün/eksplant veren bu ortamlarda çok sayıda 0.5 cm'nin altında sürgün farklılaşması oluşmaya başlamıştır. İkinci alt kültürde vitrifikasyon ve rozetleşme sorunu çok belirgin olarak ortaya çıkmış ve çoğunlukla değerlendirilmeleri mümkün olmayan dokular gelişmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.4. Alt kültürlerde kullanılan ve birinci alt kültüre henüz aktarılmış tek boğum eksplantlarına bir örnek.



Şekil 4.5. 0.5 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP içeren ortamlarda bir eksplant üzerinde 2.alt kültürün sonunda oluşan aksillar sürgünler (0.5 mm'den küçük olanlar sayıca ortalamalara dahil edilmemiştir)



Şekil 4.6. 1.0 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP içeren ortam üzerinde gelişmiş bir sentorya eksplantı



Şekil 4.7. 1.0 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP içeren ortamlarda ikinci alt kültürde oluşan camsılaşmış ve rozetleşmiş eksplantlar

4.2.2. BAP + GA₃ + IBA Kombinasyonları ile yapılan denemeler

IBA + BAP kombinasyonlarından istenen düzeyde ve kalitede sürgün elde edilmesi mümkün olmadığından, yeni denemeler yapılması yoluna gidilmiş, sitokinin olarak BAP, oksin olarak IBA kullanımının yanında sürgün boylarında uzamayı sağlayacak gibberellik asit ilavesi ile yeni bazı kombinasyonlar denenmiştir. Çimlendirilerek gelişmeleri sağlanan in vitro fidelerden hazırlanan eksplantlardan 1., 2. ve 3.alt kültürde elde edilen sürgün sayıları ve gelişme oranları çizelge 4.4.'te verilmiştir.

En yüksek eksplant başına sürgün oluşumu 0.5 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L GA₃ kombinasyonunun 1. alt kültüründe elde edilmiştir (10.45 ± 3.73 adet sürgün/eksplant) (Şekil 4.8). Bunu yine aynı ortamdaki 3. ve 2. alt kültürler takip etmiştir (9.88 ± 1.76 ve 9.36 ± 2.75 adet sürgün /eksplant). Şekil 4.9'da bir eksplant üzerinde 2. alt kültürde gelişen aksillar sürgünlerin, 3. alt kültüre alınmadan önce hazırlanmış durumları gösterilmiştir. En yüksek sayısal değerlerin elde edildiği bu ortama en yakın sonuçları yine üç büyüme düzenleyicinin birlikte kullanıldığı diğer kombinasyon olan 1.0 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L GA₃ kombinasyonu vermiştir (ortalama 7.26 adet

sürgün/eksplant). Bir önceki deneme aşamasında BAP'in 1.0 mg/L dozunda kullanıldığı ortamlarda çok sayıda sürgün taslağının oluştuğu, ancak bunların gelişemeyerek rozet formunda kaldıkları belirlenmiştir. Bu aşamadaki ortamlara gibberellik asit ilave edilmesi, oluşan bu sürgünlerin önemli bir kısmının uzamasını ve rozet formundan kurtulmasını sağlamış görünmektedir. Şekil 4.10'da 1.0 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L GA₃ kombinasyonuna sahip ortamda gelişen 3. alt kültürdeki sentorya sürgünleri gösterilmiştir.



Şekil 4.8. 0.5 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L GA₃ kombinasyonunun 1. alt kültüründe elde edilen aksillar sürgünler



Şekil 4.9. 0.5 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L GA₃ kombinasyonunu içeren ortamda 2.alt kültürde bir eksplanttan oluşan ve 3.alt kültüre alınmak üzere hazırlanmış aksillar sürgünler



Şekil 4.10. 1.0 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L GA₃ kombinasyonuna sahip ortamda gelişen 3. alt kültürdeki sentorya sürgünleri

BAP'nin tek başına 1 mg/L dozunda kullanıldığı ortamdan elde edilen ortalama sürgün sayısı, üçüncü sırada yer almıştır (5.80 adet sürgün/eksplant). BAP ile birlikte GA₃ kullanılan ortamlarda ise üç alt kültürde alınan sayısal değerlerin ortalaması olarak 3.18 ile 4.50 adet sürgün/eksplant elde edilmiştir. Bu değerler, bir önceki IBA + BAP kombinasyonlarına benzer ve bazılarında da düşük olduğundan öne çıkan bir özellikte bulunmamışlardır. Ancak BAP + GA₃ kombinasyonlarının olumlu bir özelliği olarak vitrifikasyona yatkınlığın çok daha az olması ve rozetleşme sorununun belirgin olmayışı, sürgün gelişmelerinin daha sağlıklı görünmeleri, bu kombinasyonların tek başına kullanılan IBA + BAP kombinasyonlarına göre daha olumlu bir durum sergilediklerini göstermiştir. Şekil 4.11'de 3.0 mg/L BAP + 1.0 mg/L GA₃ kullanılan ortam üzerinde 2.alt kültürde gelişmelerini sürdüren sürgünlerden bu görünüm verilmiştir. BAP + GA₃ içeren ortamlardaki gelişmeler, genel olarak fotoğraftaki duruma benzer görünümler oluşturmuştur.



Şekil 4.11. 3.0 mg/L BAP + 1.0 mg/L GA₃ ilave edilen MS ortamında 2.alt kültür aşamasındaki sentorya sürgünleri

Çizelge 4.3. IBA ve BAP'nin ikişer dozunun kombine edildiği ortam bileşimlerinde 3 alt kültür boyunca belirlenen sürgün veren eksplant oranı, eksplant başına toplamda elde edilen ortalama sürgün sayıları

Ortalama Sürgün Sayısı/Eksplant	Ortalama sürgün sayısı/ eksplant (1.+2.+3. alt kültürler/3)			
	1.alt kültür	2.alt kültür	3.alt kültür	
	5.44±0.45b*	4.22±0.56b	4.94±0.23a	
	8.64±0.36a	9.04±0.73a	Vitrifikasyon veya rozet oluşumu	
	3.23±0.35c	2.81±0.51c	2.26±0.37b	2.76
	2.74±0.34c	-	-	0.91
3.Alt kültürde kendisi gelişen eksplant oranı (%)	5			Vitrifikasyon veya rozet oluşumu
3.Alt kültürde sürgün veren eksplant oranı (%)	95			100
2.Alt kültürde kendisi gelişen eksplant oranı (%)	7			0
2.Alt kültürde sürgün veren eksplant oranı (%)	93			100
1.Alt kültürde kendisi gelişen eksplant oranı (%)	0			18
1.Alt kültürde sürgün veren eksplant oranı (%)	100			82
Dikilen eksplant sayısı	40	40	40	40
IBA+BAP Dozları (mg/L)	0.5+ 0.5	0.5+ 1.0	1.0+ 0.5	1.0+ 1.0

*Duncan çoklu karşılaştırma testine göre her bir alt kültür için, aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir.

Çizelge 4.4. IBA + BAP + GA₃'ün kombine edildiği ortam bileşimlerinde 3 alt kültür boyunca belirlenen sürgün veren eksplant oranı, eksplant başına toplamda elde edilen ortalama sürgün sayıları

BAP (mg/L)	GA ₃ (mg/L)	IBA (mg/L)	Dikim yapılan eksplant sayısı	1.alt kültürde sürgün sayısı/eksplant	2.alt kültürde sürgün sayısı/eksplant	3.alt kültürde sürgün sayısı/eksplant	Ortalama sürgün sayısı/eksplant (1.+2.+3. alt kültürler/3)
1	-	-	40	5.66 ± 2.33 ^{bc}	6.32 ± 2.78 ^{b-d}	5.43 ± 2.07 ^c	5.80
1	1	-	40	4.00 ± 2.83 ^{bc}	4.97 ± 3.05 ^{cd}	4.53 ± 2.93 ^{cd}	4.50
1	3	-	40	3.18 ± 1.07 ^{cd}	3.06 ± 2.55 ^{de}	3.63 ± 1.92 ^{de}	3.29
3	1	-	40	2.31 ± 1.96 ^d	3.73 ± 2.36 ^d	3.51 ± 2.54 ^{de}	3.18
3	3	-	40	3.13 ± 2.71 ^{cd}	4.05 ± 2.15 ^{cd}	2.53 ± 3.12 ^e	3.24
1	0.5	1	40	6.73 ± 3.42 ^b	7.13 ± 2.81 ^{bc}	7.91 ± 2.44 ^{ab}	7.26
1	0.5	0.5	40	10.45 ± 3.73 ^a	9.36 ± 2.75 ^a	9.88 ± 1.76 ^a	9.90

*Duncan çoklu karşılaştırma testine göre her bir alt kültür için, aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir.

4.3. Köklendirme aşaması

Mikroçoğaltım aşamasında oluşan sürgünlerden bir kısmı, özellikle IBA ve BAP'nin dengede kullanıldığı 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP kombinasyonunda kök oluşumu da meydana getirmiştir. Ancak oluşan kökler, aksillar sürgün veren üzerinde 2-7 adet sürgünün bulunduğu kümenin altında yer aldığından bu sürgünlerin birbirinden ayrılması esnasında ya bir veya iki tanesi ile birleşik durumda kalmış, ya da tamamen temizlenerek sürgünler tek tek birbirinden ayrılmıştır. Dolayısıyla proliferasyon aşamasında oluşan köklenme olayının pratik olarak bir önemi bulunmadığı gibi arzu edilen bir durum da değildir. Sürgün çoğaltımına son verildiği üçüncü alt kültürün sonunda ve bundan bir önceki aktarma aşamasında yani ikinci alt kültürün sonunda tüm ortamlardan elde edilen materyal üçe ayrılarak hormonsuz MS, 0.1 mg/L IBA ve 1.0 mg/L IBA ilave edilmiş MS ortamlarına alındıktan sonra elde edilen köklenme oranları topluca değerlendirilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.5'te sunulmuştur.

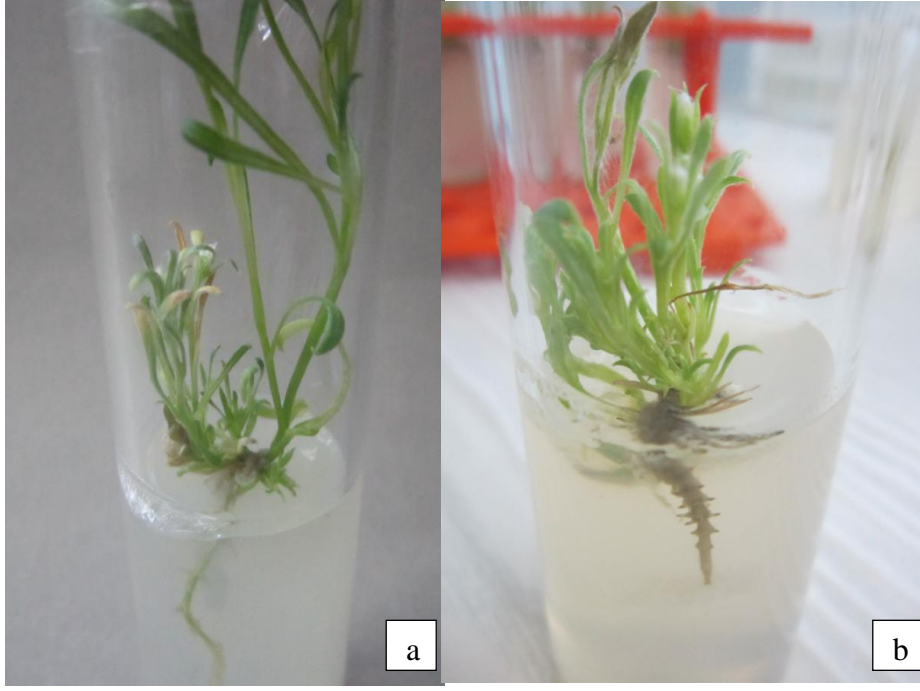
Çizelge 4.5. Hormonsuz MS veya 0.1 mg/L IBA ilave edilmiş MS ortamlarına aktarılan sentorya sürgünlerinin köklenme oranları

Köklendirme ortamı	2. alt kültürden alınan sürgünlerde köklenme oranı (%)	3. alt kültürden alınan sürgünlerde köklenme oranı (%)	Ortalama köklenme oranı (%)
Hormonsuz MS	75.5 ± 1.2 bA*	65.9 ± 1.5 cB	70.7
0.1 mg/L IBA katkılı MS	84.7 ± 1.8 aA	78.5 ± 0.9 bB	81.6
1.0 mg/L IBA katkılı MS	89.2 ± 0.8 aA	83.4 ± 1.4 aB	86.3

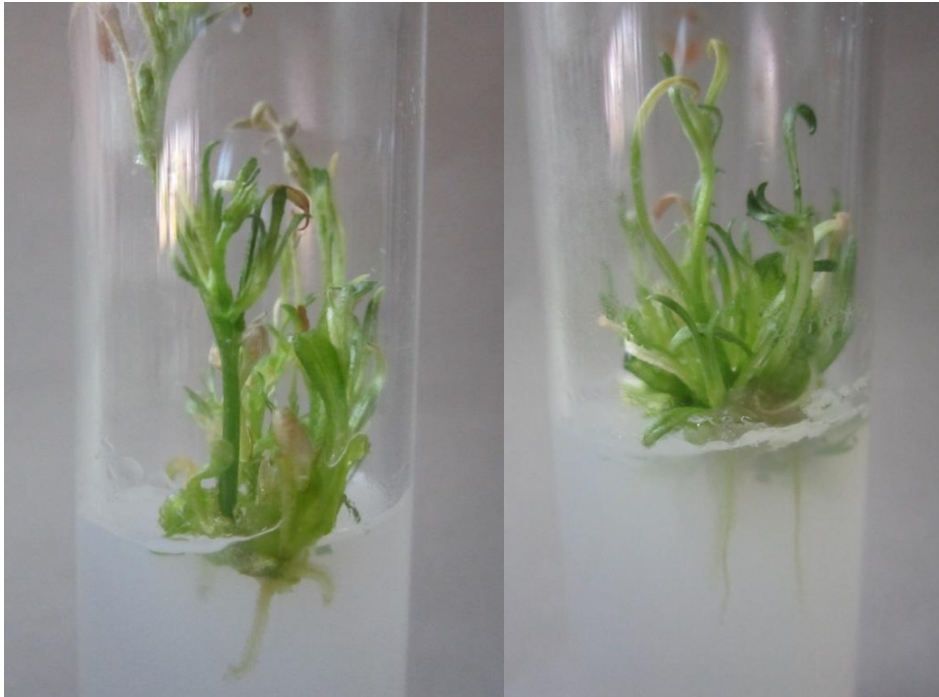
*Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütunda farklı küçük harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($p \leq 0.05$); aynı satırda farklı büyük harfler alan uygulamalar arasındaki farklar önemlidir ($p \leq 0.05$).

Çizelgeden de izlenebileceği gibi, hormonsuz MS ortamında her iki alt kültürün ortalaması esasında değerlendirildiğinde %70.7'lik bir köklenme oranı elde edilmiştir. Bu oran besin ortamına 0.1 mg/L IBA ilave edildiğinde %81.6'ya, 1.0 mg/L IBA eklendiğinde ise %86.3'e çıkmıştır. Şekil 4.12'de hormonsuz veya 0.1 mg/L IBA ilave edilmiş ortamlarda kök oluşturan sentorya sürgünleri gösterilmektedir.

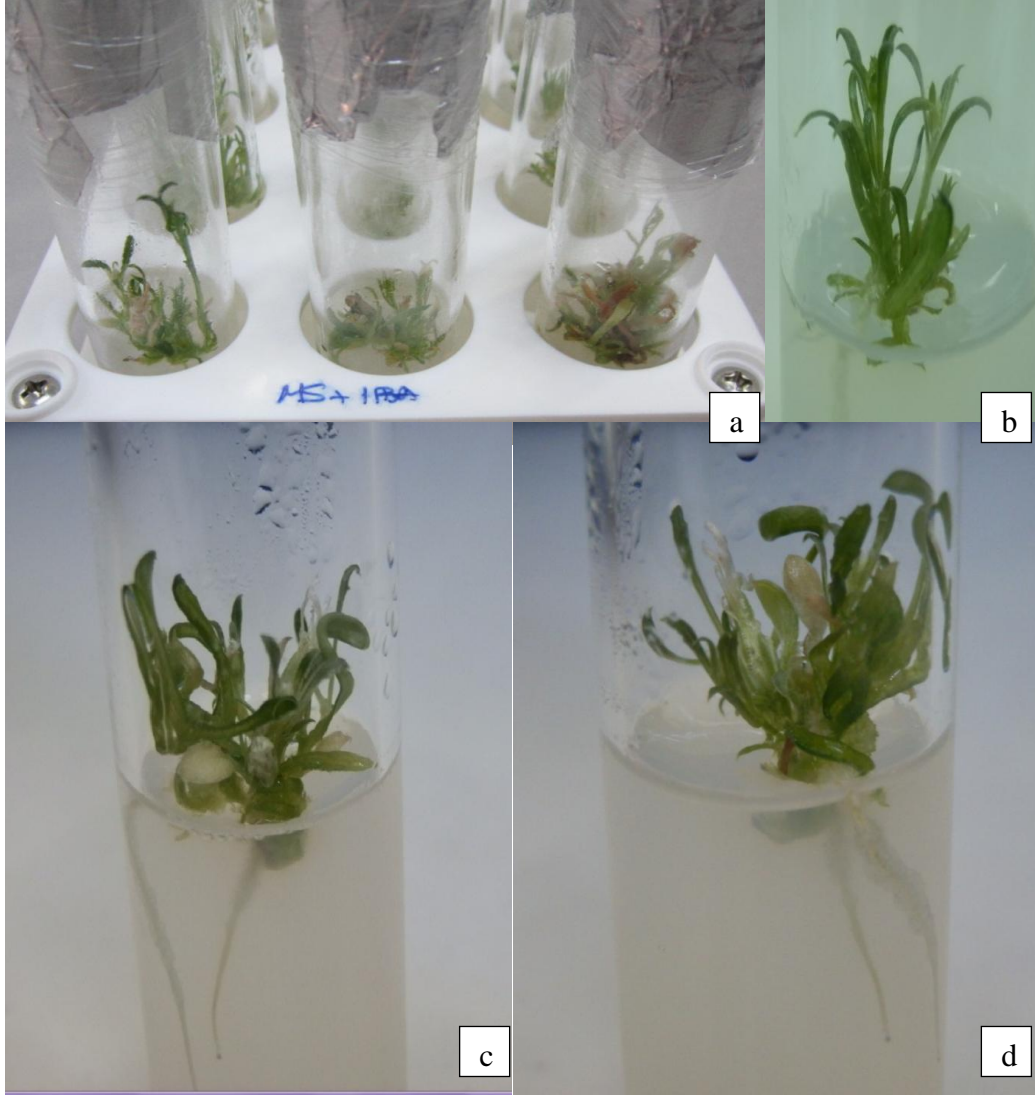
Alt kültürler arasında da köklenme oranı bakımından farklılıklar ortaya çıkmıştır. Her iki ortam bileşiminde de ikinci alt kültürden alınan sürgünler, üçüncü alt kültürden alınanlara göre daha yüksek bulunmuştur. Alt kültüre alma sayısı arttıkça dokularda ortaya çıkan camsılaşma ve doku malformasyonları, köklenme oranının azalmasıyla da uyuşan bir durum olarak görülmeştir. Ayrıca dokuların sitokininli ortamlarda kalma süreleri uzadıkça içsel sitokinin miktarlarında da artış alması ve bunun da köklenme üzerinde azaltıcı etki yapmış olma olasılığı düşünülmüştür. Şekil 4.13'te 0.1 mg/L IBA içeren ortamlara 3.alt kültürden aktarılmış ve köklenme elde edilmiş sürgünler bulunmaktadır. Alt kültür sayısı arttıkça dokulardaki şeffaf ve hiper hidrifiye durum farkedilmektedir.



Şekil 4.12. Köklenmiş sentorya bitkileri a. Hormonsuz MS ortamına 2.alt kültürden aktarılan bir sentorya sürgününden oluşan kökler ve aynı zamanda gelişmeye devam eden sürgün oluşumu; b. 0.1 mg/L IBA içeren MS ortamına 2.alt kültürden aktarılan bir sentorya sürgününden oluşan kökler ve aynı zamanda gelişen sürgün oluşumu



Şekil 4.13. 0.1 mg/L IBA içeren MS ortamlarına 3.alt kültürden aktarılan sürgünlerde köklenme ve ayrıca yapraklardaki camsılaşma eğilimi



Şekil 4.14. 1.0 mg/L IBA içeren besin ortamında meydana gelen köklenmelere örnekler; a, c ve d. 3.alt kültürden aktarılan sürgünlerde meydana gelen köklenmeler, b 2.alt kültürden aktarılan bir sürgünde meydana gelme köklenme

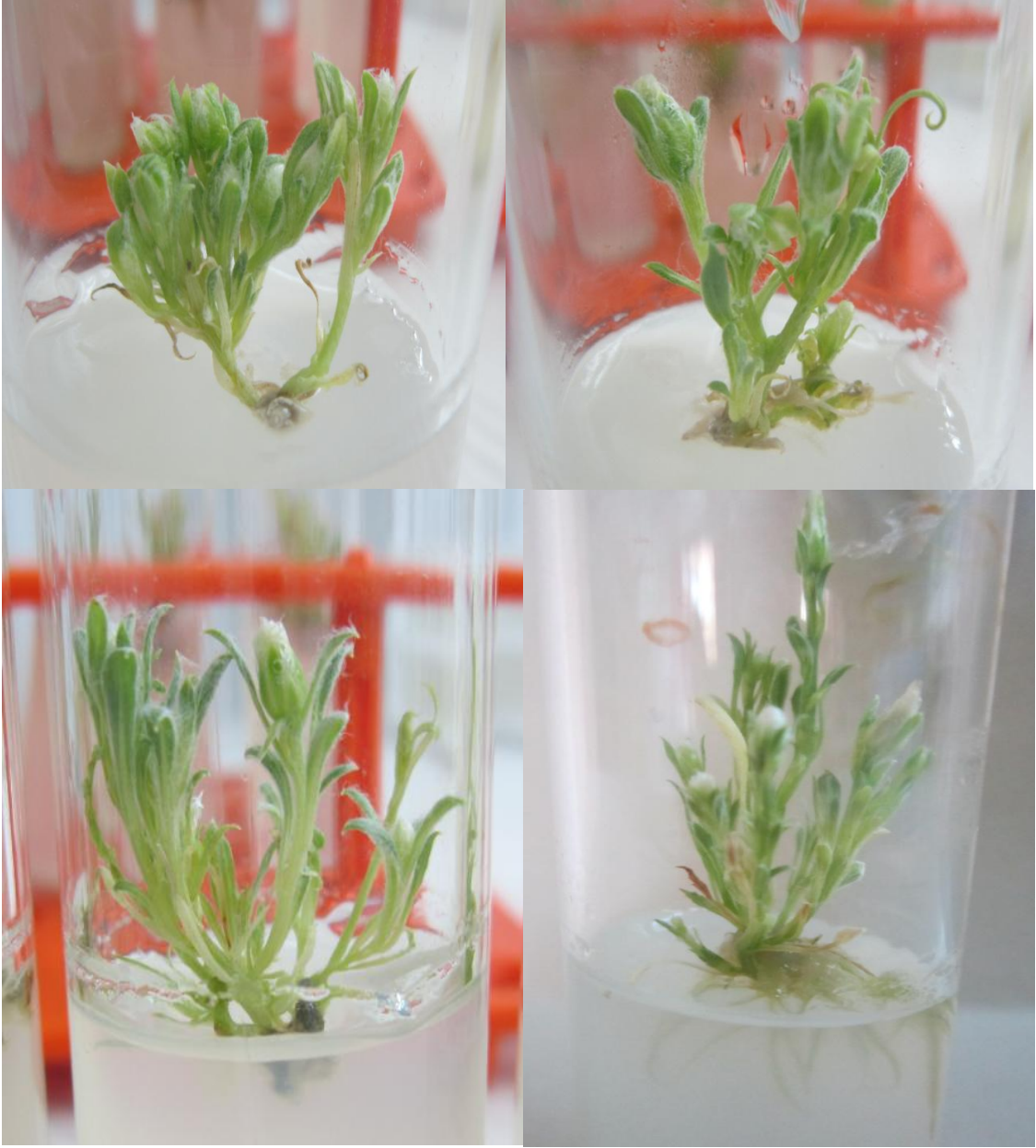
IBA'nın 1.0 mg/L dozunda kullanılmasıyla, köklenme oranı üçüncü alt kültürde diğer iki ortam bileşimine göre en yüksek oranda bulunmuştur. Hormonsuz MS ortamında 3. Alt kültürden gelen sürgünler %65.9 oranında köklenmeye sahip olduğu halde, bu oran 0.1 mg/L IBA kullanıldığında %78.5'e yükselmiş; 1.0 mg/L IBA katkısı yapıldığında ise %83.4 oranında köklenme elde edilmiştir. Ancak oran artışının her zaman kalite ile paralel seyretmediği gözlemlenmiştir. Köklenme meydana gelmiş olsa da ikinci alt kültürden gelen sürgünlerden gelişen bitkiler görünüm olarak daha sağlıklı ve gelişmeleri de daha hızlı olmuştur. 1.0 mg/L IBA içeren ortamlardaki sürgünlerin boyları genel olarak diğer iki

ortam bileşimine nazaran daha kısa olduğu gibi camsılaşıma ve dokularda fizyolojik olumsuzluklar daha fazla ortaya çıkmış görünmektedir (Şekil 4.14).

Köklenme aşamasında tüplere tek tek sürgünler olarak dikim yapıldığı halde, bu aşamada sürgün oluşumunun devam ettiği görülmüştür. Bu durum bitkinin doğada da yayılarak toprağın üzerini kaplayan ve aksillar sürgün vermeye çok yatkın yapısı nedeniyle ortaya çıkmış olabilir. Bunun yanı sıra, özellikle hormonsuz MS ortamındaki sürgünlerde yaygın olarak ve neredeyse %90'a yaklaşan oranlarda sürgün uçlarında çiçek tomurcuğu meydana gelmiş (Şekil 4.15) ve hatta bazı bitkiler *in vitro* koşullarda çiçeklenmiştir (Şekil 4.16). Bu durum, tek yıllık bir bitki olan sentoryanın, uygun sıcaklık koşullarını bulduğunda sorunsuzca çiçeklenebildiğini gösteren bir işaret olmuştur. Ancak aynı zamanda yaşlanmaya da eğilimli olması dolayısıyla *in vitro* koşullarda çok fazla bırakılmaya ve tüp içerisinde fazlaca zaman geçirmeye uygun bir tür olmadığı izlenimi edinilmiştir.

4.4. Bitkiciklerin Dış Koşullara Alıştırılması

Köklü fideler, steril hale getirilmiş vermikulit içeren plastik saksılara yani *ex vitro* koşullara alınarak gelişmeleri izlenmiştir. Torf ve vermikulit ortamlara aktarılan toplam 30'ar adet köklü bitkicikten vermikulit ortamındakiler %97 oranında dış koşullara uyum sağlayıp gelişmelerini sürdürmüş; bu oran torf ortamına aktarılanlarda %84 olmuştur. Torf ortamındaki bitki kaybı, esas olarak fungal etmen gelişimi nedeniyle kök boğazından çürüme şeklinde meydana gelmiştir. İki ortam arasındaki doğal farklılığı izleyebilmek amacıyla herhangi bir preparat uygulanmamıştır. Bitkilerin gelişimine ilişkin bazı görüntüler Şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.15. Hormonsuz MS ortamı üzerinde köklenmeye alınan sürgünler üzerinde çiçek tomurcuklarının oluşumu



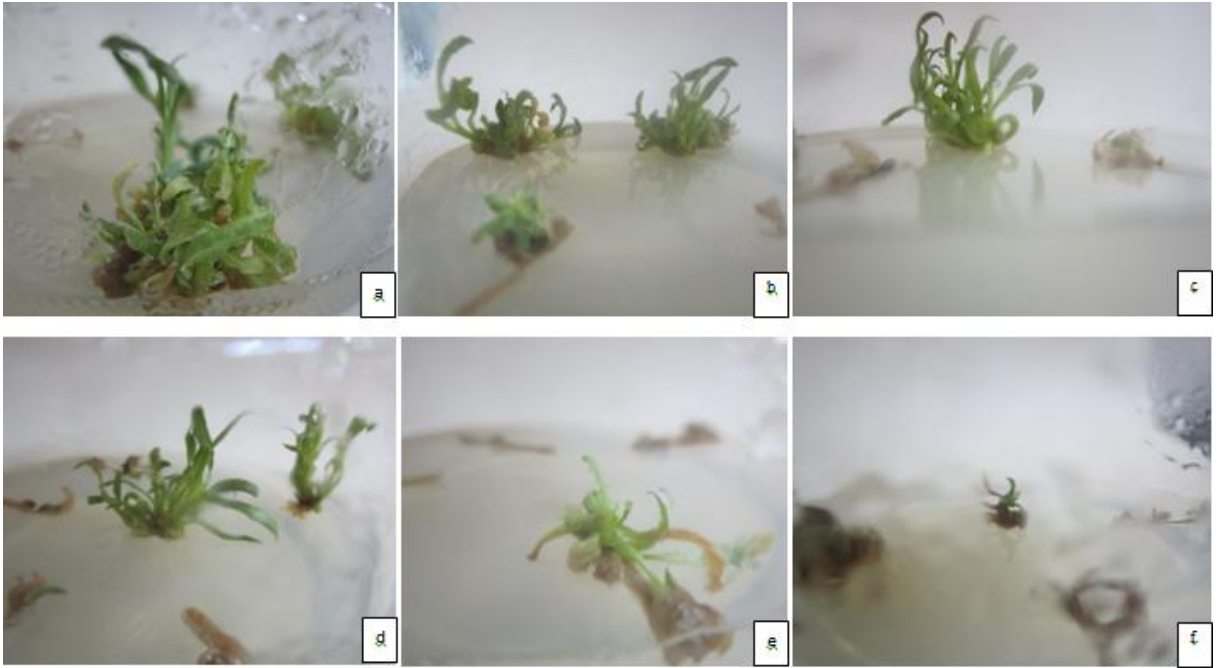
Şekil 4.16. *In vitro* koşullarda açmış bir sentorya çiçeği



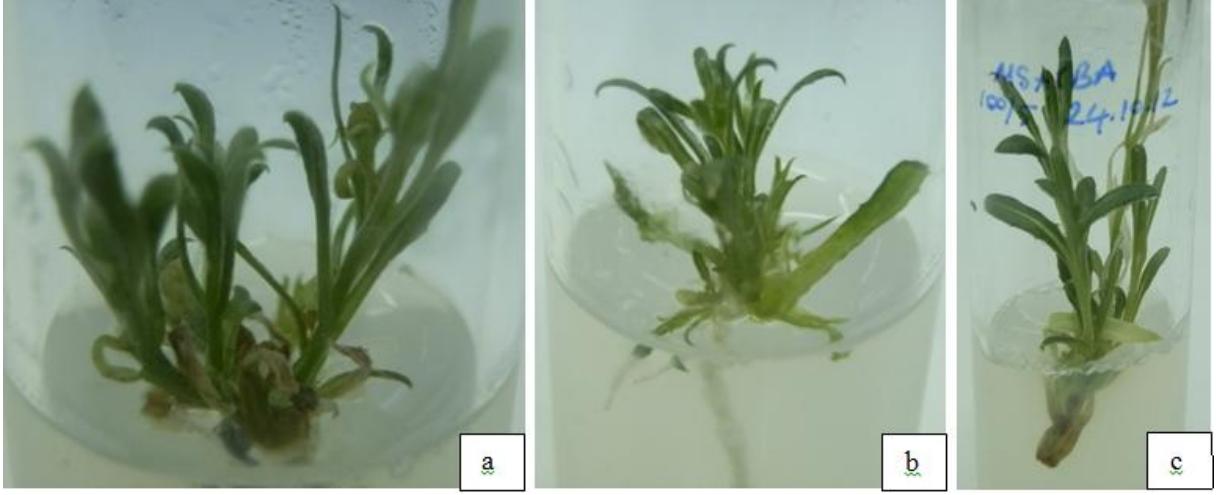
Şekil 4.17. Bitkilerin gelişimine ilişkin bazı görüntüler. Üst sıradakiler: Torf ortamına yeni aktarılmış (en solda), aktarmadan on gün sonraki (ortada ve en sağda) sentorya bitkileri; Alt sıradakiler: Vermikulit ortamına yeni aktarılmış (en solda), aktarmadan on gün sonraki (ortada ve en sağda) sentorya bitkileri

4.5. Kolhisin Uygulamalarının Yaşama ve Gelişimi Oranları Üzerine Etkisi

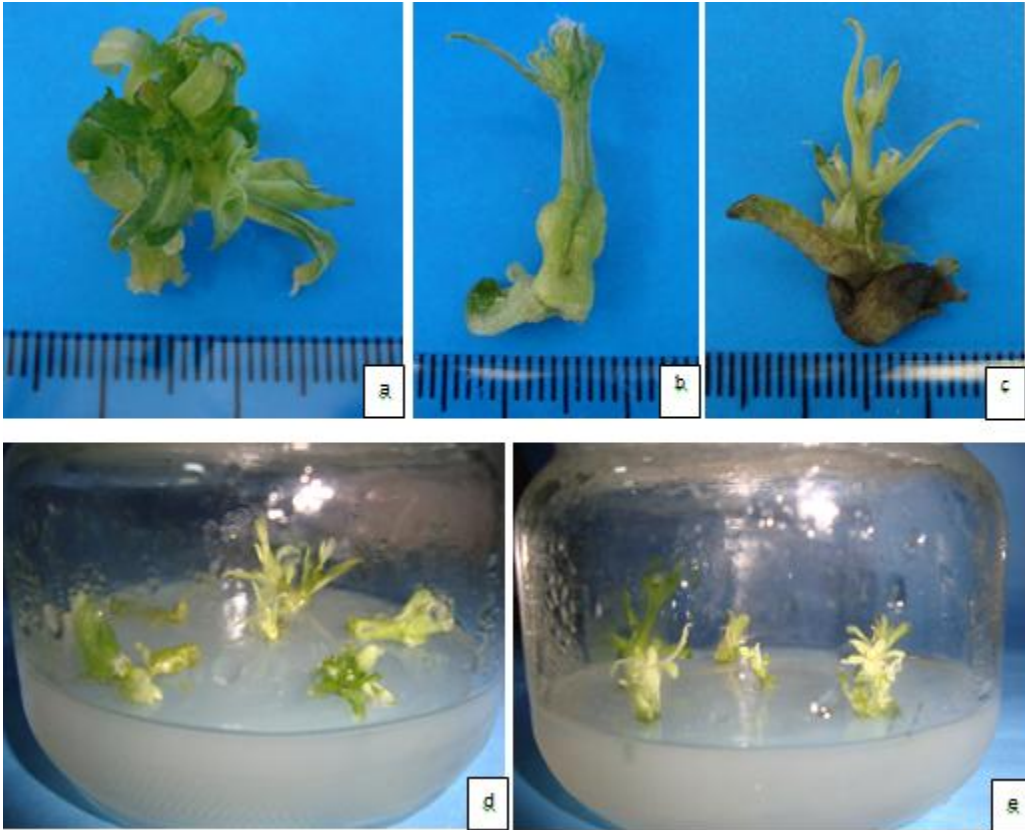
100 ve 150 mg/L kolhisin ilave edilen ve ilavesiz ortamlarda gelişmelerine devam eden eksplant sayıları Çizelge 4.6'da verilmiştir. Kolhisin uygulamalarından sonra taze ortamlara aktarılan ve burada gelişmeleri izlenen eksplantların, uygulama sonrasındaki günlerde özellikle yüksek doz ve uzun süre uygulamalarında renklerinin koyulaşarak kahverengine döndüğü ve hiçbir canlılık işareti göstermedikleri görülmüştür. Ancak uygulamadan yaklaşık üç hafta sonra canlılıklarını yitirdi gözüyle bakılan eksplantlardan en az %60 civarında bir farklılaşma meydana gelmiş, bunlardan bir kısmı gelişerek sürgün vermiş; ancak bir kısmı sadece hafifçe yeşillenmiş veya kallus + sürgün karışımı hiperhidriye yapılar oluşmuştur. Değişik kolhisin uygulamalarından gelişen sürgünlere örnekler Şekil 4.18'de verilmiştir. Şekil 4.19'da ise gelişmelerine devam eden sürgünlerin görüntüsü gösterilmiştir. Şekil 4.20'de, yaşama belirtisi gösteren ancak sürgün gelişimi sağlanamayan eksplantlara örnekler verilmiştir.



Şekil 4.18. Kolhisin uygulamalarından gelişen sürgünler: a-d. 5 gün süreyle 100 mg/L kolhisin içeren ortamlarda bekletildikten sonra gelişen sürgünler, e. 7 gün süreyle 150 mg/L kolhisin içeren ortamda bekletildikten sonra gelişen sürgün, f. 10 gün süreyle 100 mg/L kolhisin içeren ortamda bekletildikten sonra gelişen sürgün



Şekil 4.19. Gelişmelerine devam eden sürgünler: a. Kontrol ortamında gelişen sürgünler, b ve c. 100 mg/L kolhisin + 5 gün uygulamasından gelen sürgünler



Şekil 4.20. Yaşama belirtisi gösteren ancak sürgün gelişimi sağlanamayan eksplantlar: a-c. 150 mg/L kolhisin içeren ortamlarda yaşayan, ancak daha sonra gelişmesini sürdüremeyerek deforme olan sürgünlere örnekler, 100 mg/L kolhisin + 10 gün uygulamasından elde edilen sürgünlerin gelişme durumları, e. 150 mg/L kolhisin + 5 gün uygulamasından elde edilen sürgünlerden bazılarının görünümü

Kolhisin uygulamalarından sonra herhangi bir şekilde canlılık göstergesine sahip olan eksplantlar ‘yaşayan eksplant’ olarak değerlendirilmiş ve yaşama oranının (%) belirlenmesinde değerlendirilmiş; sürgün oluşturarak gelişmesine devam eden eksplantların sayıları da gelişme oranının (%) belirlenmesinde kullanılmıştır. Buna göre elde edilen yaşama ve gelişme oranları yaşamaya devam eden normal görünümle *in vitro* bitki sayıları Çizelge 4.6’da yer almaktadır.

Çizelge 4.6. Kolhisin uygulamaları sonrasında eksplantların yaşama oranı, *in vitro* koşullarda sürgün oluşturarak gelişen eksplantların oranı ve serada gelişmesine devam eden bitki sayısı

<i>Centaurea tchihatcheffii</i>			Yaşama oranı (<i>in vitro</i>) (%)	Gelişme oranı (<i>in vitro</i>) (%)	<i>In vitro</i> koşullarda gelişmesini sürdüren sağlıklı bitki sayısı
Tek boğum eksplantları	100 mg/l	5 gün	80 b	45 b	14
		7 gün	100 a	50 b	6
		10 gün	75 bc	35 c	3
	150 mg/l	5 gün	60 c	40 bc	2
		7 gün	65 c	35 c	1
		10 gün	40 d	20 cd	0
	Kontrol		100 a	90 a	38

Çizelgenin incelenmesinden de görüleceği gibi genellikle yaşama oranları, gelişme oranlarından daha yüksek bulunmuştur. Kolhisin uygulamaları sonrasında taze ortamlara alınan tek boğum eksplantlarının büyük çoğunluğu yaşamasını en az iki ay boyunca sürdürmüştür. Ancak yaşayan tüm eksplantlardan yeni sürgünlerin gelişmesi ve bitkiye dönüşüm sağlanamamıştır. Yaşayan eksplantlardan bir bölümü sert dokulu bir kallus oluşturarak veya gittikçe nekroze olarak gelişme göstermeksizin öylece kalmıştır. 100 mg/L kolhisinli ortamda 7 gün bekletilen uygulamada kontrolle aynı düzeyde yaşama oranı elde edilmiştir (%100). Ancak eksplantın herhangi bir noktasındaki yeşerme veya kallus oluşumu yaşama oranı kapsamında değerlendirildiğinden bu iki uygulama grubunun aynı istatistiksel birlikteliğe sahip olduğu düşünülmüştür. Gelişme oranları, daha gerçekçi ve bitki oluşumuna yönelik bilgileri yansıtmaktadır. Nitekim gelişme oranları bakımından en

yüksek değer kontrol grubundan elde edilmiş, kolhisin uygulamalarının tümü kontrollere göre daha düşük oranlarda gelişme gösterebilmiştir.

Kontrol grubundaki eksplantlar %90 oranında gelişme göstermiştir. Dikilen eksplant sayısı esas alınarak hesaplanan gelişme oranları bakımından 100 mg/l kolhisin dozu 5 veya 7 gün süreyle uygulanması halinde kontrolden sonraki en yüksek gelişme oranlarını vermiş ve istatistiksel olarak aynı önemsiz farklılığa sahip grup içerisinde kalmıştır (%50-45). Kolhisin içeren ortamda tutma süresi arttıkça, gelişme miktarında azalma ortaya çıkmıştır. Genel bir değerlendirmeye 10 gün süreyle kolhisin içeren ortamda bekletilen eksplantların tümünün her iki uygulama dozunda da en düşük gelişme oranlarına sahip olduklarına söylemek mümkündür. Bu durumda eksplantlardan bitki elde etme kriteri esas alındığında 10 gün süreyle *in vitro* kolhisin uygulaması yapılmaması gerektiği söylenebilir. 150 mg/L kolhisin dozu da hem yaşama, hem de gelişme oranı üzerinde olumsuz etki yapmıştır. Ayrıca bu uygulamalardan gelen dokuların şekilsiz, bazal kısımlarında kallus içeren dokular olduğu gözlemlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sentorya bitkisinin tohumlarının *in vitro* koşullarda çimlendirilmesi çalışmalarında tohumların pappus kısımlarının temizlenerek uzaklaştırılması faydalı bulunmuştur. Böylelikle enfeksiyon oranı tüm ekimlerde sadece % 0-8.33 arasında seyretmiştir. Sentorya bitkisinin tohumları *ex situ* çimlendirmeye tabi tutulduğunda sorunlarla karşılaşmaktadır. Bununla ilgili detaylı araştırmalar yapan Günöz (2008), 2005 ve 2006 yıllarında doğadan toplanan tohumlarda çimlenmeyi uyarıcı etkilerini belirlemek amacıyla suda bekletme (12 ve 24 saat), GA₃ çözeltisinde bekletme (10 ppm ve 100 ppm) ve katlama (3, 4 ve 5 ay süre ile) uygulamaları gerçekleştirmiştir(9). Suda ve GA₃ çözeltisinde bekletme uygulamalarına tabii tutulan tohumların petrilerde 25 ± 2 °C etüv sıcaklığında bekletilmeleri sonucunda elde edilen çimlenme oranları incelendiğinde her iki yılda da en yüksek tohum çimlenme oranının 100 ppm GA₃ çözeltisinde 24 saat bekletilen tohumlarda belirlendiği (2005 yılında % 38.33; 2006 yılında % 43.33) görülmüştür. 24 saat suda (2005 yılında % 31.67; 2006 yılında % 35.00) ve 10 ppm GA₃ çözeltisinde (2005 yılında % 31,67; 2006 yılında % 28.33) bekletilen tohumlardaki çimlenme oranları da yüksek bulunmuştur. Her iki yılda da yüzey sterilizasyonu dışında hiç bir uygulama yapılmamış olan tohumlardaki çimlenme oranları en düşük düzeylerde (sırasıyla % 11,67 ve % 18,33) olmuştur. Buradan elde edilen sonuçlar ile bizim çalışmamızda *in vitro* koşullarda hormonsuz MS ortamı kullanılarak yapılan çimlendirme denemeleri karşılaştırıldığında, *in vitro* çimlendirmenin çok olumlu etki yaptığını söylemek mümkün görünmektedir.

Hormonsuz MS ortamının ikinci kez kullanıldığı çimlendirme çalışmasında 8 haftanın sonunda ulaşılan çimlenme oranı %56.13 olmuştur. *Centaurea tchihatcheffii*'nin doğada tohumları ile çoğaldığı, ancak tohumlar klasik yöntemlerle çimlenmeye alındığında, temel istekler yerine getirildiği halde sonucun olumsuz olduğu belirlenmiştir. *Centaurea tchihatcheffii*'yi *in vitro* koşullarda çimlendirmek ve buradan sürgün çoğaltımı yapmak amacıyla önceki yıllarda çalışan Özel (2002), çalışmasında enfeksiyon probleminin çok yaygın olarak görüldüğünü, bir seri yüzeysel sterilizasyon denemeleri kurduğunu, ancak sorunsuzca olgun tohumların çimlendirilmesi aşamasının gerçekleştirilemediğini belirtmektedir(30). Araştırmacı temiz kültür elde edilmesinde en iyi sonuçların %50 çamaşır suyunda 10 dakika veya %60'lık çamaşır suyu çözeltisini de 10, 20 ve 30 dakika uygulamalarında elde edildiğini bildirmektedir. Bununla birlikte bu uygulamalardan gelen kültürlerde, 13 gün + 4 C° de bırakılan ve karanlık inkübatörde 18 C° de bekletilen toplam

250 adet tohumdan yalnızca 1 tanesi 150 gün sonra *in vitro* koşullarda çimlendiği, oluşan bitkinin kök gelişiminin de anormal olduğu kaydedilmiştir. Bulaşma kontrol altına alınmış olmakla birlikte yüksek dozda sterilizant madde kullanımının canlı materyali olumsuz etkilediği ve çimlenmenin bu yüzde engellediği düşüncesi paylaşılmıştır. Bu nedenle çalışmalarında olgunlaşmamış tohumlara veya yeşil eksplantlara yönelen araştırmacı, bitkinin tohumdan zor çimlendiğini ifade etmektedir(30). Bizim çalışmamızda ise %15'lik ticari sodyumhipoklorit çözeltilisinde 20 dakika tutulan tohumlarda sorunsuzca kültür yapabilmek mümkün olmuştur. Çalışmamızda enfeksiyon, sorun yaratan bir faktör olarak ortaya çıkmamıştır. Bu durumun, tohum materyalinin alınması sırasında ve kurutularak saklanması sırasında yapılan işlemler ile alakalı olduğu, titiz ve sağlıklı materyalden alınan ve sağlıklı koşullarda kurutularak saklanan tohumlardaki enfeksiyon oranının çok düşük olacağı ve *in vitro* çimlendirmede sorun çıkartmayacağını söylemek mümkündür. Hormonsuz MS ortamında çimlenme oranının %60'a yakın olması, önceki yapılan çalışmalara göre çok olumlu bir sonuç olmakla birlikte, bu oranı artırmanın mümkün olabileceği düşünülmüş ve devam eden denemeler kurulmuştur.

Sentorya tohumlarında dormansi ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıda olmakla birlikte, soğukta katlama veya gibberellik asit ile yapılan uygulamaların olumlu etkileri(9,30,52), doku kültürü ortamına GA₃ katkısının çimlenmeyi teşvik edebileceğini işaret etmiştir. Nitekim denemenin 3. ekim aşamasında Kasım 2011'de yapılan uygulamada, hormonsuz MS ortamının yanında bir de içerisine 1 mg/L GA₃ ilave edilmiş ortamlar paralel olarak denenmiştir. GA₃'ün sentorya tohumlarının çimlenmesi üzerindeki etkisi çok yüksek düzeyde olmuştur. 8 haftanın sonunda kontrol ortamlarında %55.11 olarak belirlenen çimlenme oranı, GA₃ ilave edilen ortamlarda %87.64 olmuştur. Şekil 4.2'de üçüncü denemede GA₃ ilave edilen ortamlardan elde edilen sentorya fidelerinden örnekler gösterilmiştir. Bu sonuç, gerçekten de sentorya tohumlarında içsel bir embriyo dinlenmesinin olduğunu ve bunun GA₃ sayesinde kırılabileceğini göstermiştir. Nitekim Günöz (2008) tarafından yapılan çalışmada da 2005 yılındaki en yüksek tohum çimlenme oranları sırasıyla 100 ppm GA₃ (%31,11), 10 ppm GA₃ (%25,00) çözeltilerinde ve 24 saat suda (%18,33) bekletme uygulamalarından elde edildiği, bu sıralamanın 2006 yılı için de aynı (sırasıyla %35,00, %30,56 ve %29,44) olduğu belirtilmektedir(9). Bunun yanında katlama uygulamalarının da çok etkin olduğu en yüksek tohum çimlenme oranlarının (% 58,89) 5 ay katlanan tohumlarda belirlendiği, bunu 4 ay katlanan (% 42,78) ve 100 ppm GA₃ çözeltilisinde bekletilen (% 35,00) tohumların izlediği rapor edilmiştir. Çakırlar vd.

(2005), 9 ay süreyle bekletildikten sonra ekimi yapılan tohumlarda çimlenme oranının %90 olduğunu ve tohumlarda mutlak bir dormansinin bulunduğundan söz etmektedirler(52). Bizim çalışmamızda da gibberellik asit ilavesiyle çimlenme oranındaki iki kata yakın bir orandaki artış, tohum canlılığında bir sorun olmadığı fakat dormansi nedeniyle çimlenme oranının düşük olduğunu işaret etmektedir.

GA₃ dozlarındaki artışın çimlenmeyi olumsuz etkilediği yönünde bir çalışma, orkidelerde mevcuttur. Miyoshi and Mii (1995), *Calanthe discolor* orkide türünde çimlenme oranını artırmak amacıyla 0, 10, 100 ve 1000 mg/l GA₃ solüsyonunda bir gün boyunca daldırma yapıp tohumları bu işlemin ardından kültüre almışlar veya besin ortamına 1 ya da 10 mg/l GA₃ ilave etmişlerdir. 10 ve 100 mg/l GA₃'te daldırma uygulaması olumlu etki yapmamış, tam tersine engelleyici etki yapmıştır. 1000 mg/l GA₃'te daldırma ise çok ciddi engelleyici etki yapmıştır(123). Çalışmamızda 4 ve 5. ekimlerde bu iki uygulamaların birbirine yakın sonuçlar vermesi fakat birinde istatistiksel olarak farklı gruplarda, diğerinde aynı grupta yer almalarının nedeninin materyaldeki sayısal farklılıklar olabileceği öngörülmüştür. Daha yüksek sayılarla yapılacak tohum ekimlerinde bu iki uygulamanın birbirinden daha net bir biçimde ayrılacağı düşünülmektedir. Sonuç olarak dozun yükseltilmesinin çimlenmeyi daha fazla artırmayacağı ve %85 civarındaki çimlenme oranının *in vitro* koşullarda olgun sentorya çimlenmesinde elde edilebilecek iyi bir çimlenme olduğu yönünde görüş oluşmuştur.

Tohum dormansisi, tarımsal öneme sahip bitkiler için istenmeyen bir özellik olmakla birlikte hem kültür bitkileri hem de yabani ve endemik bitkiler için bir dereceye kadar avantaj sağlayan bir olay olarak dikkate alınmaktadır. Tohum dormansisi ile tohumların en uygun çevresel koşulların hakim olduğu bir dönemde çimlenmeleri sağlanır. Bireysel farklılıklara bağlı olarak, bir popülasyondaki tohumların dormansiden çıkması için gereken uyarının eşik değeri de farklı olabilmektedir. Böylece aynı popülasyondaki tohumlar, farklı zamanlarda dormansiden çıkarak çimlenmeye başlarlar. Bu strateji, dormansiden çıkan bir grup tohumun çimlenmesiyle oluşan genç bitkilerin, çevresel koşullarda meydana gelebilecek olumsuz değişimler sonucunda yok olmasına rağmen, diğer tohumların daha sonra çimlenmesiyle türün sağlıklı bir şekilde yayılımını ve devamını sağlar. Bu durumun en güzel örneği olarak, *Asteraceae* familyasında gözlenen tohum dimorfizmi gösterilmektedir(53,124,125). Tohumun dormansiden çıkması için belli bir sürenin geçmesi gerekmektedir, bu süre içerisinde muhtemelen embriyo gelişimi

tamamlanmaktadır. Özellikle dinlenme gereksinimi gösteren tohumlarda, embriyonun dinlenme ihtiyacının karşılanabilmesi için nemli ortamda katlama uygulamaları en çok kullanılan ve en iyi sonucu veren uygulama olarak önerilmektedir(126). Nitekim Günöz (2008) tarafından yapılan uygulamalarda da, özellikle 5 ay süre ile katlama ortamında tutulan tohumlardaki çimlenme oranları, diğer uygulamalara göre daha yüksek bulunmuştur(9).

Gibberellinlerin tohum çimlenmesini teşvik eden bir özellik taşıyan, bitki tarafından da sentezlenen doğal bir hormon oluşu bilinmektedir(127-129). Dışsal GA₃ uygulamaları tohumlardaki α-amilaz ve diğer hidrolitik enzimleri, bunların yanı sıra büyüme ve gelişme için gerekli olan proteinlerin sentezlerini artırarak çimlenmeyi olumlu etkilemektedir(130,131). Tohum çimlenmesi sırasında embriyoda sentezlenen hormon olan GA₃, çimlenme olayının başlayabilmesi için α-amilaz enziminin sentezini ve aktivitesini artırmakta ve böylece endospermdeki nişastayı şekere dönüştüren bu enzimin etkinliğini artırmaktadır. Endospermdeki besin depolarının embriyo tarafından kullanılabilmesi, bu enerjinin kullanılabilir forma dönüştürülmesini gerektirmektedir(132,133). Tohumda dormansinin en etkin oluşturucusu ABA engelleyici hormonunun etkisini ortadan kaldırarak çimlenmeyi uyardığı da gibberellinler hakkında uzun yıllardan beri bilinen bir mekanizmadır(128-130,134,135). Çevresel streslerin de yarattığı olumsuz etkileri telafi etmek amacıyla olumlu kullanımları olan gibberellinler, embriyo çıkışlarında destek sağlamaktadır. Nitekim Yalçın (2010) tarafından tuz stresi altındaki *Silene salsuginea* Hub. - Mor. bitkisinin tohumlarının çimlenmeleri üzerine gibberellik asit ve indol -3- asetik asit ön uygulamalarının tuz stresinin olumsuz etkilerini azaltıcı özelliklerini tespit etmek için yapılan çalışmada da 50 ve 100 ppm içeren çözeltilerde tohumları bekletme uygulaması çimlenmeye olumlu etki yapmış, aynı zamanda tuz stresini de azaltıcı etkide bulunmuştur(134). Bizim çalışmamızda da GA₃'ün dormansinin ortadan kaldırılmasında etkin bir hormon olduğu ancak kullanım dozunun artmasının çimlenmeyi olumsuz etkileyebilecek bir faktör olabileceği de gözlemlenmiştir.

En yüksek ortalama sürgün sayısı 1.alt kültürde elde edilmiş (5.44±0.45 adet sürgün/eksplant), 2 ve 3.alt kültürlerdeki sürgün sayısı bir miktar azalmıştır (4.22±0.56 ve 4.94±0.23 adet sürgün/eksplant). 1.0 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP içeren ortamlar, sürgün vermeye eğilimli olduğu kadar tek bir bitki olarak büyümeye de yönelen eksplantlara sahip olmuşlardır. IBA + BAP kombinasyonları, mikroçoğaltım çalışmalarında sıkça

kullanılmaktadır. Bizim çalışmamızda kullanılan doz aralıkları da daha önce bazı üzüm sürgün meyvelerde, tarhun(136) ve nanede(120) olumlu sonuçlar veren ve özellikle öne çıkan 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP kombinasyonu, bu türde de nisbeten olumlu sonuç vermiştir. Ancak oluşan sürgün sayısı, mikroçoğaltım çalışmaları için çok yeterli gelmediği gibi sürgün boylarındaki kısa yapı, dozlarda artış olduğunda camsılaşıma ve rozetleşme sorunlar, tatmin edici sonuçlar alınmasını engellemiştir.

Bitkisel dokulardan organ rejenerasyonunda sitokinin ve oksin grubu büyüme düzenleyiciler önemli düzeyde etki etmektedir. Bunların cins ve dozları önemli rol oynamaktadır. Sitokinin/oksin oranının yüksek olması sürgün oluşumunu, oksin/sitokinin oranının yüksek olması ise kök oluşumunu teşvik ettiği halde, bu oranların eşit olması kallus oluşumu veya bitkinin doğal gelişim seyrinde hareket etmesine neden olmaktadır(71,137). BAP, mikroçoğaltımda çok kullanılan ve olumlu sonuçlar verdiği bilinen bir sitokininidir. Genel olarak 0.5-2.0 mg/L dozları arasında kullanımı yaygındır. Yüksek dozlarda aksillar sürgün sayısının artacağı öngörülmektedir. IAA, bitkilerdeki doğal oksin olmasına rağmen stabilitesinin düşük olması nedeniyle çalışmalarda daha ziyade IBA veya NAA tercih edilmektedir. Bunların da sürgün çoğaltım çalışmalarında kullanım dozları genellikle 0.1-10.0 mg/L arasındadır(71,138,139). Doku kültürü çalışmalarında kullanılan büyüme düzenleyicilerin cinsi ve dozu, amaca göre değişmekte, mikroçoğaltım çalışmalarında genellikle yüksek sitokinin/düşük oksin dozları aksillar sürgün oluşumunda olumlu sonuçlar verebilmektedir. Sitokinin bazen tek başına kullanıldığında da yeterli olabilmektedir(72,140).

Bizim çalışmamızda da BAP'nin 1 mg/L kullanıldığı ortamlarda sürgün tomurcuğu çok fazla sayıda oluşmuş, ancak bunlar çok küçük olduklarından rozetleşme eğilimi ortaya çıkmıştır. Buna karşılık daha düşük oranda da olsa stabil ve sağlıklı sürgün gelişimi 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP içeren ortamlardan elde edilmiştir. Nitekim Karakullukçu vd (1992) de ahududu bitkisinin mikroçoğaltımı için aynı dozlardaki IBA ve BAP katkısını önermişlerdir(139). Tek başına BAP kullanımının sürgün oluşumunda yeterli olabileceği, Cellarova (1992)(141) ve Ellialtıoğlu vd (1998)(142) tarafından *Mentha* sp. türü için ifade edilmiş, 2 mg/L BAP kullanımı, yüksek oranda aksillar sürgün oluşumunu teşvik etmiştir. Bizim çalışmamızdaki 1 mg/L'lik BAP'nin tek başına kullanıldığı ortam da hem sürgün sayısı hem de kalitesi bakımından umutvar sonuçlar vermiştir.

GA₃'ün besin ortamlarına ilave edilmesi ve büyüme düzenleyici kombinasyonu içerisinde yer almasına ilişkin bir çalışma olan Prasad vd. (2004) tarafından *Cryptolepis buchanani*'nin in vitro çoğaltımı üzerinde yapılan çalışmada; sürgün ucu ve tek boğum eksplantları 2 mg/L BAP+ 0.1 mg/L kinetin + 0.05 mg/l NAA ve 0.05 mg/L GA₃ içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. Bu ortamda bitki en yüksek aksillar sürgün oluşumunu (%60) sergilemiştir(143).

Sentorya bitkisinin alt kültürlerinde sürgünlerde meydana gelen vitrifikasyonu ve rozet oluşumunu engelleyebilmek amacıyla besin ortamına GA₃ ilave edilmesi olumlu etki yapmıştır. Bu sayede rozet oluşumu azalmış ve değerlendirilebilir sürgün sayısı artmıştır. Vitrifikasyon (camsılaşma), bünyeye aşırı su alma ve zayıf lignifikasyon sonucunda ortaya çıkan deformasyon olarak tanımlanabilmektedir(144,145), BAP tarafından *Origanum vulgare*'nin doku kültüründe vitrifikasyonun indüklendiğini kaydetmiş, bunu önlemek amacıyla bazı protein hidralizatlar, maya ekstraktları, kazein gibi maddelerin etkilerini incelemişlerdir. Bu durumun fizyolojik bir sorun olmasından bahseden araştırmacılar, çalışmalarında balık protein hidrolizadlarının bir miktar önleyici etki yaptığını rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda vitrifikasyon, BAP'nin 1.0 mg/L dozda kullanıldığı ortamlarda ortaya çıkmıştır. Nitekim Gaspar (1991)(146), Paques (1991)(147), Arrebola ve Socorro (1997)(148), Pierik (1997)(144,149) de ortamdaki sitokin varlığı ve dozunun sürgünlerde vitrifikasyona neden olabileceğini bildirmişlerdir. Hücre blünmesinin aşırı uyarılması sonucunda yüksek dozlardaki sitokin, camsılaşmaya neden olabilmektedir(149). Nitekim Özel (2002) tarafından *Centauera tchihatcheffii* bitkisinin in vitro koşullarda çoğaltılması üzerinde yapılan çalışmada 0.5 mg/L BAP'ın tek başına veya 0.01 mg/L CPA ile birlikte kullanıldığı ortamlarda %100 oranında, 0.01 mg/L IAA ile birlikte kullanıldığı ortamlarda %83.3 oranında vitrifikasyon meydana gelmiştir(30). Araştırmacılar, vitrifikasyona neden olarak meristematik yaprakların besin ortamına değmesini ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda aynı türde özellikle 1.0 mg/L BAP içeren ortamlarda vitrifikasyon sorunu ile karşılaşılması, sitokine karşı yüksek duyarlılık gösteren bir tür olduğu izlenimini yaratmıştır. Aynı zamanda daha önceki çalışmalarımızda nane ve tarhun gibi(120,150) bitkilerde de yüksek BAP içeren ortamlarda benzer durumlarla karşılaşılması, otsu bitkilerde bu soruna karşı dikkatli olunması gerektiğini, agar oranı, büyüme düzenleyici dengesi, şeker oranı gibi konuların seçimi ve düzenlemesiyle bu

sorunun ortadan kaldırılabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada da besin ortamına ilave edilen 0.5-3.0 mg/L dozları arasındaki GA₃ ise, ortaya çıkan bu olumsuz fizyolojik bozulmayı azaltmaya ve etkinliğini ortadan kaldırmaya yeterli olmuştur. Her ne kadar vitrifikasyonun ortadan kaldırılmasında başka bazı uygulamalar(60,144) bulunmakta ise de bizim çalışmamızda asıl sorunun çok sayıda rozet şeklinde sürgünlerin oluşumu olması dolayısıyla, sürgün gelişimi sağlanınca vitrifikasyonun da buna bağlı olarak azaldığı sonucuna ulaşılmıştır. GA₃'ün hücre ve gövde uzaması üzerine etkisinin olduğu bilinen bir fizyolojik olaydır(127,151). McComb (1967)'un(151) yapmış olduğu çalışma bunu açıklayan örneklerden sadece bir tanesidir. Araştırmacı *Centaurium minus* Moench türünde vernalize olmamış ve bu yüzden rozet oluşturmuş bitkilerde, rozet oluşumunu ortadan kaldırmak ve sürgün uzamasını sağlamak için GA₃ uygulaması yapmıştır. Uygulamalar sadece sürgün uzamasını sağlamakla kalmamış, bitkilerin çiçeklenmesini de teşvik etmiştir.

Hormonsuz MS ortamında her iki alt kültürün ortalaması esasında değerlendirildiğinde %70.7'lik bir köklenme oranı elde edilmiştir. Bu oran besin ortamına 0.1 mg/L IBA ilave edildiğinde %81.6'ya, 1.0 mg/L IBA eklendiğinde ise %86.3'e çıkmıştır. IBA katkısı köklenme oranını artırmıştır. Nitekim oksin türevlerinin ve yoğunlukla kullanılan IBA'nın doku kültürü çalışmalarında köklenme aşamasında kullanıldığı genel doku kültürü bilgileri arasında yer almaktadır(144). Yalnızca doku kültürü için değil, IBA pek çok bitki türünde köklenme için kullanılan ve daldırma metodunda yer alan bir büyüme düzenleyicisidir(127). Hatta Özel (2002) tarafından yapılan çalışmada da sentorya sürgünleri *ex vitro* koşullarda serada köklendirmeye tabi tutulmuşlar ve 500 ppm IBA solüsyonunda 10 dk süreyle yapılan daldırma, köklenme bakımından en iyi sonucu vermiştir. Oksin uygulanmayan sürgünler köklenmemiştir. Araştırmacıların *in vitro* köklendirme çalışmaları ise olumlu sonuç vermemiştir. Sekiz hafta boyunca hormonsuz, 0.25, 0.50, 0.75 ve 1.0 mg/L IBA içeren ortamlarda bekletilen sürgünlerden sadece 6 adet sürgünde köklenme belirlenmiştir(30). *In vitro* koşullarda köklenmenin başarıyla sağlanan çalışmamızda, kullanılan IBA dozları çok yüksek seçilmemiştir. Bununla birlikte elde edilen köklenme oranı oldukça tatminkar bulunmuştur. Hormonsuz ortamlarda da köklenme oranı düşük değildir (%70.7). Aynı türde olsa bile farklı laboratuvarlarda veya bitkisel materyalle çalışma neticesinde, farklı sonuçlar alınabileceği doku kültürü çalışmaları için beklenebilecek bir durumdur. Mevsim farkı, başlangıç materyalinin farklı olması ve sürgünlerin geldiği alt kültürün sayısı, sürgünlerin hangi ortamda çoğaltılmış

olduğu gibi faktörlerin, köklenme aşaması üzerinde etkisi olduğu düşünölmüştür. Piatczak vd. (2005) hormon içermeyen MS ortamlarının köklenme için başarıyla kullanılabilceğinden bahsetmektedir(152). Gao vd. (2003) ise, farklı bitki türlerinde in vitro koşullarda köklenme olayının o bitkinin içsel hormon seviyelerine bağlı olduğunu ifade etmektedir(153).

Mackay ve Kitto (1988), *Artemisia* türlerinde köklenme için NAA veya IBA ilave edilen ortamların en yüksek % 0.6 oranında köklenme sağladığını ve bunun başarılı bulunduğunu bildirirken(154); Türközü (2010) ise yine tarhun bitkisinde, hormon içermeyen ½ MS ortamında %100 oranında köklenme elde etmiştir(150). Bu sonuçlar genel olarak otsu bitkilerde benzer uygulamaların yüksek oranlarda köklenme sağladığını, hormonsuz, kuvveti azaltılmış veya bir miktar oksin ilave edilmiş besin ortamlarının %70'in üzerinde köklenme sağlayabildiğini göstermektedir.

Dikilen eksplant sayısı esas alınarak hesaplanan gelişme oranları bakımından 100 mg/l kolhisin dozu 5 veya 7 gün süreyle uygulanması halinde kontrolden sonraki en yüksek gelişme oranlarını vermiş ve istatistiksel olarak aynı önemsiz farklılığa sahip grup içerisinde kalmıştır (%50-45). Kolhisin içeren ortamda tutma süresi arttıkça, gelişme miktarında azalma ortaya çıkmıştır. Genel bir değerlendirmeye 10 gün süreyle kolhisin içeren ortamda bekletilen eksplantların tümünün her iki uygulama dozunda da en düşük gelişme oranlarına sahip olduklarına söylemek mümkündür. Bu durumda eksplantlardan bitki elde etme kriteri esas alındığında 10 gün süreyle *in vitro* kolhisin uygulaması yapılmaması gerektiği söylenebilir. 150 mg/L kolhisin dozu da hem yaşama, hem de gelişme oranı üzerinde olumsuz etki yapmıştır. Ayrıca bu uygulamalardan gelen dokuların şekilsiz, bazal kısımlarında kallus içeren dokular olduğu gözlemlenmiştir.

Tepe vd. (2002) de, nane bitkisinde yaptıkları çalışmada benzer sonuçlar bulmuşlar, 5 ve 7 günlük 100 mg/L kolhisin uygulamasını tavsiye etmişlerdir. Ancak 150 mg/L kolhisin nanede bizim çalışmamızdaki kadar olumsuz etki yapmamış, az sayıda da olsa sağlıklı poliploid bitki elde edilmesine hizmet etmiştir(110). Bu sonuçlar, sentorya bitkisinin kolhisin uygulamalarına karşı oldukça duyarlı olduğu izlenimi yaratmıştır. *Mentha canadiensis* x *M. aquatica* türler arası melezlerinde meristem kültürü sırasında besin ortamına kolhisin ilave eden ve poliploid bitki elde etme konusunda çalışan Bugaenko vd. (1988), kolhisin içeren besin ortamında geçirilecek optimum sürenin yan tomurcuk

meristemleri için 1-4 gün, tepe tomurcuğu meristemi için 7-10 gün olduğunu; en etkili kolhisin konsantrasyonunun ise 100 mg/L olarak belirlendiğini, bu dozda %16.7 oranında poliploid bitki elde edilebildiğini bildirmektedirler(155).

Griesbach (1990), 100 mg/l kolhisin içeren ortamlarda 7 gün süre ile beklettiği *Anigozanthos* sürgün uçlarından tetraploid bitkiler elde etmiştir. Bizim çalışmamızda 7 gün süre uygulaması sürgün uçlarında iyi sonuç vermekle birlikte tek boğum eksplantlarında düşük bir poliploid elde etme oranı sağlayabilmiştir. Bu uygulama gelişme oranı bakımından yüksek değer vermesine karşın, bitkilerin sera koşullarına alıştırılması sırasında ve kış aylarında ısıtılmayan sera koşullarında bu uygulamaya ait bitkilerden kayıp daha fazla olmuştur. Bu nedenle bitkilerin daha iyi kontrollü koşullarda yetiştirilebilmesi halinde 7 gün uygulama süresinden de yüksek başarı ve poliploid bitki elde etme oranı sağlanabileceği varsayılmaktadır(107).

Kolhisin uygulamalarından gelen sürgünler in vitro koşullarda geliştirildikten sonra dış koşullara alıştırılmak üzere vermikulit içeren plastik kaplara alınarak tüm işlemler daha önce çoğaltma aşamasında yapılan işlemler gibi gerçekleştirilmiş olmasına karşın, bu bitkilerin gelişmeleri çok yavaş olmuş ve adaptasyon aşamasında başarı sağlanamayarak bitkiler 5 hafta içerisinde kaybedilmiştir. Bu uygulamaların yapıldığı mevsimin yaz aylarına denk gelmesi, iklim odası sıcaklıklarının yeteri kadar dengede tutulamamasına yol açmış ve dış koşullara alıştırma aşamasının seralarda sisleme ünitesinde yapılmasının ıslah materyali ve elit materyaller için çok önemli olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak araştırma bulgularımız; *Centaurea tchihatcheffii* sentorya türünde in vitro koşullarda besin ortamına 100 mg/L kolhisin ilave edildiğinde tek boğum eksplantlarının 5 veya 7 gün süreyle bu ortamda bekletildikten sonra taze ortamlara aktarılması yoluyla poliploid bitki elde etme konusunda başlangıç adımı atılabileceği yönünde bir görüş oluşmasına neden olmuştur.

Centaurea tchihatcheffii'nin in vitro koşullarda çoğaltımı yapılmış ve yapılacak ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere optimal koşullar belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçları şu şekilde özetlenebilir:

1. *Centaurea tchihatcheffii*'nin olgunlaşmış tohumları araziden dikkatlice toplanıp özenle kurutulduktan sonra bu tohumların kullanılmasıyla enfeksiyon bakımından önemli bir sorunla karşılaşılmaksızın, sadece birkaç damla Tween-20 ilave edilmiş %15'lik ticari sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) içinde 25 dakika bekletilmek suretiyle yüzeysel dezenfeksiyondan geçirilebilmekte ve kültürler başarıyla kurulabilmektedir.
2. *In vitro* tohum ekimlerinde pappus kısımları çıkarılmış tohumların kullanılması gerekmektedir. Bu uygulama yapılmadığı takdirde enfeksiyon oranı yükselmektedir.
3. MS+1 mg/L GA₃ ortamlarında %86 oranında tohum çimlenmesi elde edilmiştir. Gibberellik asit ilavesi, çimlenme oranını %60'lardan %80'li değerlere taşımıştır.
4. Mikroçoğaltım denemelerinde, bir-bir buçuk aylık *in vitro* fidelerden alınan tek boğum ve sürgün ucu eksplantları kullanılabilir. Eksplantların yatay değil, dikey pozisyonda besin ortamına yerleştirilmesi daha olumlu bulunmuştur.
5. Alt kültürlerde tek boğum eksplantlarının kullanılması daha uygun olmuştur. Sürgün uçları, 1.alt kültürden itibaren generatif gelişme yönünde eğilim gösterdiğinden bu materyalin etkin kullanımı söz konusu olmamıştır.
6. Sentorya eksplantlarından sürgün proliferasyonu sağlanmıştır. Sayıca oluşan sürgün sayısı 1.0 mg/L BAP içeren ortamlarda olsa da, 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP kombinasyonu, dengeli yapısı sayesinde eksplant başına 2.5 adet civarında sürgün oluşturmuştur. BAP dozu artınca 0.5 cm'nin altında çok sayıda ve vitrifiye olan sürgün oluşumu meydana gelmiş olup bu materyalin değerlendirilmesi mümkün görülmemiştir. 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP kombinasyonunda üçüncü alt kültürün sonunda ortalama eksplant başına 4.86 adet aksillar sürgün elde edilebileceği anlaşılmıştır.
7. IBA ve BAP ile birlikte GA₃ kullanımı, vitrifikasyonu azaltma ve sürgün gelişimi ile eksplant başına düşen değerlendirilebilir sürgün sayısını artırmıştır. 1.0 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L GA₃ içeren ortamda üç alt kültürün ortalaması olarak 7.91 adet/eksplant ve 0.5 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L GA₃ içeren ortamda üç alt kültürün ortalaması olarak 9.90 adet/eksplant sürgün elde edilebilmiştir.
8. Köklenme aşamasında hormonsuz MS ortamında %70 oranında köklenme meydana gelmiştir. Besin ortamına IBA ilave edilmesi, köklenme oranını artırmıştır. 0.1 mg/L IBA içeren ortamda %81, 1.0 mg/L IBA içeren ortamda %86 oranında köklenme meydana gelmiştir. Ancak doz arttığında sürgün boylarının kısaldığı ve

camsılaşmaya eğilim ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle düşük doz IBA uygulaması uygun bulunmuştur. Hormonsuz MS ortamlarında çiçek tomurcuğu oluşumuna eğilim %90 civarındaki materyalde ortaya çıkmıştır.

9. Dış koşullara alıştırma aşamasında vermikulit kullanımı, torf kullanımına göre daha olumlu bulunmuştur ve %97 oranında canlılık sağlanmıştır.
10. *Centaurea tchihatcheffii* sentorya türünde *in vitro* koşullarda besin ortamına 100 mg/L kolhisin ilave edildiğinde tek boğum eksplantlarının 5 veya 7 gün süreyle bu ortamda bekletildikten sonra taze ortamlara aktarılması yoluyla poliploid bitki elde etme konusunda başlangıç adımı atılabileceği yönünde bilgilere ulaşılmıştır.
11. Doku kültürü çalışmalarının *in vitro* aşamasında elde edilecek başarının tek başına yeterli olmadığı, bitkilerin dış koşullara alıştırılması aşamasında teknik altyapının mutlaka kurulması gerektiği, teknolojiadaki yetersizliklerin uzun çalışmalar ve emekler sonunda elde edilecek ışlah materyalinin kaybına neden olabileceği gözlenmiştir.
12. Poliploidi çalışmalarının sadece *in vitro* koşullarda değil, tohum ve sürgün ucu gibi organlara doğal yetiştirme ortamlarında da uygulanmasının denemesi yararlı olabilecektir.
13. *Centaurea tchihatcheffii*'nin sürgün ucu ve tek boğum eksplantıyla çoğaltılması başarıyla gerçekteştirilmiş, fizyolojik ve ışlah çalışmalarında kullanılabilecek bir sistem olarak değerlendirilebilir aşamaya ulaştırılmıştır.

Sonuçları sunulan bu çalışma ile *in vitro* koşullarda endemik *Centaurea tchihatcheffii* türünün çoğaltımı için koşullar optimize edilmiş görünmektedir. Bundan sonraki çalışmalarda poliploidi ve diğer mutasyon uygulamaları için temel çoğaltım ve elit bitki üretme aşamaları için zemini hazırlanmış bulunmaktadır. Bu türde ve benzeri olan tehlike altında bulunan endemik bitkilerin çoğaltılması ve üzerlerinde yapılacak ışlah çalışmalarıyla süs bitkileri ve tıbbi bitkiler sektöründe değerlendirilebilecek yeni çeşitler geliştirilmesi, ülkemiz bilimi ve yetiştiriciliğine katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Kışlalıoğlu M, Berkes F. Biyolojik Çeşitlilik *Türkiye Çevre Sorunları Vakfı Yayını*. 1987(122).
2. Kocataş A. *Ekoloji ve Çevre Biyolojisi*. Ege Üniversitesi Fen Fak Matbaası, Bornova/İzmir; 1992(142)564.
3. Işık K. Biyoçeşitlilik. *TÜBİTAK Bilim ve Teknik*. 1997;30 (350):84-88.
4. Türkiye Çevre Vakfı. Ansiklopedik Çevre Sözlüğü *TÇV* 2001;Yayın No(142):407
5. *Türkiye Tabiatını Koruma Derneği. Biyolojik çeşitlilik ve Çevre Koruma Rehberi*(Editör: Serap Kaynak). Ankara: TTKD ve UNDP; 2001, 138s.
6. Çepel N. Ekolojik Sorunlar ve Çözümleri *TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları*. 2003;Ankara(180):183.
7. Işık K. Biyoçeşitlilik *TÜBİTAK Bilim ve Teknik*. 1997;30(350):84-88.
8. Çolak AH. Ormanda Doğa Koruma (Koruma-Prensipiler-Stratejiler-Önlemler). *Milli Parklar ve Av-Yaban Hayatı Genel Müdürlüğü Yayını, Ankara*. 2001:354.
9. Günöz A. Gölbaşı'nda endemik *Centaurea tchihatcheffii* Fish. & Mey. (Sevgi çiçeği) tohumlarının çimlenmesi üzerine araştırmalar. *Ank. Ün. Fen bilimleri enstitüsü, Yüksek lisans tezi, Ankara*. 2008:3.
10. Erik S, Tarıkahya B. Türkiye Florası Üzerine. *Kebikeç*. 2004;17:139-163.
11. Ekim T, Koyuncu M, Vural M, Duman H, Aytaç Z, Adıgüzel N. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler)(Red Data Book of Turkish Plants)(Pteridophyta and Spermatophyta). *Türkiye Tabiatını Koruma Derneği ve Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Yayını, Ankara*. 2000:221-246
12. Güner A, Özhatay E, Ekim T, Başer HKC. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. *Edinburg Univ. Press*. 2000;XI:656.
13. Avcı M. Çeşitlilik ve endemizm açısından Türkiye'nin bitki örtüsü. *İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Bölümü, Coğrafya Dergisi, İstanbul*. 2005;13 27-55.
14. Atalay İ. Türkiye Vegetasyon Coğrafyası. *Ege Üniversitesi Basımevi*. 1994.

15. Kurt S, Erdag B. In vitro germination and axillary shoot propagation of *Centaurea zeybekii* *Biologia-Section Botany*. 2009;64(1):97-101.
16. Boşgelmez A, Boşgelmez İİ, Savcı AE, et al. *Biyolojik çeşitlilik. 1. Bölüm, 1-130. (Editör: A. Boşgelmez), Centaurea Tchihatcheffii, Ankara-Gölbaşı Sevgi Çiçeği. Bizim Büro Basımevi-Ankara 2005a.*
17. Wagenitz G. *Centaurea* L. In: Davis, P.H. (Ed.): *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol 5,1975:465-585.
18. Boşgelmez A. *Centaurea tchihatcheffii*, Ankara-Gölbaşı Sevgi Çiçeği(Editor:Boşgelmez, A). Bizim Büro Basımevi-Ankara; 2005:570.
19. IUCN. *Red List Categories: Version 3.1. Prepared by ICUN Species Survival Commission, ICUN Gland Switzerland and Cambridge, UK.;2001.*
20. Vural M, Adıgüzel N. Yanardönerler ağaçlara karşı *Yeşil Atlas* 2001;4:125.
21. Arif R, Kúpeli E, Ergun F. The biological activity of *Centaurea* L. species. *Gazi University Journal of Science*. 2004;17(4):149-164.
22. Fay MF. In what situations is in vitro culture appropriate to plant conservations? *Biodiversity & Conservation*. 1994;3(2):176-183.
23. Krogstrup P, Badursson S, J.V N. Ex situ genetic conversation by use of tissue culture. *Opera Bot*. 1992;113:49-53.
24. Ashton PS. Biological considerations in in situ vs ex situ conversation.-In: Bramwell, D., Hamann, O., Heywood, V.&Synge, H. (eds), *Botanic Gardens and The World Conversation Strategy*. Academic Pres; 1987:117-129.
25. Maunder M. Plant reintroduction: an overview. *Biodiver. Conserv.* . 1992;1:51-61.
26. Boşgelmez A. Gölbaşı Mogan Gölü, Andezit Taşı, *Centaurea tchihatcheffii* In: Boşgelmez A, ed: Bizim Büro Basımevi-Ankara 2006:795.
27. Okay Y, Demir K. Critically endangered endemic *Centaurea tchihatcheffii* Fisch. And Mey. And its propagation possibilities. *African Journal of Agricultural Research*. 2010;5(25):3536-3541.
28. Cuenca S, Amo-Marco JB. In vitro propagation of *Centaurea spachii* from inflorescence stems. *Plant Growth Regul*. 2000;30:99-103.
29. Perica M. In vitro propagation of *Centaurea rupestris* L. . *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 2003;45(2):127-130.

30. Özel ÇA. *Centaurea tchihatcheffii*'nin *In Vitro* Çoğaltımı Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara; 2002.
31. Tıpırdamaz R, Özkum D, Özbek N, Ellialtıoğlu Ş. *Centaurea tchihatcheffii* Fisch. et Mey.'in doku kültürü yoluyla üretimi üzerinde araştırmalar. 569-579. (Editör: A. Boşgelmez), Gölbaşı Mogan Gölü, Andezit Taşı, *Centaurea tchihatcheffii* Bizim Büro Basımevi-Ankara 2006:795
32. Erik S, Mutlu B, Topaloğlu S, B T, Aldemir A. *Centaurea tchihatcheffii*'nin tarihçesi, Türkiye florasındaki yeri, yayılış alanları, taksonomik özellikleri ve diğer bitkiler ile olan birlikteliği. 3. Bölüm 179-258. *Centaurea tchihatcheffii*, Ankara-Gölbaşı Sevgi Çiçeği. . Bizim Büro Basımevi-Ankara 2005:570.
33. Seçmen O, Gemici Y, Gork G, Bekat L. Tohumlu Bitkiler Sistematığı *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir. 1995.*
34. Baytop T. Türkiye' de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün) *İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi. 1999:314.*
35. Erol MK, Tuzlacı E. Plants used in folk medicine in the region of Eğirdir(Isparta) 'XI.th meeting on plan drug active constituents' In: Coşkun M, ed. Ankara University Pharmacy Faculty Ankara Üniversitesi Basımevi; 1997:466-475.
36. Chucla MT, Lamela M, Gato A, Cadavid I. *Centaurea corcubionensis*: A study of its hypoglycemic activity in rats. *Planta Med.* . 1988:107-109.
37. Talhouk RS, El-Jouni W, Baalbaki R, Gali-Muhtasib H, Kogan J, Talhouk AN. Anti-inflammatory bioactivities in water extract of *Centaurea ainetensis* *J. Med. Plants Res.* 2008;2:24-33.
38. Koca U, Özçelik B. Antiviral, Antibacterial, and Antifungal Activities of *Centaurea tchihatcheffii* Extracts *Turk J. Pharm. Sci.* 2009;6(2):125-134.
39. Tan K, Vural M. *Centaurea tchihatcheffii* Fischer & C.A. Meyer (Asteraceae) *Plant Systematics and Evolution.* 2007;263 203-207.
40. Martin E, Dinc M, Duran A. Karyomorphological study of eight *Centaurea* L. taxa (Asteraceae) from Turkey *Tur. J. Bot.* 2009; 33(2):97-104.
41. Gömürgen AN, Doğan C, Özmen E, Aytaç Z. Chromosome number, karyotype and pollen morphology of the rare endemic *Centaurea goeksunensis*. *Nordic Journal of Botany.* 2009;27(2):120-124.
42. Gömürgen AN, Adigüzel N. Chromosome numbers and karyotype analysis of *Centaurea tchihatcheffii* Fischer & Meyer (Compositae, Cardueae). *Ot Sistematik Botanik Dergisi* 2001;8:83-86.

43. Baytop T. *Centaurea*'nın tıbbi bitki özelliği. *Türkiye Bitkileri ile Tedavi. İstanbul Üniv. Eczacılık Fak. Yayınları*. 1984:354.
44. Rusak G, Krajacic M, Slade D. Inhibition of tomato bushy stunt virus infection using a quercetagenin flavonoid isolated from *Centaurea rupestris* L. *Antiviral Research*. 1997;36:125-129.
45. Rusak G, Robinson N, Pepeljnjak S. Antibacterial and antifungal activity of extracts and quercetagenin derivate isolated from *Centaurea rupestris* L. (Asteraceae) *Acta Biologica Cracoviensa Series Botanica*. 2002; 44:169-174.
46. Altıntaş A, Köse YB, Yücel E, Demirci B, Başer KHC. Composition of the essential oil of *Centaurea dichroa* *Chemistry of Natural Compounds*. 2004;40(6):604-605.
47. Zengin G, Çakmak YS, Güler GÖ, Aktumsek A. In vitro antioxidant capacities and fatty acid compositions of three *Centaurea* species collected from Anatolia region of Turkey Issue. *Food and Chemical Toxicology* 2010;48(10):2638-2641.
48. Ekim T. *Centaurea tchihatcheffii* Fisch. & Mey *The Karaca Arboretum Magazine* 1994;II(3):137.
49. Boşgelmez A, Boşgelmez İİ, Savcı AE, et al. Ankara-Gölbaşı ve *Centaurea tchihatcheffii*. 2. Bölüm, 131-178. In: Boşgelmez A, ed. *Centaurea tchihatcheffii Ankara-Gölbaşı Sevgi Çiçeği*. Bizim Büro Basımevi-Ankara2005b:570.
50. VİKİPEDİ. Sevgi çiçeği. 18.04.2014; http://tr.wikipedia.org/wiki/Sevgi_%C3%A7i%C3%A7e%C4%9Fi.
51. WIKIPEDIA. *Centaurea tchihatcheffii*. 18.04.2014; http://en.wikipedia.org/wiki/Centaurea_tchihatcheffii.
52. Çakırlar H, Çiçek N, Doğru A. *Centaurea tchihatcheffii* Fisch. et Mey.'in çimlenme fizyolojisi. 7. Bölüm, 309-324. In: Boşgelmez A, ed. *Centaurea Tchihatcheffii, Ankara-Gölbaşı Sevgi Çiçeği*. Bizim Büro Basımevi-Ankara 2005b:570.
53. Çakırlar H, Çiçek N, Doğru A. *Centaurea tchihatcheffii* Fisch. et Mey. (Gölbaşı Sevgi Çiçeği)'nin Anatomik ve Çimlenme Özellikleri In: Boşgelmez A, ed. *Gölbaşı Mogan Gölü, Andezit Taşı, Centaurea Tchihatcheffii*. Bizim Büro Basımevi-Ankara 795 s.,2006:545-567
54. Okay Y, Günöz A. Gölbaşı'na endemik *Centaurea tchihatcheffii* Fish. Et Mey. Tohumlarının çimlenmesi üzerine bazı uygulamaların etkisi *Tarım Bilimleri Dergisi* 2009;15(2):119-126.
55. Schütz W. Primary dormancy and annual dormancy cycles in seeds of six temperate wetland sedges *Aquatic Botany* 1997;59:75-85.

56. Taiz L, E Z. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, 1998:792.
57. Mansuroğlu S, Gürel E. Mikroçoğaltım, Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları In: Babaoğlu M, Gürel, E., Özcan, S., ed. S. Ü. Vakfı Yayınları, Konya, 2001:262-281.
58. Babaoğlu M, Yorgancılar M, Akbudak MA. Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri, Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları In: Babaoğlu M, Gürel, E. ve Özcan, S., ed. S. Ü. Vakfı Yayınları, , Konya, s. 2001:262-281.
59. Hartman HT, Kester DE. *Plant Propagation-Principels and Practices*. . Prentice-Hall. Inc., New Jersey.1975.
60. Debergh PC, Read PE. Micropropagation, Micropropagation Technology and Application. In: Debergh PCAZ, R. H., ed. Kulwer Academic Publishers, Dordrec, Hollanda,1983:1-15.
61. Huang MC, Chu CY. A scheme for commercial multiplication of gerbera (*Gerbera hybrida* Hort.) through shoot tip culture *Hort. Abst* 1987;57(5):374.
62. Mariska I, Gati E, Sukmadjaja D. In vitro clonal propagation of gerbera *Plant Breeding Abst*. 1991;61(4):499.
63. Chu CY, Huang MC. In vitro formation of gerbera (*Gerbera hybrida* Hort.) plantlets through excised space culture *Hort. Abst* 1983;53 (11):779.
64. Schwenkel HG, Grunewaldt J. In vitro propagation of *Cyclamen persicum* Mill. *Acta Hort*. 1998;226(2):659-663.
65. Pierik RLM, Voorst A, Booy G, Acker CAM, Lelivelt CLC, Wit JC. Vegetative propagation of *Alstroemeria* hybrids in vitro. *Acta Hort*. 1998; 226(1):81-91.
66. Nakano M, Mimi Y, Kobayashi D, Wtanabe A. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of hybrid tuberous begonia (*Begonia x tuberhybrida* Voss.). *Sci. Hort*. 1999;79(3-4):245-251.
67. Pelkonnen VP, Kauppi A. The effect of light and auxins on the regeneration of lily (*Lilium regale* Will.) cells by somatic embriyogenesis and organogenesis. *Int. J. Plant Sci*. 1999;160(3):483-490.
68. Tıprıdamaz R, Ellialtıoğlu Ş, Çakırlar H. Kardelenin (*Galanthus ikariae* Baker.) doku kültürü yoluyla çoğlatımı; eksplant tipi, ortam pH'sı ve karbonhidrat kaynağının soğancılık oluşumuna etkisi. *Tr. J. Agr. For*. 1999(23):823-830.

69. Çakırlar H, Tıprıdamaz R, Özkum D, Çiçek N. İn Vitro Üretilen (Kardelen)*Galanthus elwesii* Hooker Fil. ve *G. ikariae* Baker. Soğancıklarının Köklendirilmesi ve Dış Koşullarda Geliştirilmesi. DPT 97 K 121270 No'lu Proje, Temmuz. 2000:46.
70. Tıprıdamaz R. Rooting and acclimatization of in vitro micropropagated snowdrop (*Galanthus ikariae* Baker.) bulblets. *Akdeniz Ün.v, Ziraat Fak. Dergisi* 2003;16(2):121-126.
71. Werbrouck SPO, Debergh PC. Applied aspects of plant regeneration (micropropagation) In: Dixon RA, Gonzales RA, eds. *Plant Cell Culture - A Pratical Approach*. Oxford Uni. Press., New York,1994:127-135.
72. Bhojwani SS, Razdan MK. *Plant Tissue Culture: Theory and Pratic*. Amsterdam, Elsevier.1983.
73. Scholten HJ, Pierik RLM. Agar as gelling agent. Differential biological effects in vitro. *Scientia Horticulturae*. 1998;77(1-2):109-116.
74. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid grovvth and bioassays with tobacco tissue cultures *Physiol. Plantarum* 1962;15:473-497.
75. Preece JE, Sutter EG. Acclimatization of micropropagated plants to the green house and field In: Derbergh PC, Zimmerman RH, eds. *Micropropagation Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1993:71-95.
76. Hammat N, Evans PK. The in vitro propagation of an endangered species: *Centaurea junoniana* Svent. (Compositae). *J. of Hort. Sci.* . 1985;60(1):93-97.
77. Takashi J, Daisuke A. Micropropagationuofj *Centaurea macrocephala* Pushk. Ex. Willd. by shoot axis splitting. *Hort Sci*. 1997;32(6):1124-1125.
78. Cuenca S, Amo-Marco JB, Parra R. Micropropagation from inflorescence stems of the Spanish endemic plant *Centaurea paui* Loscos ex. VVillk. (Compositae). *Plant Celi Rep* 1998;18:674-679.
79. Özel ÇA, Khawar KM, Mirıcı S, Arslan O, Özcan S. Induction of *ex vitro* adventitious roots and soft wood cuttings of *Centaurea tchihatcheffii* Fisch. et Mey. Using Indole 3-Butyric and α -Naphthalene acetic acid. *International Journal of Agriculture & Biology*. 2006b;8 (1):66-69.
80. Özel ÇA, Khawar KM, Mirıcı S, Arslan O, Özcan S. Factors affecting in vitro plant regeneration of the critically endangered Mediterranean knapweed (*Centaurea tchihatcheffii* Fisch et. Mey). *Naturwissenschaften* 2006a;93:511-517.
81. Hosoki T, Kimura D. Micropropagation of *Centaurea macrocephala* Pushk. ex Willd. by shoot-axis splitting. *Horticultural Science*. 1997;32(6):1124-1125.

82. Pevalek-Kozlina B. In vitro propagation of *Centaurea ragusina* L., A Croatian endemic species. *Acta biologica cracoviensia Series botanica (0001-5296)*. 1998;40:21-24.
83. Mallon R, Rodriguez-Oubina J, Luz Gonzalez M. Shoot regeneration from in vitro-derived leaf and root explants of *Centaurea ultreiae*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2011;11:9934-9936.
84. Yüzbaşıoğlu E, Dalyan E, Bona M, Öz G. In vitro propagation of endemic plant *Centaurea arifolia* Boiss. *Taxa. IUFS J Biol*. 2012;72(2):121-127.
85. Sakr SS, Badawy EM, Morsi HA, El-Bahr MK, Taha HS. Regeneration of chamomile plant (*Chamomilla recutita*, L.) *Bull. Fac. Agric., Univ. Cairo* 1991;42(2):1461-1483.
86. Trejgell A, Bednarek M, Tretyn A. Micropropagation of *Carlina acaulis* L. *Acta Biologica Cracoviensia series Botanica* 2009;51(1):97-103.
87. Lauzer D, Vieth J. Micropropagation of seed derived plants of *Cynara scolymus* L. cv. 'Green Globe.' *Plant Cell Tiss. Org. Cult* 1992;21(3): 237-244.
88. Cenkci S, Temel M, Kargıoğlu M, Dayan S. Propagation of endangered *Thermopsis turcica* Kit Tan, Vural & Küçüködük using conventional and in vitro techniques *Turk J. Biol*. 2009;33 327-333.
89. Conchou O, Nichterlein K, Vömel A. Shoot tip culture of *Arnica montana* for micropropagation. *Planta Med. Feb*. 1992;58:73-76.
90. Estrella JE, Lazart JE. In vitro propagation of jicama (*Polymnia sonchifolius* Poepp. and Endlicher): A neglected Andean crop *HortScience*. 1994;29: 331.
91. Geslot A, Connault C, Merlin G, El-Maataoui M, Neville P. In vitro multiplication of *Mentha*, combining apex culture and microcuttings. *Bulletin de la Soc. Botanique de France. Letters Botaniques*. 1989;136 (1):31-38.
92. Türker A, U, Yücesan B, Gürel E. Adventitious shoot regeneration from stem internode explants of *Verbena officinalis* L. a medicinal plant *Turk J. Biol*. 2010;34:297-304.
93. Zeven AC. Polyploidy and plant domestication : The origin and survival of polyploids in cytotype mixtures. In: Lewis W, ed. *Polyploidy : Biological relevance*. Plenum, New York.1980:385-407.
94. Sullivan BP, Pfahler PL. Diploid-tetraploid comparisons in Rye, III. Temperature effects on seedling development *Crop Sci*. 1986;26:795-799.

95. Schwanitz F. The origin of Cultivated Plants, Cambridge , Massachusetts, Harvard University Press. 1966.
96. Mukherjee KK. A comparative study of two cytotypes of *Chenopodium album* in West Bengal , India. *Can.J.Bot.* 1986;64:754-759.
97. Hömmö L, Valanne T. Cytological and morphological analyses of grafted triploid aspens (*Populus tremula* L.) from Nonabel Javri area in Finnish Lapland. *Rep. Kevo Subarctic res. Stat.* 1987;20:21-25.
98. İlarıslan İH. Diploid ve Tetraploid avdar (*Secale cereale* L.) Bitkisinin Morfolojik, Sitolojik ve Palinolojik Yapılarının Karşılaştırılması [Doktora tezi]. Ankara, Ankara Üniv. Fen Bil. Enst. 92 s.; 1990.
99. Molin WT, Meyers SP, Baer GR, Schrader LE. Ploidy effects in isogenic populations of Alfalfa II. Photosynthesis , chloroplast number, ribolose -1,5-bisphosphate carboxylase, chlorophyll, and DNA in protoplasts *Plant Physiol.* 1982;70:1710-1714.
100. Hepaksoy S, Güven A. Bazı Buğday türlerinde içsel IAA ve ABA içerikleri ile ploidi düzeyi arasındaki ilişkiler. VIII. Ulusal Biyoloji Kongresi; 1984; İzmir.
101. Elçi Ş, Sancak C. Sitogenetikte araştırma yöntemleri ve gözlemler Ankara: Ank. Üni. Yayınevi. Yayın No: 386-4; 2013.
102. Sancak C. Kamışsı Yumak (*Festuca arundinacea* Schreb.) ve Çok Yıllık Çim (*Lolium perenne* L.)'in Doğal Kısır Melezinden Poliploid Bitkiler Elde Edilmesi. Ankara: Ankara Üniv. Fen Bil. Enst. Tarla Bitkileri A.B.D., Ankara Üniversitesi; 1994.
103. Schwanitz F. Die Entstehung der Kulturpflanzen. Berlin: Springer Verlag 1944:151.
104. Brewbaker JL. Angewandte Genetik. Stuttgart: Gustav Verlag; 1967:149.
105. Demir İ. *Genel Bitki Islahı*: Ege Üniv. Ziraat Fak. Yayınları, 212; 1975:263-269.
106. Şehirali S, Yazgan M. *Bitki Islahı* Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları: 971, Ofset Basım Ders Notu: 20; 1986:176-186.
107. Griesbach RJ. A fertile tetraploid Anigozanthos hybrid produced by in vitro colchicine treatment *Hort. Sci* 1990;25(7):802-803.
108. Rose JB, Tobutt KR. Induction of tetraploids for breeding hardy ornamentals. Paper presented at: 4th Int. Symp. on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, 2-7 July, 2000; Tampere-Finland, pp:12.

109. Vainöla A, Repo T. Polyploidisation of *Rhododendron* cultivars in vitro and how it affects cold hardiness Paper presented at: 4th Int. Symp. on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, 2-7 July, 2000; Tampere-Finland, pp:99.
110. Tepe Ş, Ellialtıoğlu Ş, Yenice N, Tıprıdamaz R. *In vitro* Kolhisin uygulaması ile poliploid Nane (*Mentha longifolia* L.) bitkilerinin elde edilmesi, Obtaning polyploid Mint (*Mentha longifolia* L.) Plants with in vitro colchicine treatment. *Journal of the faculty of agriculture, Akdeniz University*. 2002;15(2):63-69.
111. Zhang Z, Dai H, Xiao M, Liu X. *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. . *Euphytica*. 2008;159(1):59-65.
112. Otto SP, Whitton J. Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics* 2000;34:401-437.
113. Thao NTP, Ureshino K, Miyajima I, Ozaki Y, Okubo H. Induction of tetraploids in ornamental Alocasia through colchicine and oryzalin treatments *Plant cell tissue an organ culture* 2002;72(1):19-25.
114. Peterson KK, Hagberg P, Kristionsen K. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis* *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2003;73(2):137-146.
115. Shao J, Chen C, Deng X. In vitro induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*) *Plant cell tissue and organ culture* 2003;75(32):41-246.
116. Adams KL, Wendel JF. Polyploidy and genome evolutionin plants *Current Opinion in Plant Biology*. 2005;8(2):135-141.
117. Hamill SD, Smith MK, Dodd WA. *In vitro* induction of Banana Autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. . *Australian Journal of Botany*. 1992;40(6):887-896.
118. Adaniya S, Shirai D. In vitro induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability *Japan Scientia Horticulturae*. 2001.
119. Honghe W, Xin G, Oijiang X. In vitro induction of polyploid plants from colchicine treated *Sinningia speciosa*. *Journal of tropical and subtropical botany*. 1999;03.
120. Tepe Ş. *Nanede (Mentha longifolia L.) in vitro kolhisin uygulaması ile poliploid bitki elde edilmesi* [Yüksek Lisans Tezi], Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 69 s.; 2001.
121. Hong N, Hou J, Li ZH. *Statistica for Windows statistic and graph analysis* Tsinghua University Press, Beijing2002.

122. Sokal R, Rohlf FJ. Biometry, the Principles and Practice of Statistics in biological Research. In: Freeman WH, Co, eds. Third ed. New york, USA, 1995:887
123. Miyoshi K, Mii M. Phytohormonal pre-treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in asymbiotic culture. *Scientia Horticulturae* 1995;63:263-267.
124. Backman K. Evolutionary genetics and the genetic control of morphogenesis in flowering plants *Evolutionary Biology* 1983;16:157-208.
125. Larson L, Kiemnec G. Differential germination by dimorphic achenes of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis* L.) under water stress. *Journal of Arid Environments*. 1997;37:107-114.
126. Yılmaz M. *Modern Bahçe Bitkileri Yetiştirme Tekniği*. Çukurova Üniversitesi Basımevi. Adana. 151 s. 1992.
127. Ağaoğlu YS, Çelik H, Çelik M, et al. *Genel Bahçe Bitkileri Kitabı*. Ankara: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. Yayın no:1579; 1995.
128. Karssen CM. Hormonal regulation of seed development, dormancy and germination studied by generic control In: Kigel J, Golili G, eds. *Seed Development and Germination*. New York 1995.
129. Sharma AD, Thakur M, Rana M, Singh K. Effect of plant growth hormones and abiotic stresses on germination, growth and phosphatase activities in *Sorghum bicolor* (L.) moench seeds. *Africa Journal of Biotechnology* 2004;3(6):308-312.
130. Jacobsen JV, Chandler PM. Giberellin and abscisic acid in germinating cereals. In: Davies PJ, ed. *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*, 1987:164-193.
131. Fincher GB. Molecular and cellular biology association with endosperm mobilization in germination cereal grains *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 1989;40:305-346.
132. Chrispeels MJ, Warner JE. Giberellic acid-enhanced synthesis and release of α -amylase and ribonuclease by isolated barley aleurone layers. *Plant Physiol* 1967;42:398-406.
133. Bialecka B, Kepczynski J. Regulation of α -amylase in *Amaranthus caudatus* seeds by methyl jasmonate, giberellin A3, benzyladenine and ethylene. *Plant Growth Regulation*. 2003;39:51-56.
134. Yalçın OF. Tuz stresi altındaki *Silene salsuginea* Hub-Mor. Tohumlarının çimlenmesi üzerine gibberellik asit ve iaa (indol-3-asetik asit)'in etkilerinin

- araştırılması [Yüksek Lisans Tezi]. Konya, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı , 56 s; 2010.
135. Kenar S. Investigation of Jasmonic Acid-Gibberellic Acid Interaction on in vitro Microtuberization of Potato (*Solanum tuberosum L.*) [Yüksek Lisans Tezi]. Ankara, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı; 2013.
 136. Ağaoğlu YS, Karakullukçu (Ellialtıoğlu) Ş, Abak K. Frenk üzümü (*Ribes sativum L.*) ve Bektaşı üzümü (*Ribes-uva-crispa L.*) türlerinde doku kültürüyle çoğaltma üzerinde araştırmalar. I. İlk gelişme ve sürgün oluşturma aşaması. *DOĞA Tarım ve Ormanlık Dergisi*. 1992;17(2)(2): 423-432.
 137. Ellialtıoğlu Ş. Bitki doku kültürü ders notları Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı. Ankara.2012.
 138. Skoog F, Miller CO. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro *Symp. Soc. Exp. Biol* 1957;11:118-130.
 139. Karakullukçu Ş, Ağaoğlu YS, Abak K. Effects of Different Auxin-Cytokinin Combinations on in vitro Propagation of Raspberry cv. Schönemann. Paper presented at: XXIII. Int. Horticultural Congress, 27 August - 1 September 1990/1993; Firenze-Italy, Abstracts of Contributed Papers I. Oral, pp:126,.
 140. Özkum D. *Kekik (Origanum minutiflorum) ve Adaçayı (sideritis stricta)'nın doku kültürü yoluyla çoğaltımı üzerinde araştırmalar* [Doktora tezi], Hacettepe Üniversitesi biyoloji anabilimdalı . 95 s.; 2006.
 141. Cellárová E. Micropropagation *Mentha L.*, Biotechnology in Agriculture And Forestry 19, . In: Bajaj YPS, ed. *High Tech. and Micropropagation II*: Springer-Verlag,; 1992:262-276.
 142. Ellialtıoğlu S, Özcan S, Demir K, Tepe S. Nanenin (*Mentha sp.*) Doku Kültürü ile Çoğaltma Olanakları,. Paper presented at: III. Ulusal Biyoteknoloji Simpozyumu, Biyoteknolojide Üniversite-Sanayi işbirliği, 23-24 Ekim1998; Eskisehir.
 143. Prasad PJN, Chakradhar T, Pullaiah T. Micropropagation of *Cryptolepis buchanani Roem. & Schult, Taiwania*. 2004;49(1):57-65.
 144. Pierik RLM. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Fourth Edition ed. Netherlands,; Kluwer Academic Publishers,; 1997:213-220 p.
 145. Eguchi Y, Milazzo MC, Veno K, Shetty K. Partial improvement of vitrification and acclimation of oregano (*Origanum vulgare L.*) tissue cultures by fish protein hydrolysates. *Journal of Herbs Species and Medicinal Plants* 1994;6(4):29-38.

146. Gaspar T. Vitrification in micropropagation. In: Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in agriculture and Forestry, High Tec. And Micropropagation I*. Vol 17. Berlin, Heidelberg,: Springer-Verlag,; 1991:116-126.
147. Pâques M. Vitrification and micropropagation: Causes, remedies and prospects *Acta Hort* 1991;289 283-290.
148. Arrebola ML, Socorro O. Micropropagation of *Satureja obovata* Lag. *HortScience* 1997;32(7):1278-1280.
149. Phan CT. Vitreous state in vitro culture; ethylene versus cytokinin *Plant Cell Rep.* 1991;9(9):517-519.
150. Türközü D. *Tarhun (Artemisia dracunculus L.) genotiplerinin doku kültürü ile çoğaltılması üzerinde araştırmalar* [Doktora Tezi], Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü , 107 s.; 2010.
151. McComb AJ. The control by gibberellic acid of stem elongation and flowering in biennial plants of *Centaureum minus* Moench *Planta*. 1967;76(3):242-251.
152. Piatczak E, Wielanek M, Wysokinska H. Liquid culture system for shoot multiplication and secoriridoid production in micropropagated plants of *Centaureum erythraea* Rafn. *Plant Science*. 2005;168 431-437.
153. Gao H, Li W, Yang J, Wang Y, Guo G, Zheng G. Effects of 6-benzyladenine and casein hydrolysate on micropropagation of *Amorpha fruticosa* *Biol. Plantarum* 2003;47(1):145-148.
154. Mackay W, Kitto S. Factors affecting in vitro shoot proliferation of French Tarragon *Journal of The American Society for Horticultural Science*. 1988;113(2):282-287.
155. Bugaenko L, Davydova O, Rodov V, Glaudun S. Production poliploid plants of mint using in vitro In: Butenko R, ed. *Biologiyе kul' tiviruemykh letok I biotekhnologiya I*. Vol 91. Novosibirsk, USSR,1988.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Hanife Özler

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 29.05.1985

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: (2000-2003) Kanuni Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi. Ankara

Lisans: (2003-2007) Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı.
Ankara

İş Tecrübesi

Kurumu: Orser Kontrol ve Sert. Ltd. Şti.

Görevi: Ziraat Mühendisi

Yılları:2009 – devam

Yayımlar

Hakemli Dergilerde Yer Alan Makaleler:

Okay, Y., Ellialtıoğlu, Ş., Demir, K., Tıprıdamaz, R., Savcı, A.E., Özler, H., Gümüş, C., Günöz, A. 2014. Sentorya (*Centaurea tchihatchefu* Fish.&Mey.) Endemik bitkisinin çoğaltımı üzerinde çalışmalar. Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi 7(1):42-48, 2014.

Sentorya (*Centaurea tchihatcheffii* Fish.&Mey.) Endemik Bitkisinin Çoğaltımı Üzerinde Çalışmalar

Yeşim OKAY¹
Ayşegül Elif SAVCI²

Şebnem ELLİALTIÖĞLU¹
Hanife ÖZLER³

Köksal DEMİR¹
Cevdet GÜMÜŞ⁴

Rukiye TIPIRDAMAZ²
Aşlı GÜNOZ⁵

¹Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Ankara

²Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara

³Or-Ser Organik Ürünler Kontrol ve Sertifikasyon Ltd.Şti., Ankara

⁴Bartın Üniversitesi Meslek Yüksekokulu, Bartın

⁵Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü, Ankara

*Sorumlu Yazar:
E-mail: cgumus42@hotmail.com

Geliş Tarihi: Nisan 25, 2014
Kabul Tarihi: Mayıs 31, 2014

Özet

Dünyada sadece Ankara-Gölbaşı'nda sınırlı bir alanda yaşamakta olan ve uluslararası kayıtlarda nesli tükenme tehlikesi altında bitkiler grubunda yer alan, endemik bitki *Centaurea tchihatcheffii* Fish.&Mey. (Sevgi Çiçeği, Sentorya) bitkisinin tohumla ve doku kültürü yoluyla çoğaltılmasına yönelik araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Bu türün hızlı ve etkin biçimde çoğaltılma olanaklarının belirlenmesi ile ülkemizin sahip olduğu zengin biyoçeşitlilik ve genetik kaynakların korunmasında önemli bir katkı sağlanmış olacaktır. Doğada tohumlarıyla çoğalan ancak gerek tohumlarındaki uzun ve kararlı dormansi, gerekse diğer faktörler nedeniyle çoğaltılmasında önemli sıkıntılarla karşılaşılabilen bu bitkide, söz konusu çoğaltma sorunlarının çözümüne yönelik çalışmalar yürütülmüştür. Tohum çimlendirme aşamasında dormansinin giderilmesi için gibberellik asit ve soğukta katlama uygulamaları yapılmış; doku kültüründe vegetatif çoğaltım aşamasında ise en uygun besin ortamı bileşimi üzerinde denemeler yapılmıştır. GA₃ çözeltisinde bekletilen ve 4-5 ay soğukta katlamaya tabi tutulan tohumlarda çimlenme oranları yüksek bulunmuştur (%58.89). Doku kültüründe çimlenme aşamasında 1 mg/L GA₃ içeren ortamdaki çimlenme oranı (%83.6) ile 2 mg/L GA₃ içeren ortamdaki çimlenme oranı (%85.2) olarak en yüksek değerleri vermiştir. Sürgün çoğaltımı aşamasında eksplant başına en yüksek sürgün oluşumu 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP kombinasyonunun 1. alt kültüründe elde edilmiştir (2.05 adet sürgün/eksplant). Hormonsuz MS ortamında %70, 1 mg/L IBA katkılı ortamda ise %86 oranında köklenme elde edilmiştir. Hem tohumla, hem de doku kültürü yoluyla çoğaltılma olanağı bulunan bitki, gerekli adımların atılması halinde park ve bahçelerde yerini alabilecek potansiyelde görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Centaurea tchihatcheffii* Fish.&Mey., tohumla çoğaltma, mikro çoğaltım

Studies on Propagation of Endemic Knapweed (*Centaurea tchihatcheffii* Fisch.&Mey.) Plants

Abstract

Centaurea tchihatcheffii Fish.&Mey is critically endangered endemic species which grows on limited area around Gölbaşı-Ankara Province in Turkey. Propagation of this species has remained low in its natural habitat due to high seed dormancy due to embryo and needs a long vernalization to break it. In this research, the propagation of this species investigated *in vivo* and *in vitro* conditions. Besides, to obtain poliploid plants, colchicine treatment has been done *in vitro* conditions.

In the germination studies, to break of the dormancy, GA₃ and stratification applied to seeds. The highest germination rates (58.89 %) obtained from the seeds applied GA₃ and stratification for 4-5 months. *In vitro* germination studies, the highest germination were maintained on MS media supplemented 1 mg/L GA₃ or 2 mg/L GA₃ and the germination rates were determined as 83.6% and 85.2% respectively. The highest shoot formation was maintained on medium supplemented with 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP at the first subculture and the number of shoot per explant was 2.05. The best rooting was achieved on hormone-free MS medium and the MS medium supplemented with 1.0 mg/L IBA. Their rooting rates were 70 % and 86 % respectively. *C. tchihatcheffii* has been propagated through seeds naturally and through *in vitro* techniques. Consequently *C. tchihatcheffii* has a high potential as outdoor ornamental plant.

Keywords: *Centaurea tchihatcheffii* Fish.&Mey, seed propagation, micropropagation

GİRİŞ

Biyolojik çeşitlilik ya da biyoçeşitlilik, ekosistemlere güç, canlılık, direnç, denge, renk kazandıran dinamik bir nitelik taşımaktadır. 'Biyolojik çeşitlilik', türler içerisinde ve türler arasında genetik farklılıklardan dolayı görülen çeşitlilik [1]; belirli bir alan, çevre, ekosistem veya dünyadaki canlıların genetik, taksonomik ve ekosistem çeşitliliği [2]; bir bölgedeki genlerin, türlerin, ekosistemlerin ve ekolojik olayların oluşturduğu bir bütün [3] olarak çeşitli şekillerde tanımlanmaktadır. Türkiye Çevre Vakfı [4]'na göre, 'Biyolojik çeşitlilik' herhangi bir ekosistemde doğal olarak bulunan birden fazla canlı türü varlığıdır ve belirli genişlikteki bir ekosistemde bulunan türlerin sayısı, o ekosistemin biyolojik zenginliğinin ölçütü sayılmaktadır. Biyolojik çeşitlilikteki bozulmaların ve bir türün yok olması biçimindeki kayıpların diğer türleri nasıl etkileyeceğini önceden tahmin etmek mümkün olmamakla birlikte, en önemli kayıp genetik çeşitliliğin azalması yönünde olacağı düşünülmektedir [5].

Ankara florasında 99 familya, 495 cinse ait 1365 çiçekli bitki türü bulunduğu ve bunların %19.85'inin endemik olduğu kaydedilmiştir [6]. Bölgede biyoçeşitlilik açısından çok önemli olan endemik türlerden birisi de Sevgi Çiçeği adıyla bilinen veya Yanardöner olarak adlandırılan *Centaurea tchihatcheffii*'dir. Asteraceae familyasında yer alan sentorya; tek yıllık, 25-30 cm uzunluğunda, Nisan sonlarında ve Mayıs'ta çiçek açan, çok güzel ve çarpıcı mor, kırmızı, pembe renkte çiçeklere sahip olan otsu bir bitkidir. 1848 yılında Afyon çevresinde yetiştiğine dair kayıt bulunmakla birlikte, *C. tchihatcheffii* günümüzde, sadece Ankara Gölbaşı'nda yetişmekte olan endemik bir türdür [7].

Centaurea tchihatcheffii'nin endemik konumu ve korunması çerçevesinde bazı inceleme ve araştırmalar yapılmış olmakla birlikte [8-10], bu türün çoğaltılmasına ilişkin çalışmaların sayısı sınırlıdır. Tohumla çoğaltımda bazı sorunların olduğu bunun için bazı uygulamalar yapılması gerektiği, Okay ve Demir [10], tarafından kaydedilmiştir. Yapılan kaynak araştırmasında farklı *Centaurea* türlerinin doku kültürü yoluyla çoğaltılmasına ilişkin bazı bulgular [11-13] ile Özel [14], Tıprıdamaz ve ark. [15], Kurt ve Erdağ [16]'ın verilerine rastlanmıştır. Araştırmacılar, *C. tchihatcheffii*'nin doku kültürü ile çoğaltımına uygun koşulların optimize edilmesi gerektiğini ifade etmektedirler. *C. tchihatcheffii* doğada tohumları ile çoğalmakta ancak tohumlar klasik yöntemlerle çimlenmeye alındığında sorunlarla karşılaşabilmektedir. Türün çoğaltılmasındaki engeller ve süs bitkisi olarak kullanılabilme potansiyeli dikkate alındığında, bu türün korunması ve çoğaltılmasında, doku kültürü ile çoğaltımın sorunsuzca hayata geçirilmesi yönündeki çalışmaların gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

C. tchihatcheffii tohumlarının yüksek sıcaklık derecelerinde çimlenemedikleri, ön soğuk uygulaması yapılan tohumlarda çimlenme yeteneklerinin kaybolmadığı ve çimlenmenin % 10 olduğu, toplandıktan sonra belli dormansi süresini geçiren tohumlarda çimlenmenin daha yüksek belirlendiği, araziden toplandıktan sonra yaklaşık 9 ay bekletilen tohumların toprak+perlit karışımındaki çimlenmelerinin 7-10 günde tamamlandığı ve çimlenme değerinin %90'a çıktığı, 50-55 günde ise çiçeklenme fazına ulaşıldığı, dormansinin laboratuvar koşullarında (20 °C, %50-60 nem) saklanan tohumlar için yaklaşık 9 ay sürdüğü ve dormansinin tohum kabuğundan değil de embriyodan kaynaklanabileceği önceden yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar olarak sunulmuştur [17, 18].

C. tchihatcheffii'nin doğada tohumları ile çoğaldığı halde, tohumlar klasik yöntemlerle çimlenmeye alındığında, temel istekler yerine getirildiği halde sonuç olumsuz olmaktadır. 13 gün +4 C° de bırakılan ve karanlık inkübatörde 18 C° de bekletilen tohumlarından yalnızca 1 tanesi 150 gün sonra çimlenmiş, oluşan bitkinin kök gelişiminin de anormal olduğu gözlenmiştir. Tohum çimlendirilmesinde karşılaşılan sorunlar nedeniyle alternatif çoğaltım yöntemlerini deneyen Özel [14] ve Özel ve ark. [19] tarafından gerçekleştirilen araştırmalarda doğadan toplanan bitkilerden alınan 8-10 cm'lik 9'arlık genç sürgünler, farklı dozlardaki (0, 500 ve 1000 ppm) IBA çözeltisi içerisinde farklı sürelerde (0, 5, 10 ve 15 dk) bekletilerek serada steril kum içeren saksılarda köklendirmeye bırakılmışlar ve köklenen bitkiler saksılara geçirilmişlerdir. 10. günden itibaren kök oluşumunun başladığı, 2. hafta sonunda ise kontrol denemesi dışındaki tüm hormon ve uygulama sürelerinde kök oluşumunun gözlemlendiği bildirilmiştir. En iyi kök oluşumu 500 ppm IBA ve 10 dakika uygulama süresinde elde edilmiştir.

Okay ve Günöz [20], türün tohumlarının klasik yöntemler kullanılarak çimlendirilmeye alındığında, temel istekler yerine getirildiği halde çok düşük çimlenme oranları elde edildiğini ve bitkinin kök gelişiminin de anormal olduğunu bildirmiştir. Schütz [21] ile Taiz ve Zeiger [22], türün tohumlarında derin bir primer dormansi görüldüğünü ve bu tohumların çimlenebilmek için uzun bir vernalizasyon dönemine ihtiyaç duyduklarını belirtmişlerdir.

Kaybolmakta olan bazı türlerin korunmasında ve çoğaltılmaları zor olan bazı türlerin üretilmesinde çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır. Bu nedenle soyu tükenmekte ve tehdit altında olan; aynı zamanda tıbbi bitki ve süs bitkisi olarak ticari öneme sahip olma potansiyeli taşıyan *C. tchihatcheffii*'nin ve diğer *Centaurea* türlerinin *in vitro* çoğaltımı ve adventif sürgün rejenerasyonu üzerinde de çeşitli çalışmalar yapılmıştır. *Centaurea junaniana* [23], *C. macrocephala* [24], *C. paui* [11], *C. spachii* [12], *C. zeybekii* [16], *C. ultreiae* [25], *C. arifolia* [26] türlerinde yapılan meristem ve boğum kültürlerinden başarılı sonuçlar alınmış, *in vitro* bitki çoğaltımı mümkün olmuştur. Çalışmalarda MS besin ortamı bileşimi kullanılmış ve oksin ile sitokininin değişik dozları denenmiştir. 1 mg/L BAP içeren MS besin ortamında sürgün gelişimi oluşurken, çeşitli eksplantlardan organogenezis elde edilmesi için 5 mg/l BAP ve 0.2 mg/l NAA içeren MS ortamı genel olarak daha olumlu bulunmuştur.

Özel [14], *C. tchihatcheffii* tohumlarının yüzey sterilizasyonunda sorunlarla karşılaşmış olup *in vitro* koşullardaki kontaminasyona engel olma konusunda denemeler yapmıştır. Bu çalışmaların genel bir değerlendirilmesi yapıldığında; tohumların *in vitro* koşullarda çimlenmesi konusunda enfeksiyon nedeniyle sıkıntılar yaşanması sonucunda yeşil bitkilerden doğadan eksplant alınması veya olgunlaşmamış embriyolardan sürgün rejenerasyonu yoluyla bitki çoğaltımı yapıldığı, köklene çalışmalarının ise *ex vitro* koşullarda serada oksin uygulamaları ile birlikte gerçekleştirildiği özetlenebilir.

Tıprıdamaz ve ark. [15] tarafından gerçekleştirilen araştırmada ise, *C. tchihatcheffii*'nin tohumları *in vitro* koşullarda 6 g/L veya 9 g/L agar içeren MS ortamlarında kültüre alınarak çimlenme üzerine farklı agar dozlarının etkisi incelenmiştir. Ayrıca *in vitro*'da gelişen fidelerden alınan sürgün eksplantları 9 g/l agar ve 1 mg/l GA₃ + 0.25mg/l BAP kombinasyonlarını içeren MS ve 1/2 MS

ortamlarında inkübe edilerek ortam kuvvetin sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. MS ortamına dikilen eksplantların %40.7'si sürgün oluşturmuş, %29.5'i sürgün oluşturmadan sadece kendi gelişmeye devam etmiştir. 1/2 MS ortamında ise eksplantların %42.3'ü sürgün oluştururken %38.4'ü kendi gelişmeye devam etmiştir. Eksplant başına elde edilen sürgün sayısı ise her iki ortam için 2.27 olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada, *Centaurea tchihatcheffii* Fish.&Mey. tohumlarının *in vivo* ve *in vitro* koşullarda çimlenmeleri üzerine, ayrıca *in vitro* çimlenen bitkilerden hazırlanan eksplantlardan hızlı vegetatif çoğaltım yapmak amacıyla en uygun besin ortamı kompozisyonunun belirlenmesi konularında çalışmalar yapılmış ve çoğaltım yönteminin optimize edilmesi amaçlanmıştır. Sentorya bitkisinin üretici koşullarında çoğaltılabilesine yönelik olarak, en uygun tohum ekim zamanı ve yöntemi ile tohum çimlendirme olanakları da araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırmada bitkisel materyal olarak, Ankara-Gölbaşı'nda türün doğal yayılım alanlarından biri olan [27] T.C. Kültür Bakanlığı Devlet Opera ve Balesi Genel Müdürlüğü arazisinde yer alan *Centaurea tchihatcheffii* populasyonları ile yine Ankara -Gölbaşı'ndan toplanan tohumlar kullanılmıştır. 2010 yılı Haziran ayı içerisinde doğal populasyondan toplanan tohumlar oda sıcaklığında, gazete kağıtları üzerinde bir hafta süreyle serilerek kurutulmuş, benzer morfolojik özelliklere ve büyüklüğe sahip olanlar sayılarak uygulamalar için gereken tohumlar ayrılmıştır [5].

Tohumla Çoğaltma Çalışmaları

Tohumla çoğaltım çalışmaları Okay ve Günöz [20]'de belirtildiği gibi yapılmış olup aşağıda özetlenmiştir.

a) Doğrudan araziye ekim: Bu yöntemde üretici şartlarında uygun ekim zamanını belirlemek amacıyla tohumlar katlama yapılmaksızın 4 farklı zamanda (Ağustos ayı sonu, Eylül ayı sonu, Ekim ayı sonu ve Kasım ayının ikinci yarısı) doğrudan araziye ekilmişlerdir. Tohumlar ekim zamanına kadar oda sıcaklığında tohum saklama kaplarında muhafaza edilmişlerdir.

b) Çimlenmeyi uyandırıcı ön işlem uygulamaları ve Çimlendirme ortamı reaksiyonu: Tohumlar çimlenme engellerini ortadan kaldırmak ve çimlenmeyi teşvik etmek amacıyla farklı ön işlemlere tabii tutulmuştur. Bu amaçla soğukta katlama (3, 4, 5 ay), suda bekletme (10 saat, 24 saat) ve GA₃ uygulamalarının (10 ppm, 100 ppm) çimlenme üzerine etkisi araştırılmıştır. Bunun yanında tohumlar ön işlem uygulamasını takiben farklı pH seviyelerine ayarlanan (6.5, 7.5, 8.5) çimlendirme ortamına (1:1 oranındaki torf+perlit) ekilerek çimlendirme ortamı reaksiyonunun da etkisi araştırılmış, tohum ekimlerini izleyen dönemlerde tohumlarda çimlenme oranı (%) belirlenmiştir.

Araştırma sonuçları, Minitab 15.1 istatistik paket programı kullanılarak, tesadüf parselleri deneme deseninde faktöriyel düzende varyans analizi tekniği ile değerlendirilmiş, farklı grupların harflendirilmesinde Duncan çoklu karşılaştırma testlerinden yararlanılmıştır. % olarak ifade edilen çimlenme oranı özelliğine ait gözlem değerlerine açı (arc sin^{√x}) transformasyonu uygulanmıştır.

Doku Kültürü Çalışmaları

Sentorya tohumlarının yüzey sterilizasyonu, Babaoğlu ve ark. [28]'nin önerdiği yonteme ve aşamalarına dikkat edilerek gerçekleştirilmiştir. Buna göre tohumlar, birkaç damla Tween-20 ilave edilmiş %15'lik ticari sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) içinde 25 dakika çalkalanarak dezenfekte edilmiş, bunun ardından, 3 defa 5'er dakika steril saf su ile durulama işlemine tabii tutulmuştur. Cam tüpler içerisine birer adet tohum ekilmiştir. 23±2°C sıcaklık ve sürekli karanlık koşullarda çimlendirilen fideler, kökçük uzunluğu yaklaşık 5 mm olduğu zaman 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmış fotoperiyodik düzene ve 2000 lux floresan ışığına sahip iklim odasına aktarılmışlardır.

Tohum çimlendirme amacıyla farklı tarihlerde (26.01.2011, 17.04.2011, 09.11.2011, 11.12. 2011 ve 17.03.2012) beş adet deneme kurulmuştur. Bunlardan ilk iki tarihte yapılan ekimler, hormonsuz MS ortamı üzerine gerçekleştirilmiştir. 3. ekim tarihindeki ortamların bir kısmına 1 mg/L dozunda GA₃ ilave edilmiştir. 4. ve 5. ekimlerde ise tekrarlamalı olarak üç farklı GA₃ dozunun çimlenme üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu dozlar 1, 2 ve 3 mg/L olarak kullanılmıştır. Enfeksiyon oranının azaltmak amacıyla tohumların pappusları kesilmiş ve her tüpe bir adet tohum olacak şekilde ekilmiştir. Denemelerde ekimi yapılan tohum sayısı sırasıyla 305, 273, 464, 268 ve 376 adettir. Kültürler 23±2 °C sıcaklıkta ve karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Tohum ekiminden itibaren iki hafta aralıklarla (2, 4, 6 ve 8. hafta) çimlenme sayımları yapılmıştır. 8. haftanın sonunda çimlenmeyen kültürlerde denemeye son verilmiştir.

Aseptik koşullarda çimlendirilen tohumlardan gelişen sentorya fideleri, dört haftalık inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Tek boğum eksplantları besin ortamına yatay ve dikey olarak yerleştirilmiş [29], sürgün uçları ise dikey biçimde yerleştirilmişlerdir. Eksplantların cam kavanozlardaki besin ortamlarına dikilmesinden sonra tüm kültürler, 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ve 25 °C ±1 sıcaklık düzenine ayarlanan ve 2000 lux şiddetinde aydınlatılan iklim odasında gelişmeye bırakılmışlardır.

İklim odasında üç hafta süreyle inkübe edilen kültürlerde gelişen sürgünlerden üç haftanın sonunda yeniden tek boğum eksplantları hazırlanarak alt kültürlere alınmıştır. Tüm besin ortamı bileşimlerinden gelen sürgünler, iki hafta süreyle öncelikle hormonsuz MS ortamında yetiştirilmiş, ardından dört farklı büyüme düzenleyici kombinasyonu içeren MS ortamlarına aktarılmışlardır. Bu ortamlardaki büyüme düzenleyici içerikleri şöyledir: 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP; 0.5 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP; 1.0 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP; 1.0 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP. Tek boğum eksplantları ilk 6 hafta süreyle bu ortamlar üzerinde bırakılmış ve oluşan sürgün sayıları belirlenmiştir.

Aksillar sürgünler birbirinden ayrıldıktan sonra hormonsuz veya içerisine 0.1 mg/L IBA ya da 1.0 mg/L IBA katılmış MS ortamlarında köklendirme aşamasına alınmıştır. Dört hafta sonunda köklenme durumları incelenmiş ve % olarak hesaplanmıştır.

BULGULAR

Tohumla Çoğaltma Çalışmaları

Tohumla çoğaltım çalışmalarından elde edilen sonuçlar Okay ve Günöz [20] tarafından önceden detaylandırılmış olduğundan, bu bölümde yalnızca öne çıkan sonuçlar değerlendirilmiştir.

Araştırmada katlama yapılmadan doğrudan araziye ekilen *C. tchihatcheffii* tohumlarında en yüksek çimlenme (%63.11, %71.78) Ağustos sonunda yapılan ekimlerde elde edilmiş, bu dönemi Eylül ayında yapılan ekimler izlemiştir.

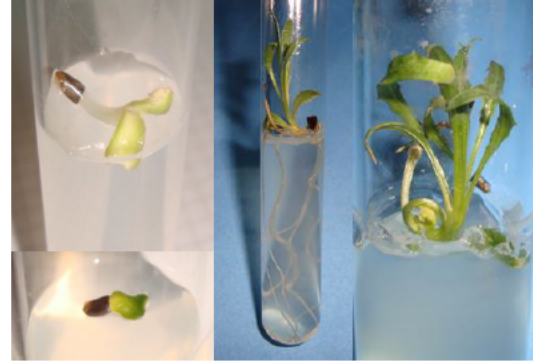
Yetiştirme ortamlarının tüm pH değerlerinde 5 ay katlanan tohumların en yüksek çimlenme oranını (% 58.89) gösterdikleri, bunu 4 ay süre ile katlanan tohumların (% 42.78) izlediği belirlenmiştir. 3 ay süre ile katlanan tohumlarda, tüm yetiştirme ortamlarındaki çimlenme oranları en düşük düzeydedir (% 21.11). Katlama süreleri arasındaki farklılıklar istatistik anlamda önemlidir. Yetiştirme ortamının pH'sı açısından yapılan değerlendirmede ise, en yüksek tohum çimlenme oranlarının sırasıyla 6.5 pH (% 50.56) ve 7.5 pH (% 45) derecelerinde bulunduğu, aralarındaki farklılıkların istatistik anlamda önemsiz olduğu belirlenmiştir. 8.5 pH ortamına ekilen tohumların çimlenme oranları (% 27.22) istatistik anlamda önemli düzeyde düşük olmuştur [20]. En yüksek tohum çimlenme oranları, tüm ortam pH değerlerinde, 100 ppm GA₃ çözeltisinde bekletilen tohumlarda gerçekleşmiştir. 6.5 ve 7.5 pH derecesindeki ortamda tohum çimlenme oranları daha yüksek bulunmuştur. Her iki yılda da sırasıyla 100 ppm ve 10 ppm GA₃ çözeltisinde bekletme uygulamalarının, tohum çimlenmesini artırma açısından öne çıktığı, diğer uygulamalardan istatistik anlamda önemli düzeyde etkili olduğu görülmektedir. Suda bekletme uygulamalarının ise, her iki yılda da 10 ppm GA₃ çözeltisinde bekletme uygulamaları ile aynı düzeylerde sonuçlar verdiği, aralarındaki farklılıkların da istatistik anlamda önemli bulunmadığı belirlenmiştir. Tohum ekilen ortamların pH değerlerinin çimlenme üzerine etkileri incelendiğinde, araştırmanın her iki yılında da, 8.5 pH değerine sahip ortama ekilen tohumlardaki çimlenme oranlarının, istatistik anlamda önemli düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir. Tohum ekim ortamının pH derecesinin 6.5 ve 7.5 olması durumunda çimlenmenin daha yüksek oranlarda gerçekleştiği ve aralarındaki farklılıkların da istatistik anlamda önemli olmadığı anlaşılmıştır [20].

Doku Kültürü Çalışmaları

Yüzeysel sterilizasyon işleminden geçirilerek besin ortamlarına dikilen tohumlarla yapılan tohum çimlendirme aşaması uygulamaları toplam beş kez gerçekleştirilmiştir. Bunlardan ilk iki dikimde hormonsuz MS ortamı kullanılmıştır. Üçüncü dikimde besin ortamına 1 mg/L GA₃ ilavesi yapılmış, bu uygulamanın olumlu etkisi gözlemlenince dördüncü ve beşinci tohum ekimlerinde üç farklı GA₃ dozunun çimlenme üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çizelge 1'de, beş farklı ekim tarihinde yapılan ve ikişer hafta ara ile toplamda 8 hafta boyunca çimlenme gözlemleri yapılan denemelerin sonuçları bir arada verilmiştir.

Kontaminasyon, çalışmamızda sorun yaratan bir faktör olarak ortaya çıkmamıştır. Bu durumun, tohum materyalinin alınması sırasında ve kurutulmuş saklanması sırasında yapılan işlemler ile alakalı olduğu, titiz ve sağlıklı materyalden alınan ve sağlıklı koşullarda kurutulmuş saklanan tohumlardaki enfeksiyon oranının çok düşük olacağı ve *in vitro* çimlendirmede sorun çıkartmayacağını söylemek mümkündür. Hormonsuz MS ortamında çimlenme oranının %60'a yakın olması, önceki yapılan çalışmalara göre çok olumlu bir sonuç olmakla birlikte, bu oranı artırmanın mümkün olabileceği düşünülmüş ve çalışmanın geneli kapsamında devam eden denemeler kurulmuştur.

GA₃'ün sentorya tohumlarının çimlenmesi üzerindeki etkisi çok yüksek düzeyde olmuştur. 8 haftanın sonunda kontrol ortamlarında %55.11 olarak belirlenen çimlenme oranı, GA₃ ilave edilen ortamlarda %87.64 olmuştur. Şekil 1'de çimlenen tohumlar ve bitki gelişimi gösterilmiştir. GA₃'ün dormansinin ortadan kaldırılmasında etkin bir hormon olarak etkisini gösterdiği, ancak kullanım dozunun artmasının çimlenmeyi olumsuz etkileyebilecek bir faktör olabileceği de gözlemlenmiştir.

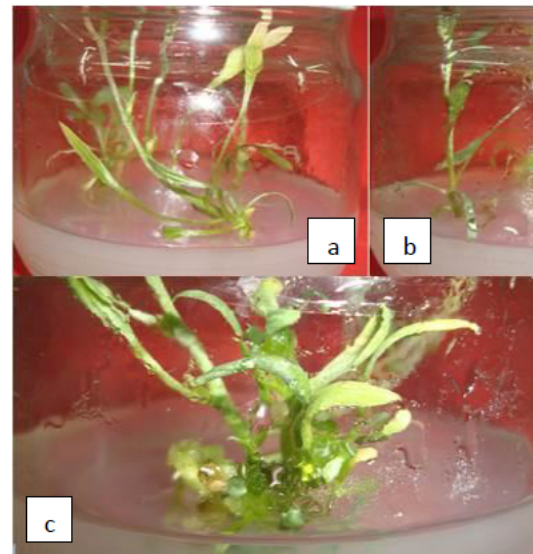


Şekil 1. 1 mg/L GA₃ içeren ortamlarda çimlenen ve gelişen sentorya bitkileri

IBA + BAP Kombinasyonları ile yapılan denemeler

In vitro koşullarda çimlendirilen ve gelişme gösteren fidelerden hazırlanan eksplantların besin ortamlarına dikilmesi sonucunda elde edilen ilk veriler, eksplantların dikim pozisyonları ile ilgilidir. IBA ve BAP'nin ikişer dozunun kombine edildiği toplam dört farklı içeriğe sahip besin ortamında yatay veya dikey olarak besin ortamına yerleştirilen sentorya tek boğum eksplantlarının gelişme oranları ve 5 hafta sonundaki gözlem sonuçları Çizelge 2'de verilmiştir.

IBA ve BAP'nin birlikte bulunduğu besin ortamlarında eksplantların gelişerek sürgün oluşturma oranları en az %19.44, en fazla %62.50 olmuştur (sırasıyla 1.0 + 1.0/ Yatay ve 1.0 + 0.5/ Dikey kombinasyonlarında) (Şekil 2).



Şekil 2. Proliferasyon ortamına aktarılan eksplantlardan gelişen sürgünler; a. 0.5 mg/L IBA + 1.0 mg/L BAP, b. 1.0 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP, c. 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP

Genel olarak Dikey pozisyonda besin ortamına yerleştirilen eksplantlarda gelişme oranı ve/veya eksplant başına oluşan sürgün sayısı daha yüksek olmuştur. Görsel olarak yapılan tespitlerde de dikey olarak dikimi yapılan eksplantların daha hızlı ve gürbüz geliştiği izlenimi edinilmiştir. İlk kez proliferasyon ortamlarına alınan eksplantlardan gelişen sürgün sayıları sadece 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP içeren ortamlarda ortalama 2 ve üzerinde bulunmuştur.

İkinci alt kültürün sonunda tüm ortamlardan elde edilen materyal üçe ayrılarak hormonsuz MS, 0.1 mg/L IBA ve 1.0 mg/L IBA ilave edilmiş MS ortamlarına alındıktan sonra elde edilen köklenme oranları topluca değerlendirilmiş ve sonuçlar Çizelge 3'te sunulmuştur. Çizelgeden de izlenebileceği gibi, hormonsuz MS ortamında her iki alt kültürün ortalaması esasında değerlendirildiğinde %70.7'lik bir köklenme oranı elde

edilmiştir. Bu oran, besin ortamına 0.1 mg/L IBA ilave edildiğinde %81.6'ya, 1.0 mg/L IBA eklendiğinde ise %86.3'e çıkmıştır. IBA katkısı köklenme oranını artırmıştır. Nitekim oksin türevlerinin ve yoğunlukla kullanılan IBA'nın doku kültürü çalışmalarında köklenme aşamasında kullanıldığı genel doku kültürü bilgileri arasında yer almaktadır [30, 31]. Yalnızca doku kültürü için değil, IBA pek çok bitki türünde köklenme için kullanılan ve daldırma metodunda yer alan bir büyüme düzenleyicisidir [32]. Hatta Özel [14] tarafından yapılan çalışmada da sentorya sürgünleri *ex vitro* koşullarda serada köklendirmeye tabi tutulmuşlar ve 500 ppm IBA solüsyonunda 10 dk süreyle yapılan daldırma, köklenme bakımından en iyi sonucu vermiştir. Oksin uygulanmayan sürgünler köklenmemiştir. Araştırmacıların *in vitro* köklendirme çalışmaları ise olumlu sonuç vermemiştir.

Çizelge 1. 2011 ve 2012 yılları içerisinde denemelerde kullanılan *in vitro* bitkilerin elde edilmesi için yapılan sentorya tohum ekimlerinden elde edilen tohum çimlenme oranları

Ekim Tarihi	Besin Ortamı	Enfeksiyon Oranı (%)	Çimlenme Oranı (%)			
			2.Hafta	4. Hafta	6.Hafta	8.Hafta
1 Ekim (27.01.2011)	MS	18.03	39.02	50.08	51.08	58.40
2 Ekim (17.04.2011)	MS	1.46	26.39	49.44	54.27	56.13
3 Ekim (07.11.2011)	MS	6.88	20.45 ^{b*}	43.18 ^b	49.43 ^b	55.11 ^b
	MS+1 mg/L GA ₃	4.81	48.88 ^a	84.27 ^a	84.27 ^a	87.64 ^a
4 Ekim (11.12.2011)	MS+1 mg/L GA ₃	7.81	25.42 ^a	49.15 ^a	69.49 ^a	86.90 ^a
	MS+2 mg/L GA ₃	3.17	11.47 ^c	34.42 ^b	67.21 ^b	81.20 ^b
	MS+3 mg/L GA ₃	1.59	19.35 ^b	33.87 ^b	64.51 ^c	76.50 ^c
5 Ekim (17.03.2012)	MS	2.77	20.00 ^b	43.50 ^b	62.86 ^d	64.30 ^d
	MS+1 mg/L GA ₃	8.33	54.54 ^a	61.10 ^a	72.86 ^b	83.60 ^a
	MS+2 mg/L GA ₃	0	44.44 ^a	67.80 ^a	84.85 ^a	85.20 ^a
	MS+3 mg/L GA ₃	8.33	24.24 ^b	42.90 ^b	75.00 ^b	77.2 ^{0c}

Çizelge 2. Tohumlardan gelişen *in vitro* fidelerden hazırlanan eksplantların farklı IBA+BAP kombinasyonlarından 5 hafta süre sonunda elde edilen sürgün gelişme oranları ve eksplant başına aksillar sürgün sayıları

IBA-BAP Kombinasyonu (mg/L)	Dikim Şekli	Dikilen Eksplant Sayısı (Adet)	Gelişen Eksplant Sayısı (Adet)	Sürgün Gelişme Oranı (%)	Oluşan Toplam Sürgün Sayısı (Adet)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)
0.5+ 0.5	Yatay	36	22	61.11	45	2.05
	Dikey	18	8	44.44	20	2.50
0.5+ 1.0	Yatay	36	13	36.11	13	1.00
	Dikey	22	11	50.00	11	1.00
1.0+ 0.5	Yatay	36	13	36.11	13	1.00
	Dikey	24	15	62.50	22	1.47
1.0+ 1.0	Yatay	36	7	19.44	7	1.00
	Dikey	24	9	37.50	9	1.00

Çizelge 3. Hormonsuz MS veya 0.1 mg/L IBA ilave edilmiş MS ortamlarına aktarılan sentorya sürgünlerinin köklenme oranları

Köklendirme ortamı	2. alt kültürden alınan sürgünlerde köklenme oranı (%)	3. alt kültürden alınan sürgünlerde köklenme oranı (%)	Ortalama köklenme oranı (%)
Hormonsuz MS	75.5 ± 1.2 ^{ba*}	65.9 ± 1.5 ^{cb}	70.7
0.1 mg/L katkılı MS	84.7 ± 1.8 ^{aa}	78.5 ± 0.9 ^{bb}	81.6
1.0 mg/L katkılı MS	89.2 ± 0.8 ^{aa}	83.4 ± 1.4 ^{ab}	86.3

*Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütunda farklı küçük harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (p<0.05); aynı satırda farklı büyük harfler alan uygulamalar arasındaki farklar önemlidir (p<0.05).

SONUÇ VE ÖNERİLER

Centaurea tchihatcheffii'nin tohumla çoğaltılabilme olanakları üzerinde yapılan araştırmaların sonuçları şu şekilde sıralanabilir;

1. Arazide çimlenmeyi uyarıcı herhangi bir ön uygulama gerçekleştirilmeden doğrudan yapılan tohum ekimlerinde çimlenme oranları son derece düşük düzeylerde gerçekleşmiştir. Bu durum, bitkinin tohumlarında ekimden önce mutlaka çimlenmeyi uyarıcı bir uygulama yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

2. Açıkta yapılan tohum ekimlerinde farklı ekim zamanları da denenmiştir. Katlama yapılmadan araziye ekilen *C. tchihatcheffii* tohumlarında en yüksek çimlenme Ağustos sonunda yapılan ekimlerde elde edilmiş, bu dönemi Eylül ayında yapılan ekimler izlemiştir.

3. Katlamadan sonra araziye ekilen tohumlarda çimlenme çok yüksek olmamakla birlikte, yeterli sayılabilecek düzeyde gerçekleşmiştir.

4. *C. tchihatcheffii* tohumlarında çimlenmeyi uyarıcı bazı uygulamaların etki düzeylerini belirleyebilmek amacıyla, suda bekletme (12 ve 24 saat), GA₃ çözeltisinde bekletme (10 ppm ve 100 ppm) ve katlama (3, 4 ve 5 ay süre ile) uygulamaları gerçekleştirilmiş, en yüksek tohum çimlenme oranı 100 ppm GA₃ çözeltisinde 24 saat bekletilen tohumlarda belirlenmiştir.

5. Katlama uygulamaları tohum çimlenmesini önemli düzeyde artırmıştır. 5 ay katlanan tohumların en yüksek çimlenme oranını gösterdikleri, bunu 4 ay süre ile katlanan tohumların izlediği görülmektedir. 3 ay süre ile katlanan tohumlarda tüm yetiştirme ortamlarındaki çimlenme oranları daha düşük düzeydedir.

6. Tohumların ekildiği ortamın pH derecesinin tohum çimlenmesini etkilediği, yetiştirme ortamının pH değeri arttıkça, tohum çimlenme oranlarının azaldığı belirlenmiştir.

C. tchihatcheffii'nin *in vitro* koşullarda çoğaltımı yapılmış olup çalışmanın sonuçları şu şekilde özetlenebilir:

1. *C. tchihatcheffii*'nin olgunlaşmış tohumları araziden dikkatlice toplanıp özenle kurutulduktan sonra bu tohumların kullanılmasyla enfeksiyon bakımından önemli bir sorunla karşılaşılmaksızın, sadece birkaç damla Tween-20 ilave edilmiş %15'lik ticari sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) içinde 25 dakika bekletilmek suretiyle yüzeysel dezenfeksiyondan geçirilebilmekte ve kültürler başarıyla kurulabilmektedir.

2. *In vitro* tohum ekimlerinde pappus kısımları çıkarılmış tohumların kullanılması gerekmektedir. Bu uygulama yapılmadığı takdirde enfeksiyon oranı yükselmektedir.

3. MS+1 mg/L GA₃ ortamlarında %86 oranında tohum çimlenmesi elde edilmiştir. Gibberellik asit ilavesi, çimlenme oranını %60'lardan %80'li değerlere taşımıştır.

4. Mikroçoğaltım denemelerinde, bir-bir buçuk aylık *in vitro* fidelelerden alınan tek boğum ve sürgün ucu eksplantları kullanılabilir. Eksplantların yatay değil, dikey pozisyonda besin ortamına yerleştirilmesi daha olumlu bulunmuştur.

5. Sentorya eksplantlarından sürgün proliferasyonu sağlanmıştır. 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP kombinasyonu, dengeli yapısı sayesinde eksplant başına 2.5 adet civarında sürgün oluşturmuştur. BAP dozu artınca 0.5 cm³'nin altında çok sayıda ve vitriyeye olan sürgün oluşumu meydana gelmiş olup bu materyalin değerlendirilmesi mümkün görülmemiştir.

6. Köklenme aşamasında hormonsuz MS ortamında %70 oranında köklenme meydana gelmiştir. Besin ortamına

IBA ilave edilmesi, köklenme oranını artırmıştır. 0.1 mg/L IBA içeren ortamda %81; 1.0 mg/L IBA içeren ortamda %86 oranında köklenme meydana gelmiştir. Ancak doz arttığında sürgün boylarının kıaldığı ve camsılaşmaya eğilim ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle düşük doz IBA uygulaması uygun bulunmuştur. Hormonsuz MS ortamlarında çiçek tomurcuğu oluşumuna eğilim %90 civarındaki materyalde ortaya çıkmıştır.

7. *C. tchihatcheffii*'nin sürgün ucu ve tek boğum eksplantıyla çoğaltılması başarıyla gerçekleştirilmiş, fizyolojik ve ıslah çalışmalarında kullanılacak bir sistem olarak değerlendirilebilir aşamaya ulaştırılmıştır.

Sonuçları sunulan bu çalışma ile *in vitro* koşullarda endemik *C. tchihatcheffii* türünün çoğaltımı için koşullar optimize edilmiş görünmektedir. Bundan sonraki çalışmalarda poliploidi ve diğer mutasyon uygulamaları için temel çoğaltım ve elit biyü üretim aşamaları için zemini hazırlanmış bulunmaktadır. Bu türde ve benzeri olan tehlike altında bulunan endemik bitkilerin çoğaltılması ve üzerlerinde yapılacak ıslah çalışmalarına stis bitkileri ve tıbbi bitkiler sektöründe değerlendirilebilecek yeni çeşitler geliştirilmesi, ülkemiz bilimi ve yetiştiriciliğine katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Kışlalıoğlu M, Berkes F. 1987. Biyolojik Çeşitlilik. Türkiye Çevre Sorunları Vakfı Yayını, 122 s.
- [2] Kocataş A. 1992. Ekoloji ve Çevre Biyolojisi. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, No: 142, Bornova-İzmir, 564 s.
- [3] Işık K. 1997. Biyoçeşitlilik. TÜBİTAK Bilim ve Teknik, 30 (350): 84-88.
- [4] Türkiye Çevre Vakfı. 2001. Ansiklopedik Çevre Sözlüğü. TÇV Yayın No: 142, 407 s.
- [5] Günöz A. 2008. Gölbaşı'nda endemik *Centaurea tchihatcheffii* fish. & Mey. (Sevgi çiçeği) tohumlarının çimlenmesi üzerine araştırmalar. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 101 s.
- [6] Boşgelmez A, Boşgelmez İİ, Savcı AE, Aldemir A, Mutlu B, Ege M, Topaloğlu S. 2005. Biyolojik çeşitlilik. 1. Bölüm, 1-130. (Editör: A. Boşgelmez), *Centaurea tchihatcheffii*, Ankara-Gölbaşı Sevgi Çiçeği. Bizim Büro Basımevi-Ankara 570 s.
- [7] Wagenitz G. 1975. *Centaurea* L. In: Davis, P.H. (Ed.): *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. 5: 465-585.
- [8] Boşgelmez A. 2005. (Editör) *Centaurea tchihatcheffii*, Ankara-Gölbaşı Sevgi Çiçeği. Bizim Büro Basımevi-Ankara 570 s.
- [9] Boşgelmez A. 2006. (Editör) Gölbaşı Mogan Gölü, Andezit Taşı, *Centaurea tchihatcheffii*. Bizim Büro Basımevi-Ankara 795 s.
- [10] Okay Y, Demir K. 2010. Critically endangered endemic *Centaurea tchihatcheffii* Fisch. And Mey. and its propagation possibilities. African Journal of Agricultural Research, 5(25): 3536-3541.
- [11] Cuenca S, Amo-Marco JB, Parra R. 1998. Micropropagation from inflorescence stems of the Spanish endemic plant *Centaurea pau* Loscos ex. Willd. (Compositae), Plant Cell Rep., 18: 674-679.
- [12] Cuenca S, Amo-Marco JB. 2000. *In vitro* propagation of *Centaurea spachii* from inflorescence stems, Plant Growth Regul., 30: 99-103.

- [13] Perica M. 2003. *In vitro* propagation of *Centaurea rupestris* L. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 45(2): 127-130.
- [14] Özel ÇA. 2002. *Centaurea tchihatcheffii*'nin İn Vitro Çoğaltımı. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 69 s.
- [15] Tıprıdamaz R, Özkum D, Özbek N, Ellialtıoğlu Ş, 2006. *Centaurea tchihatcheffii* Fisch. et Mey.'in doku kültürü yoluyla üretimi üzerinde araştırmalar, s: 569-579. (Editör: A. Boşgelmez), *Gölbaşı Mogan Gölü, Andezit Taşı, Centaurea tchihatcheffii*. Bizim Büro Basımevi, Ankara, 795 s.
- [16] Kurt S, Erdag B. 2009. *In vitro* germination and axillary shoot propagation of *Centaurea zeybekii*. Biologia-Section Botany, 64 (1): 97-101.
- [17] Çakırlar H, Çiçek N, Doğru A. 2005. *Centaurea tchihatcheffii* Fisch. et Mey.'in çimlenme fizyolojisi. 7. Bölüm, 309-324. (Editör: A. Boşgelmez), *Centaurea tchihatcheffii, Ankara-Gölbaşı Sevgi Çiçeği*. Bizim Büro Basımevi, Ankara, 570s.
- [18] Çakırlar H, Çiçek N, Doğru A. 2006. *Centaurea tchihatcheffii* Fisch. et Mey. (Gölbaşı Sevgi Çiçeği)'nin Anatomik ve Çimlenme Özellikleri. 545-567. (Editör: A. Boşgelmez), *Gölbaşı Mogan Gölü, Andezit Taşı, Centaurea tchihatcheffii*. Bizim Büro Basımevi, Ankara, 795 s.
- [19] Özel ÇA, Khawar KM, Mirici S, Arslan O, Özcan S. 2006. Induction of *ex vitro* adventitious roots and soft wood cuttings of *Centaurea tchihatcheffii* Fisch. et Mey. using indole 3-butyric and α -naphthalene acetic acid. International Journal of Agriculture & Biology, 8 (1): 66-69.
- [20] Okay Y, Günöz A. 2009. Gölbaşı'na Endemik *Centaurea tchihatcheffii* Fisch. et Mey. Tohumlarının Çimlenmesi Üzerine Bazı Uygulamaların Etkisi. Tarım Bilimleri Dergisi, 15(2):119-126.
- [21] Schütz W. 1997. Primary dormancy and annual dormancy cycles in seeds of six temperate wetland sedges. Aquatic Botany, 59: 75-85.
- [22] Taiz L, Zeiger E. 1998. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, 792 p.
- [23] Hammat N, Evans PK. 1985. The *in vitro* propagation of an endangered species: *Centaurea junoniana* Svent. (Compositae). J. of Hort. Sci., 60 (1): 93-97.
- [24] Takashi H, Daisuke K. 1997. Micropropagation of *Centaurea macrocephala* Pushk. Ex. Willd. by shoot axis splitting, Hort Sci., 32 (6): 1124-1125.
- [25] Mallon R, Rodriguez-Oubina J, Luz Gonzalez M. 2011. Shoot regeneration from *in vitro*-derived leaf and root explants of *Centaurea ultraeae*. Plant Cell Tissue Organ Cult., 106 (3): 523-530.
- [26] Yüzbaşıoğlu E, Dalyan E, Bona M, Öz G. 2012. *In vitro* propagation of endemic plant *Centaurea arifolia* Boiss. Taxa. IUFS J Biol., 71(2):121-127.
- [27] Boşgelmez A, Boşgelmez İİ, Savcı AE, Aldemir A, Gürpınar H, Mutlu B, Topaloğlu S, Ege M, Çiçek N. 2005. Ankara-Gölbaşı ve *Centaurea tchihatcheffii*. 2. Bölüm, 131-178. (Editör: A. Boşgelmez), *Centaurea tchihatcheffii, Ankara-Gölbaşı Sevgi Çiçeği*. Bizim Büro Basımevi, Ankara, 570s.
- [28] Babaoğlu M, Yorgancılar M, Akbudak MA. 2001. Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri. Bitki Biyoteknolojisi Cilt I Doku Kültürü ve Uygulamaları (Editörler: M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan) s. 1-35, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya.
- [29] Tepe Ş. 2001. Nandede (*Mentha longifolia* L.) *in vitro* Kollusün Uygulaması ile Poliploid Bitki Eldesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 56s.
- [30] Bajaj YPS, Bopp M. 1971. Gewebekulturen in der Angewandten Botanik. Angew. Bot., 45: 115-151.
- [31] Pierik RLM. 1997. *In Vitro* Culture of Higher Plants. Fourth Edition ed. Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 213-220 pp.
- [32] Ağaoğlu YS, Çelik H, Çelik M. 1995. Genel Bahçe Bitkileri Kitabı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No:1579.