

***Centaurea tchihatcheffii*'NİN IN VITRO ÇOĞALTIMI**

126050

Çiğdem Alev ÖZEL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
(BİYOLOJİ)**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

126050

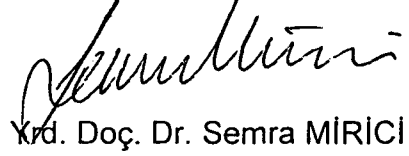
**Eylül 2002
ANKARA**

Çiğdem Alev ÖZEL tarafından hazırlanan *Centaurea tchihatcheffii*'NİN IN VITRO ÇOĞALTIMI adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.



Prof. Dr. Orhan ARSLAN

Tez Yöneticisi



Yrd. Doç. Dr. Semra MİRİCİ

Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir:

Başkan : Prof. Dr. Celâl ER



Üye : Prof. Dr. Orhan ARSLAN



Üye : Doç. Dr. Cengiz SANCAK



Üye : _____

Üye : _____

Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	v
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	vi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	9
2.1. Kuramsal Temeller.....	9
2.1.1. Bitki materyalinin yüzey sterilizasyonu.....	9
2.1.2. Bitki üretimi.....	9
2.1.2.1. Klasik yöntem.....	9
2.1.2.2. Modern yöntem.....	10
2.1.3. Doku kültürü.....	10
2.1.3.1. Adventif sürgün rejenerasyonu.....	11
2.1.3.2. Hızlı çoğaltım.....	11
2.1.3.3. Embriyo kültürü.....	13
2.2. Kaynak Araştırması.....	14
2.2.1. <i>Compositae</i> (<i>Asteracea</i>) familyasında sterilizasyon çalışmaları.....	14
2.2.2. <i>Compositae</i> (<i>Asteracea</i>) familyasında sürgün rejenerasyonu ve köklendirme.....	17
2.2.3. Değişik familyalarda <i>ex vitro</i> kök çalışmaları.....	22
3. MATERYAL ve METOT.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Bitki materyali.....	23
3.2. Metot.....	23
3.2.1. Büyüme ortamları ve kültür koşulları.....	23
3.2.2. Bitki büyüme düzenleyicileri.....	24
3.2.3. <i>In vitro</i> çalışmaları.....	25
3.2.3.1. Tohum sterilizasyonu ve çimlendirme.....	25
3.2.3.2. Koltuk altı meristemin sterilizasyonu ve hızlı çoğaltım.....	26
3.2.3.3. Kapitulaların sterilizasyonu ve embriyo kültürü.....	27
3.2.3.4. Rejenere olan <i>Centaurea</i> sürgünlerinin köklendirilmesi	28
3.2.4. <i>Ex vitro</i> 'da köklenme.....	28
3.2.4.1. Doğadan toplanan <i>Centaurea</i> genç sürgünlerinin sera koşullarında köklendirilmesi.....	28
3.2.5. Toprak analizi.....	28

3.2.6. İstatiksel değerlendirme.....	29
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	30
4.1. Yüzey Sterilizasyonu.....	30
4.1.1. <i>Centaurea tchihatcheffii</i> tohumlarının yüzey sterilizasyonu...	30
4.1.2. <i>Centaurea tchihatcheffii</i> olgunlaşmamış embriolarının yüzey sterilizasyonu.....	32
4.1.3. <i>C. tchihatcheffii</i> ' nin yeşil materyalinin yüzey sterilizasyonu.	33
4.2. Çimlenme.....	37
4.2.1. Tohum çimlenmesi.....	37
4.3. Hızlı çoğaltım.....	39
4.4. Adventif sürgün rejenerasyonu.....	42
4.4.1. Olgunlaşmamış embriyonik eksenden adventif sürgün rejenerasyonu.....	42
4.5. Köklendirme.....	47
4.5.1. Serada Köklendirme.....	47
4.5.2. Rejenere olan adventif sürgünlerin <i>In vitro</i> 'da köklendirilmesi	56
4.6. Toprak analizi.....	57
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	58
5.1. Sonuç.....	58
5.2. Öneriler.....	60
KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	69

***Centaurea tchihatcheffii*'NİN IN VITRO ÇOĞALTIMI**
(Yüksek Lisans Tezi)

Çiğdem Alev ÖZEL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Eylül 2002

ÖZET

Bu çalışmada soyu tükenmekte olan ve ticari öneme sahip endemik *Centaurea tchihatcheffii* bitkisinin *in vitro* çoğaltımı yapılmıştır. *Centaurea tchihatcheffii* bitkisinin tohum yüzey sterilizasyonunda bulaşıklık çok yüksek oranda olup çamaşır suyu dozu ve süreleri bakımından en iyi sonuç ve en yüksek değerler %50-10 dk; %60-10, 20 ve 30 dk doz ve uygulama sürelerinde elde edilmiştir. 13 gün +4°C de bırakılan ve karanlık inkübatörde bekletilen tohumlardan yalnızca 250 tanesinden biri 150 gün sonra çimlenmiştir. Doğadan getirilen yeşil bitkilerin sterilizasyonunda çift sterilizasyon ile %30 çamaşır suyu dozu ve 5 dk uygulama süresinde %33,3 oranında başarı sağlanmıştır fakat bu sağlam esplantlarında 6-10 hafta sonra tekrar bitkinin iç kısmında kalan bakteri ve funguslar tarafından bulaştığı görülmüştür. Hızlı çoğaltıma alınan sürgünlerden en iyi değerler 0,5 mg/l BAP - 0,01 mg/l CPA içeren ortamdan elde edilmiştir. Sürgünlerin az sayıda olduğu oluşan sürgünlerin boylarındaki artışın sınırlı olduğu gözlenmiştir. Embriyo kültürü çalışmasında ise %80 oranında bulaşıklık halledilmiş olup en iyi adventif sürgün oluşumu 1 mg/l KİN - 0,25 mg/l IBA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. *Ex vitro*'da, 10. günden itibaren 500 ppm IBA 10 dk uygulama süresinde en fazla kök oluşumu görülmüştür. *In vitro*'daki köklendirmede ise en iyi kök oluşumu 0,25 mg/l IBA içeren MS besin ortamında 12. günden itibaren elde edilmiştir.

Köklenme için kullanılan 0,5 mg/l IBA içeren MS besin ortamı hızlı çoğaltımdaymış gibi sürgün rejenerasyonunu teşvik etmiştir.

Bilim Kodu : 5001018

Anahtar Kelimeler : *Centaurea tchihatchiffii*, in vitro, ex vitro, yüzey sterilizasyonu, tohum çimlenme, hızlı çoğaltım, embriyogenezis, köklenme.

Sayfa Adedi : 69

Tez Yöneticileri : Prof. Dr. Orhan ARSLAN, Yrd. Doç. Dr. Semra MİRİCİ



IN VITRO PROPAGATION OF *Centaurea tchihatcheffii*
(M.Sc. Thesis)

Çiğdem Alev ÖZEL

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
September 2002

ABSTRACT

The research was carried out to study endemic and commercially important ornamental *Centaurea tchihatcheffii*. High frequency of contamination was noted down, when surface sterilizing the seeds. Least uncontaminated seeds were obtained from 50% commercial bleach with application time of 10 minutes and 60% commercial bleach with application time of 10, 20, or 30 minutes. Only one seed out of 250 seeds placed at +4°C for 13 days under dark, germinated after 150 days. The green material from wild was double sterilised using 30% commercial bleach for 5 minutes; however, it resulted in partial success of 33.3%. However, after 5-6 weeks in culture, the contamination reappeared from the systemic fungus or bacteria. The best micropropagation results were obtained from MS medium containing 0.5 mg/l BAP and 0.01 mg/l CPA. Developing shoots were limited, dwarf and dominantly vitrified. Eighty percent sterilisation was achieved from immature embryos. The best shoot regeneration was achieved on MS medium containing 1 mg/l Kinetin – 0.25 mg/l IBA. Rooting study was carried out both under *in vitro* and *ex vitro* conditions. The best rooting response was obtained from shoots treated with 500 ppm IBA for 10 minutes under *ex vitro* conditions after 10 days. Under *in vitro* conditions, rooting started after 12 days on MS medium containing 0.25 mg/l IBA. The rooting medium containing 0.5 mg/l IBA resulted in

development of multiple shoots that was very similar to micropropagation.

Science code : 5001018

Key words : *Centaurea tchihatchiffii*, *in vitro*, *ex vitro*, surface sterilisation, seed germination, micro propagation, embryogenesis, rooting.

Page Number : 69

Advisers : Prof. Dr. Orhan ARSLAN, Assis. Prof. Dr. Semra MİRİCİ



TEŞEKKÜR

Bana bu konuda çalışma imkanı sağlayan, çalıőmam boyunca yol gösterip, yardım ve desteğini esirgemeyen danıőmam hocalarım Prof. Dr. Orhan ARSLAN ve Yrd. Doç. Dr. Semra MİRİCİ'ye, *Centaurea tchihatcheffii*' nin korunması çalıőmalarını yürüten Prof. Dr. Mecit VURAL'a, çalıőmalarımda verdiği teővikten dolayı ve laboratuvar olanaklarını kullanmamı sağlayan, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölüm Baőkanı Prof. Dr. Celal ER'e, Doç. Dr. Sebahattin ÖZCAN'a ve Doç. Dr. Cengiz SANCAK'a, çalıőmamın her aşamasında yardım ve desteğini gördüğüm Dr. Khalid Mahmood KHAWAR'a teőekkürlerimi sunarım. Ayrıca Dr. Serkan URANBEY'e, Araő. Gör. Satı 'ye, Araő. Gör. İskender PARMAKSIZ'a, ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma çalıőmalarımdaki her türlü katkılarından dolayı teşekkür ederim. Yine tez çalıőmalarım boyunca gösterdikleri anlayıőtan ve destekten dolayı aileme teşekkür ederim.

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1.	Türkiye'deki bitkilerin tehlike kategorilerine göre sınıflandırılması..... 3
Çizelge 1.2.	Türkiye'deki <i>Compositae</i> familyasına ait CR kapsamına giren <i>Centaurea</i> cinsine ait türler ve yayılış alanları..... 5
Çizelge 3.1.	Murashige and Skoog ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları..... 24
Çizelge 3.2.	Kullanılan hormon dozları ve çözücüleri 25
Çizelge 3.3.	Koltuk altı meristeminin sterilizasyonu için kullanılan çamaşır suyu dozları ve süreleri..... 26
Çizelge 3.4.	<i>Centaurea tchihatcheffii</i> 'nin olgunlaşmamış embriyo eksplantlarında kullanılan farklı BAP, Kinetin ve NAA büyüme düzenleyicilerini içeren ortamlar ve kültür süreleri..... 27
Çizelge 4.1.	Farklı Çamaşır suyu konsantrasyonlarının ve muamele sürelerinin <i>Centaurea tchihatcheffii</i> tohumlarının yüzey sterilizasyonundaki etkisine ait varyans analizi..... 30
Çizelge 4.2.	Farklı Çamaşır suyu konsantrasyonlarının ve muamele sürelerinin <i>Centaurea tchihatcheffii</i> tohumlarının yüzey sterilizasyonundaki etkisine ait Duncan sonuçları..... 31
Çizelge 4.3.	<i>Centaurea tchihatcheffii</i> olgunlaşmamış embriyolarının %50 Çamaşır suyu konsantrasyonu ve farklı muamele sürelerinin yüzey sterilizasyonuna ait varyans analizi..... 33
Çizelge 4.4.	<i>Centaurea tchihatcheffii</i> olgunlaşmamış embriyolarının %50 çamaşır suyu konsantrasyonu ve farklı muamele sürelerinin yüzey sterilizasyonuna etkisine ait Duncan sonuçları..... 33
Çizelge 4.5.	Farklı Çamaşır suyu konsantrasyonlarının ve muamele sürelerinin <i>Centaurea tchihatcheffii</i> yeşil materyalinin yüzey sterilizasyonundaki etkisine ait

	varyans analizi.....	34
Çizelge 4.6.	Farklı çamaşır suyu konsantrasyonlarının ve muamele sürelerinin yeşil materyalin yüzey sterilizasyona ait Duncan sonuçları.....	36
Çizelge 4.7.	GA ₃ , karanlık ve aydınlık muamelerinin <i>Centaurea</i> tohumlarının çimlenmesi üzerine ait varyans analizi sonuçları.....	38
Çizelge 4.8.	<i>Centaurea tchihatcheffii</i> koltuk altı meristemlerinin hızlı çoğaltılmasına ait varyans analizi sonuçları.....	41
Çizelge 4.9.	<i>C. tchihatcheffii</i> koltuk altı meristemlerinin 0,5 mg/l BAP ve 0,01 mg/l IAA ve CPA'in hızlı çoğaltımına etkisine ait Duncan sonuçları.....	42
Çizelge 4.10.	Olgunlaşmamış embriyonik eksenden dört haftalık adventif sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları	43
Çizelge 4.11.	Olgunlaşmamış embriyonik eksenden dört haftalık adventif sürgün rejenerasyonuna ait Duncan sonuçları.....	44
Çizelge 4.12.	<i>Centaurea</i> 10 cm'lik sürgünlerinden sera koşullarında köklendirmesine ait 1 haftalık sonuçların varyans analizi.....	50
Çizelge 4.13.	<i>Centaurea</i> 10 cm sürgünlerinden (1 haftalık) sera koşullarında köklendirmesine ait Duncan sonuçları.....	51
Çizelge 4.14.	<i>Centaurea</i> sürgünlerinin (2 haftalık) sera koşullarında köklendirmesine ait sonuçların varyans analizi	54
Çizelge 4.15.	<i>Centaurea</i> sürgünlerinin (2 haftalık) sera koşullarında köklendirmesine ait Duncan sonuçları.....	55
Çizelge 4.16.	<i>Centaurea tchihatcheffii'</i> nin yayılış alanındaki toprak yapısı.....	57

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Türkiye'de bulunan <i>Centaurea</i> endemik bitkileri haritası	4
Şekil 1.2. Çalışmada kullanılan <i>Centaurea tchihatchefii</i> bitkisinin tam açmış çiçeği	6
Şekil 4.1. Doğadan toplanan <i>Centaurea tchihatchefii</i> 'nin koltuk altı meristemlerindeki yüzey sterilizasyonuna ait bulaşıklık	35
Şekil 4.2. <i>Centaurea tchihatchefii</i> 'nin olgun tohumdan çimlenmesi (a) yandan görünüşü (b) üstten görünüşü (c) alttan (b) görünüşü.....	38
Şekil 4.3. Doğadan toplanan <i>C. tchihatchefii</i> 'nin genç sürgünlerinin hızlı çoğaltıma alındıktan sonraki (a) 1. hafta (b) 2. hafta (c) 3. hafta (d) 4. hafta.....	40
Şekil 4.4. Doğadan toplanan <i>Centaurea tchihatchefii</i> sürgünlerden hızlı çoğaltım çalışmasında yüksek oranda vitrifikasyon ve sararma	42
Şekil 4.5. <i>C. tchihatchefii</i> 'nin çiçek safhaları	45
Şekil 4.6. <i>C. tchihatchefii</i> 'nin tohum safhaları.....	45
Şekil 4.7. Olgunlaşmamış embriyodan adventif sürgün rejenerasyonu (a) KIN içeren besin ortamında 5 gün sonraki kallus oluşumu (b) BAP içeren MS besin ortamında 1 hafta sonra sürgün uçlarının gelişimi (c) KIN içeren MS besin ortamında 1 hafta sonra sürgün uçlarının gelişimi (d) KIN içeren MS besin ortamında 1,5 hafta sonra sürgün uçlarının gelişimi (e) KIN içeren MS besin ortamında 3 hafta sonra sürgün gelişimi ...	46
Şekil 4.8. KIN içeren MS besin ortamında olgunlaşmamış embriyodan 6 hafta sonraki adventif sürgün gelişimi (a) üstten görünüşü (b) yandan görünüşü.....	47
Şekil 4.9. (a,b) Laboratuvar çalışmasında kolaylık sağlamak amacıyla doğadan toplanan <i>Centaurea tchihatchefii</i> bitkisinin sera koşullarında muhafazası (c,d) <i>Centaurea tchihatchefii</i> genç sürgünlerin sera koşullarında tohum elde etmek amacıyla IBA muamelesi ile köklenme denemesi (e,f) Köklenen ve çiçeklenen bitkilerin saksılara aktarılması.....	48

- Şekil 4.10. Doğadan toplanan yeşil sürgünlerden sera koşullarında değişik IBA doz ve sürgünlerinde köklenme çalışması (a) kontrol (b) 500 ppm IBA 5 dk (c) 500 ppm IBA 10 dk (d) 500 ppm IBA 15 dk (e) 1000 ppm IBA 5 dk (f) 1000 ppm IBA 10 dk (g) 1000 ppm IBA 15 dk uygulamalarına ait köklenme 49
- Şekil 4.11. *In vitro*'da 0.5 mg/l IBA içeren MS besin ortamında köklendirme (a) üstten (b) yandan (c) alttan görünüşü 57



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simge ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
BAP	6 Benzil aminopurin
2,4-D	2,4 Diklorofenoksi asetik asit
CaOCI	Kalsiyum Hipoklorit
CPA	Klorofenoksi asetik asit
cm, mm	Santimetre, milimetre
ÇS	Çamaşır suyu
dk, sn	Dakika, saniye
DMSO	Dimetilsulfoksit
GA ₃	Gibberellik asit
G, mg, µg	Gram, miligram, mikrogram
HCl	Hidroklorikasit
H ₂ SO ₄	Sülfirik asit
IBA	Indolbutirik asit
IAA	Indol asetik asit
KO	Kareler ortalama
K ₂ CrO ₃	Potasyum dikromat
KIN	Kinetin
L, ml, µl	Litre, mili litre, mikro litre
µM	Mikro molar
MS	Murashige and Skoog bazal tuzları
MSO	Hormonsuz Murashige and Skoog bazal tuzları
NAA	Naftalin asetik asit
NaOCI	Sodyum hipoklorit
NaOH	Sodyum hidroksit
N	Normal
Nm	Nano metre
NB	Nutrient broth
LS	Linsmair and skoog bazal tuzları
ppm	Parts per million (milyonda bir)
PPM	Plant preservation mixture (Bitki koruma karışımı)
SD	Serbestlik derecesi
TDZ	Thidiazuron (1 Phenyl 3-(1,2,3-thidiazol 5yL) urea)
UV	Ultra viyole
u/V	Unit/volume (birim/hacim)
VK	Varyasyon kaynakları
IUCN	International Union for conservation of nature (Doğanın korunması amacıyla uluslararası birliği)

1. GİRİŞ

Canlılar aleminin belli tür ve sistematik grupları belirli bölge ve kıtalar için özeldir. Sadece belli bir bölgeye özgü olan canlılara ise endemik form adı verilmektedir. Dünyada yetişen bitki türlerinin, özellikle sınırlı yayılışa sahip endemiklerin, korunmaları konusunda son yıllarda oldukça ciddi çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle bu bitkilerin tehlike sınıflarından hangisine ait olduğu saptanarak, alınacak tedbirlerde öncelik, halen çok baskı altında olup nesli kaybolma tehtidi altında olanlara verilmektedir. Bu amaçla IUCN'in The World Conservation Union, TPC (Theratedened Plant Commitee) sekreterliği, WWF (World Wildlife Foundation), OPTIMA (Organization for the Phyto - Taxonomic Investigation of the Mediterranean Area) gibi kuruluşların faaliyetleri yanında, her ülke kendi bitkilerini korumak amacıyla çeşitli önlemler almaktadır. Türkiye, 9000 civarında eğrelti ve tohumlu bitki türü ile dünyada bulunduğu iklim kuşağında oldukça zengin floraya sahip ülkelerden biridir (Seçmen vd., 1995). Avrupa kıta florasının 12000'e yakın türe sahip olduğu ve kıtanın ülkemizin yaklaşık 15 katı büyüklükte olduğu düşünülürse, Türkiye'nin floristik zenginliği daha da belirginleşir. Türkiye florasının ilginçliği, sahip olduğu tür zenginliğinin yanında, çok sayıda endemik tür içermesinden de kaynaklanır. Avrupa ülkelerindeki endemik türlerin toplamı 2750 kadar iken Türkiye'de bu sayı 3000 civarındadır (Ekim vd., 2000). Türkiye'de bulunan endemik bitkilerin tamamı ile endemik olmayıp (non-endemik) soyu tehdit altında olan türler ilk kez 1980'li yıllarda kabul edilen uluslararası IUCN tehlike kategorilerine göre sınıflandırılmıştır (Ekim vd., 1989). Bu sınıflandırmada; aşağıdaki kategoriler belirlenmiştir.

EX- Extinct- Tükenmiş: Şayet son ferдин öldüğü konusunda hiçbir şüphe yoksa bu takson EX kategorisindedir.

EW- Extinct in the wild - Doğada tükenmiş: Takson bulunabileceği ortamlarda ve yılın farklı zamanlarında yapılan ayrıntılı araştırmalarda bulunamamış yani doğada kaybolmuş ve yalnız kültüre alınmış bir şekilde yaşamaya devam ediyorsa bu gruba konur.

EN- Endangered - Tehlikede: Bir takson oldukça yüksek risk altında ve yakın gelecekte yok olma tehlikesi altında ancak henüz CR grubunda değilse EN grubuna konur.

VU- Vulnerable - Zarar görebilir: CR ve EN gruplarına konamamakla birlikte doğada orta vadeli gelecekte yüksek tehdit altında olan taksonlar bu gruba konur.

LR- Lower risk - Tehdit altında: Populasyonları iyi ve en az 5 lokaliteden bilinenler bu kategoriye konulmuştur. Gelecekteki durumlarına göre 3 alt kategorisi vardır.

a- (cd) Conservation dependent - Koruma önlemi gerektiren: 5 yıl içinde yukarıdaki kategorilerden birisine girebilecek taksonlar. Hem tür hem de habitat açısından özel bir koruma statüsü gerektirenler.

b- (nt) Near threatened - Tehdit altına girebilir: Bir evvelki kategoriye konamayan ancak VU kategorisine konmaya yakın adaylar.

c- (lc) Least deficient - En az endişe verici: Herhangi bir koruma gerektirmeyen ve tehdit altında olmayanlar.

DD- Data deficient - Veri yetersiz: Bir taksonun dağılım ve bolluğu hakkındaki bilgi yetersiz ise, takson bu gruba konur.

CR- Critically endangered - Çok tehlikede: Bir takson çok yakın gelecekte yok olma riski altında ise bu gruba konur.

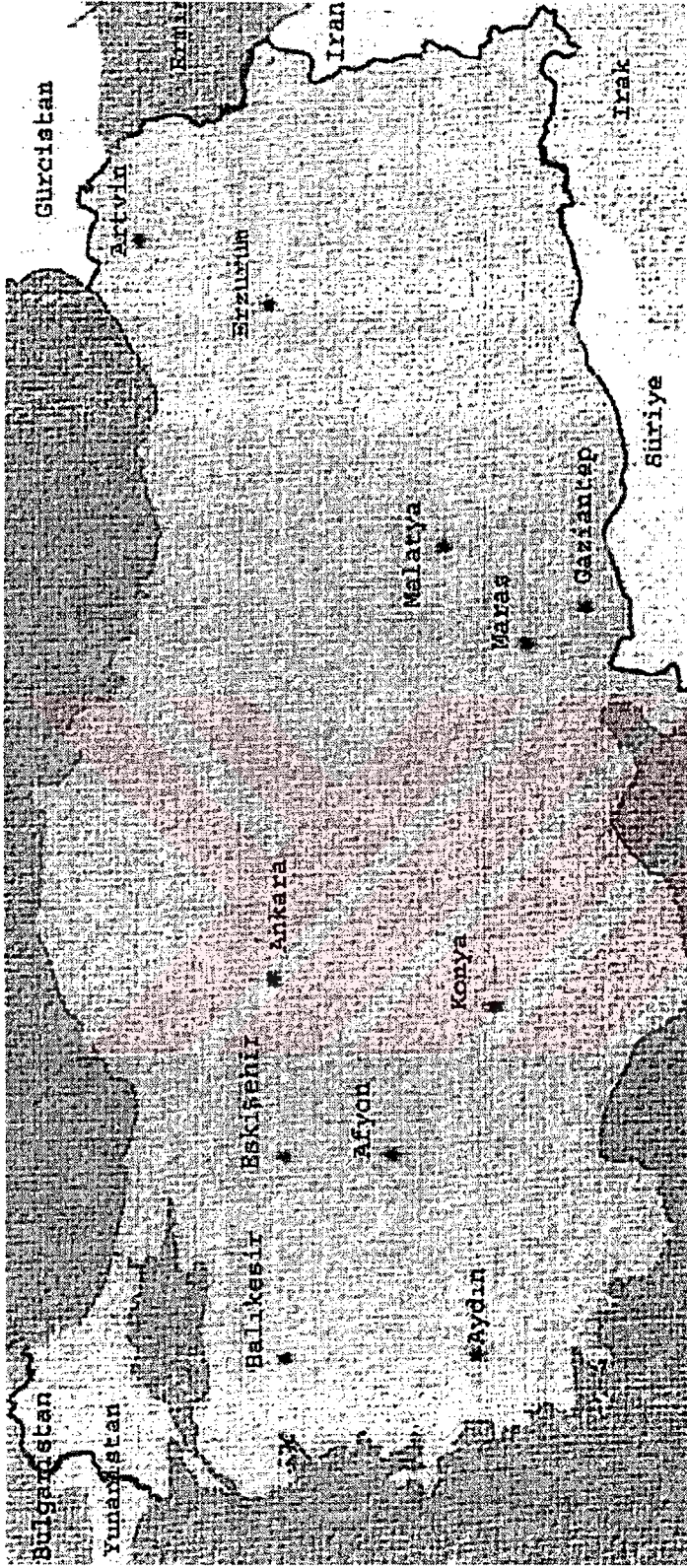
NE- Not evaluated – Değerlendirilemeyen: Yukarıdaki herhangi bir kriter ile değerlendirilmeyenler bu gruba konur.

Şekil 1.1'de Türkiye'de bulunan *Centaurea* endemik bitkileri haritası verilmiştir.

Çizelge 1.1. Türkiye'deki bitkilerin tehlike kategorilerine göre sınıflandırılması

Kategoriler	EX	EW	CR	EN	VU	LR (lc)	LR (cd)	LR (nt)	DD	NE
Endemik Bitki	12	-	171	774	668	769	470	347	270	3
Endemik Olmayan Bitki	1	-	10	69	769	-	-	-	244	3
Toplam	13	-	181	843	1457	769	470	347	514	6

Ekim vd. 2000



Şekil 1.1. Türkiye'de bulunan *Centaurea* endemik bitkileri haritası

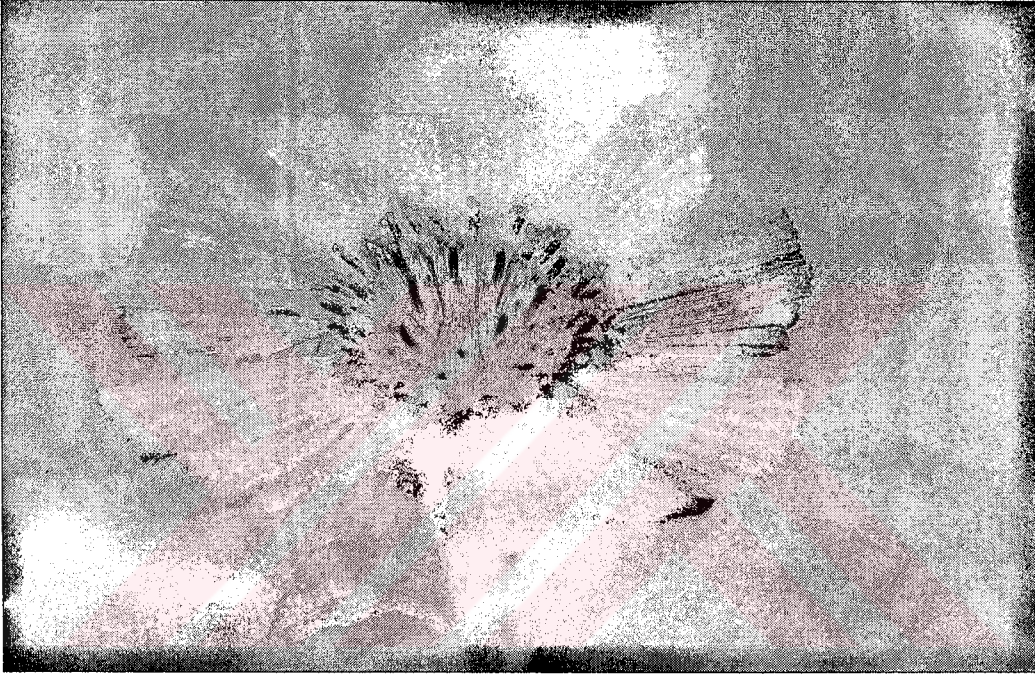
Türkiyedeki Compositae familyasına ait CR kapsamına giren tür sayısı 92'dir. *Centaurea* cinsine ait olanlar ise Çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Türkiyedeki *Compositae* familyasına ait CR kapsamına giren *Centaurea* cinsine ait türler ve yayılış alanları

Tür Adı	Yayıliş Alanları
<i>Centaurea brevifimbriata</i>	Malatya
<i>Centaurea cariensiformis</i>	Kahramanmaraş
<i>Centaurea hadimensis</i>	Konya
<i>Centaurea haussknechtii</i>	Gaziantep
<i>Centaurea iconiensis</i>	Konya
<i>Centaurea leptophylla</i>	Artvin
<i>Centaurea mykalea</i>	Aydın
<i>Centaurea nivea</i>	Eskişehir
<i>Centaurea sericea</i>	Balıkesir
<i>Centaurea straminicephala</i>	Erzurum
<i>Centaurea taochia</i>	Erzurum
<i>Centaurea tchihatcheffii</i>	Afyon, Ankara

Çalışmada kullanılan bitki *C. tchihatcheffii* Compositae (Asteraceae) (Papatyagiller) familyasına aittir (Şekil 1.1). Bu familyaya ait bitkilerin bazıları süt içeren otsular, çalılar veya nadiren ağaç veya tırmanıcılarıdır. Yapraklar genellikle alternat veya karşılıklıdır. Nadiren dairesel, basit veya bileşikdir. Çiçekler kapitulum durumunda, kapitilmun çevresi 1-çok serili involukrum brakteleri ile örtülmüş, erdişi veya tek eşeyli, ışınsal veya zigomorf simetridir. Kaliks genellikle papus halini almış veya hemen hemen yoktur. Petaller 4-5 birleşiktir. Korolla iki şekilde, tüpsü ve dilsî; tüpsü korola uçta belirgin 5 dişli, dilsî korolla 3-5 dişli veya dişler belirgin değildir. Stamenler 5, petallere bağlı, filamentler serbest, anterler birleşiktir. Pistil 1, ovaryum alt durumlu, tek lokuslu. 2 karpelli, ovül tek anatrop, plesantasyon bazalıdır. Meyva aken ve ucunda genellikle bir papus taşır. Kozmopolit olan familya

yaklaşık 1100 cins ve 2500 tür içerir. Ülkemizde 133 cins ve 1156 kadar türü bulunur (Davis, 1975; Seçmen, 1995). Bu cinslerden biri olan *Centaurea*'nın (peygamber çiçeği, gelin düğmesi) kapitula heterogram, diskoid veya radianttır. Involukrum brakteleri çok serili çiçek tablası kılıdır. Çiçekler pembe mor mavi sarı veya beyazımsıdır (Davis, 1975). Ülkemizde 178 den fazla türü bulunur.



Şekil 1.2. Çalışmada kullanılan *C. tchihatcheffii* bitkisinin tam açmış çiçeği

Ülkemizde tıbbi bitki olarak; *Centaurea cyanus* L., *C. behen* L., *C. calcitrapa* L., *C. iberica* L., *C. jacea* L., halk arasında ishal kesici, kuvvet verici, iştah açıcı, göğüs yumuşatıcı ve mide rahatsızlıklarını giderici olarak kullanılan *Centaurea* türleridir (Bâytop, 1984). Yine ülkemizde süs bitkisi özelliğinde olan kesme çiçek ve kurutulmuş çiçek olarak kullanılan pek çok *Centaurea* türü bulunmaktadır. *Centaurea tchihatcheffii*'de bu türlerden biri olup tek yıllık 25-30 cm uzunluğunda nisan sonlarında ve mayısta çiçek açan bu süs bitkisine çok güzel ve çarpıcı mor-kırmızı çiçeklerinden dolayı yanar döner adı verilmiştir. Her ne kadar 1848 yılında Afyon çevresinden bir kayıt bulunmakta ise de, şu ana kadar bu ilimizden ikinci bir kayıt gelmemiştir (Ekim vd., 2000). Bu nedenle Ankara Gölbaşı'nda yetişen *Centaurea*

tcihatceheffi'nin dünyada sadece tek lokalitede temsil edildiğini söyleyebiliriz. Önceleri Gölbaşı çevrelerindeki tarlalarda yaygın olmakla birlikte tarlalara uygulanan herbisitler (yabancı otları öldürmek için kullanılan kimyasallar) ve geçmiş yıllarda bilinçsizce toplanıp Ankara pazarlarında kesme çiçek olarak satılması nedeniyle Mogan Gölü kenarında tesis edilen birkaç hektarlık Ankara Valiliği Çevre Koruma Vakfına ait başarısız bir ağaçlandırma alanı olan Süleyman Demirel Ormanı'nda kendisine 3-5 kilometrekareden daha dar bir yaşam yeri bulmuştur (Vural ve Adıgüzel, 2001; Ekim, 1994; Ekim vd., 2000).

Ne yazık ki, bitkilerin hangi amaca yönelik kullanılacağı tesbit edilemeden yeryüzünden pek çok bitki türü kaybolmaktadır (Synge, 1981). Soyu tehdit altındaki türlerin korunması amacıyla, doku kültürü ile çoğaltım yararlı bir yöntem olabilir (Woods, 1982). Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay besi ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları = eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir. Doku kültürü teknikleri ile yeni çeşit geliştirebilmek ve mevcut çeşitlerde genetiksel iyileştirme çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılmasında zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır. Bitki doku kültürü işlemlerinde ve genetik iyileştirmede kullanılan temel sistem bitki rejenerasyonudur. Bitki rejenerasyonu, kültürü yapılan bitkilerin özellikleri açısından üç kısımda incelenebilir; (1) organize olmuş meristematik hücreleri ihtiva eden somatik dokulardan rejenerasyon, (2) meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon ve (3) mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden rejenerasyon.

Birinci tip rejenerasyon da uç ve yan meristemlerden bitki çoğaltılır. Buna meristem kültürü yoluyla klonal çoğaltım denir. Elde edilen hücreler tamamen

donör (verici) bitkiye benzerler. Çalışmamızda koltuk altı meristemlerinden hızlı çoğaltım yapılmasında bu doku kültürü yönteminden yararlanılmıştır.

İkinci tip rejenerasyon; doğrudan bir eksplantın kesilmiş yüzeylerindeki belirli somatik hücrelerin bir kısmının genellikle bitki büyüme düzenleyicilerinin (oksin ve sitokininler) etkisi sonucu bölünerek ve organize olarak, organları ve daha sonra da bitkiyi (direkt organogenesis) veya bir somatik hücrenin sürekli bölünerek embriyo ve daha sonra da tam bir bitkiyi oluşturması şeklinde olabilir. Ayrıca her iki durum, belirli bir kallus proto-kallus veya hücre süspansiyonu oluşumu devresinden sonra da ortaya çıkabilir (indirekt rejenerasyon). Ortaya çıkan bitkilerde bazı kalıtsal veya geçici varyasyonlar oluşabilir. Bu çalışmada yapılan embriyo kültürü ikinci tip rejenerasyona dahil olup endirekt organogenesis yoluyla adventif sürgün rejenerasyonu amaçlanmıştır.

Son olarak normal kromozom sayısının yarısını ihtiva eden hücrelerden de direkt veya dolaylı yollarla bitki rejenerasyonu olabilir. Bu durumda donör bitkinin kromozom sayısının yarısına sahip, genellikle steril olan haploid bitkiler elde edilebilir (Babaoğlu vd., 2001).

Bu çalışmada, soyu tükenmekte ve tehdit altında olan; aynı zamanda süs bitkisi olarak ticari öneme sahip *Centaurea tchihatceheffii*'nin (yanar döner) bitkisinin *in vitro* çoğaltımı ve adventif sürgün rejenerasyonu amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kuramsal Temeller

2.1.1. Bitki materyalinin yüzey sterilizasyonu

Yüzey sterilizasyonu doku kültürü işlemleri arasında en önemli aşamalardan biridir. Doku kültüründe en uygun eksplant kaynağını, daha önceden sterilize edilmiş tohumlardan elde edilen aseptik fideler oluşturur. Çünkü bu şekilde elde edilen fidelerin sterilizasyona ihtiyacı olmamakta ve yüzey sterilizasyon işleminin zararlı etkilerinden sakınılmaktadır. Eğer böyle bir şans yoksa, dış şartlardan (tarla, sera vb.) alınan eksplantlar (tohum, yumru, yaprak, gövde, sürgün ucu vb.) öncelikle musluk suyu altında yarım saat tutulurlar. Tohum ve yumru gibi kaba parçalar 1-20 saniye alkol içinde tutulduktan sonra gerçek yüzey sterilizasyonu ortamına konulurlar. Yüzey sterilizasyonu için en fazla kullanılan maddeler etil alkol, sodyum veya kalsiyum hipoklorit, civa klorür, gümüş nitrat ve hidrojen peroksittir (Babaoğlu vd., 2001).

2.1.2. Bitki üretimi

Bitki üretiminde üstün kaliteli ve verimli çeşitler geliştirmek amacıyla binlerce yıldır bitki ıslahı yöntemleri kullanılmaktadır. Bitki ıslah yöntemlerini klasik ve modern ıslah metotları olarak ikiye ayırmak mümkündür.

2.1.2.1. Klasik yöntem

Bugün klasik bitki ıslahının tarım üretimini artırmasındaki payı büyük olmasına rağmen bu yöntemler yavaştır ve sonuca ulaşmak zaman alıcıdır. ıslahı yapılan bitkinin kalitesi ve miktarının artırılması seleksiyonda öncelikli olduğu için, bu bitkiler hastalık ve zararlılara karşı dayanıksız olmaktadır. İstenilen özelliklerle istenmeyen özellikler de melez döllere geçebilmektedir. Klasik yöntemler de eşeyssel ve eşeyssel olmayan yöntemlerden yararlanılmaktadır.

Bu yetiştirme tekniklerinden bir tanesi eşeysel üretilimdir. Bunun için ya yapay polenleme ya da tohum kullanılır. Yapay yolla döllenmeyi gerçekleştirebilmek için self-steril bir bitkinin tohumları kullanılır. Vejetatif yolla ürememiş bir bitkinin çiçeğindeki polenler, bir fırça ile diğeri bitkinin çiçeğine taşınabilir. Tohumların çimlendirilmesi yoluyla da üretim yapılabilir. Bu yöntem daha çok vejetatif üretimlerinde sorun bulunan bitkilerde uygulanmaktadır.

İkinci üretim şekli ise eşesiz üretilimdir. Bunun için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bitkide oluşan küçük filizler kesilerek tepe kısmı yukarıya gelecek şekilde toprağa dikilir ve yeni bitkiler elde edilir. Bazı bitkilerde rizom yeni bir yavru bitki oluşturur. Yavru zamanla sürgün verir ve yeni bir bitki meydana gelir. Bu bitkiler birbirinden ayrılarak pekçok yeni bitki elde edilebilir. Bazı türlerde de bitkinin çiçek sapında köklü yavru bir bitki oluşur. Diğeri bir yöntemde, büyüme rizomu bulunan bitkilerin rizomlarının küçük parçalar şeklinde kesilip su bulunan bir kaba yerleştirilmesi ve yeni bitkilerin elde edilmesidir. Bazı bitkilerde de yeni bitki elde etmek için yapraklar kullanılır. Kullanılan yöntemlerden biri de, ana bitkinin kesilmesi ile üretilimdir. Nodyum bölgesi bulunan bitkilerde nodyum bölgesinden kesim yapılarak toprağa dikilir ve yeni bireyler elde edilir (Cirik vd.,2001).

2.1.2.2. Modern yöntem

Klasik yollarla bitki üretiminde karşılaşılan problemlere çözüm olarak günümüzde modern ıslah metodları uygulanmaya başlamıştır. Bunların başında da doku kültürleri, organogenezis, somatik embriyogenezis, protoplast kültürü, protoplast füzyonu, haploid bitki üretimi, hastalısız bitki üretimi, sekonder metabolit üretimi, mikro çoğaltım, embriyo kültürü, germplazm depolanması ve somaklonal varyasyon gelir.

2.1.3. Doku kültürü

Bitki doku kültürleri, bitkilerin doku, organ, hücre ya da hücre kısımlarının bitkiden ayrılarak (izole edilerek) kapalı ve cam kaplarda '*in vitro*', suni besin

ortamında ve steril şartlar altında yetiştirilerek bütün organları tam bitkilerin elde edilmesi işlemidir (Biondi, 1982).

Doku kültürleri ile vegetatif üretimin esası sürgün meristemlerinin oluşmasını ve çoğalmasını sağlamaktır. Bir bitkinin vegetatif olarak çoğaltılması, koltuk altı (axillary) ve adventif olmak üzere iki şekilde bulunan sürgün meristemlerinin oluşumuna bağlıdır.

2.1.3.1. Adventif sürgün rejenerasyonu

Bitkiler; izole edilmiş bir sürgün, kök, yaprak, çiçekler ve hatta organize olmamış kallus gibi dokulardan bütün bir organizmayı rejenerasyon edebilme kapasitesine sahiptirler (Gönülşen, 1987). *In vitro*'da hücre ve dokulardan sürgün rejenerasyonunu başarabilmek için uygun eksplantın seçilmesi, büyümede aktif maddeleri içeren uygun ortamın belirlenmesi ve fiziksel çevre koşullarını uygun olması gerekmektedir (Murassige, 1974; Evans et al., 1981; Ammirato, 1983).

Doku kültüründe en çok kullanılan temel ortam Murassige and Skoog (1962)'un geliştirdiği besin ortamıdır. Bitki rejenerasyonunda kullanılan besin ortamları bitki büyümesi için gerekli olan makro ve mikro elementler ile enerji kaynağı şekeri içerir. Bu ortamlar agar ilave edilerek katılaştırılır. Besin ortamına eklenen bitki büyümesini düzenleyiciler de bitki rejenerasyonunda en önemli faktörlerdir. Genelde, yüksek oranda oksin (IAA, IBA, NAA, 2,4-D) bulunan ortamlar kallus ve kök gelişimini teşvik ederler (Miller and Skoog, 1953; Paulet, 1965; Nitsch, 1968). Sitokininlerin (BAP, TDZ, 2İP, Zeatin, Kinetin) bulunduğu ortamlarda ise adventif sürgün rejenerasyonu teşvik edilir.

2.1.3.2. Hızlı çoğaltım (mikro çoğaltım)

Sürgün ucu ve koltuk sürgünü gibi meristemler izole edilerek kültüre alınır. Gelişmiş bitkilerin çoğunda, her yaprağın koltuğunda meristem (axillary meristem) bulunmaktadır. Ana uç meristemlerinin bir kopyası olan bu meristemler, lateral sürgün veya dal meydana getirme potansiyeline sahiptir

(Gönülşen, 1987). Bu sistem, meristem sayılarının artırılması bakımından önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. Mikro üretimde bu özellikten yararlanılmaktadır. Örneğin; hormonsuz bir ortamda kültüre alınan sürgün uçları, dallanmadan tek bir sürgün şeklinde gelişmektedir (Gönülşen ve Özcan, 1983). Oysa sitokin içeren gıda ortamında kültüre alındığında, sürgün uçları çok sürgünden oluşan küçük bir demet şeklinde gelişmektedir. Gıda ortamında sitokin bulunması, kök oluşumunu genelde engellemektedir. Bu nedenle sürgün sayısının çoğaltılması arzu edildiği sürece gıda ortamında bulunması istenen sitokin, kök oluşumu istendiğinde ortama ilave edilmemelidir. Sürgünler bitkinin özelliğine göre ya sitokininsiz ya da köklenmeyi uyarıcı hormonları içeren bir gıda ortamına transfer edilir.

Doku kültürü tekniklerini kullanarak yapılan çoğaltım (mikro üretim) pahalı olmasına karşın, kısa sürede fazla sayıda bitki ekonomik olarak elde edilebilmektedir. 1991 yılı verilerine göre dünyada saksılı çiçekler, kesme çiçekler, meyve ağaçları ve geofitlerde mikroçoğaltım yöntemleri kullanılarak yaklaşık 600 milyon bitki elde edilmiştir (Werbrouck and Debergh, 1994).

Hızlı çoğaltımın avantajları;

- Bu teknikle bitkilerin *In vitro* şartlarda kısa bir sürede, fazla sayıda çoğaltılabilmesi mümkün olmaktadır. Bu sayede ekonomik önemi olan pekçok bitkinin kısa bir zamanda ticari amaçlara uygun miktarda çoğaltılması başarılabilmektedir.
- Virüs ve diğer sistemik hastalıklar, vegetatif çoğalma yoluyla bitkiden bitkiye kolaylıkla geçmektedir. Bu tip hastalıklar, ürünün kalite ve kantitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Yine bu teknik sayesinde, hastalıklardan arındırılmış olan stoklardan üretim mümkün olabilmektedir.
- Bu teknikle yıl boyu üretim yapılabilmektedir.

- Kùltür aşamasında olan bitkiler kolaylıkla ùlkeler arasında transfer edilebilmektedir.

Mutasyonlar, organ ve somatik embriyo oluşumu, organ ve somatik embriyoların rejenerasyon yeteneklerini kaybetmesi, köklenme problemleri (çalı ve odunsu bitkilerde), toksik bileşiklerin ortamda birikmesi, vitrifikasyon (camlaşma) kontaminasyon ve bitkilerin kùltür tüplerinden toprağa aktarılmasında karşılaşılan zorlular mikro çoğaltımda ortaya çıkan başlıca sorunlardır.

2.1.3.3. Embriyo kùltürü

Tohumun dışında embriyoların kùltürü fikri yeni değildir. Bonnet 1754'te fasülye (*Phaseolus multiflorus*)'de olgun tohumların kotiledonlarından embriyoları çıkararak çimlendirmiştir (Crocer and Barton, 1954). Ancak, bu konudaki esas başarılı çalışmalar Hanning (1954) tarafından yapılmıştır (Carl and George, 1938; Crocer and Barton, 1954; Yeung, 1981). Embriyo kùltürünün esas; çalışılan bitki ve konuya göre değişiklik göstermekle beraber genel olarak şöyledir:

Tozlanıp dölleme gerçekleşikten sonra tohum içinde bulunan ve belirli bir gelişme safhasındaki embriyoların (daha ziyade iğ formuna sahip genç embriyoların) aseptik şartlarda tohumdan çıkarılması ve uygun bir besi ortamına transfer edilerek tam bir bitki geliştirilmesidir (Crocer and Barton, 1954; Marks, 1973; Smith, 1944; Stebbins, 1954; Yeung et al.,1981).

İki tip embriyo kùltüründen söz edilmektedir (Raghavan, 1980):

1. Olgun tohum embriyo kùltürü: Bu kùltür oldukça kolaydır ve basit bir kùltür ortamı ile başarılı sonuçlar alınmaktadır. Böylece embriyonik büyümeyi incelemek ve büyüme dönemlerini ortaya koymak, dormansi ve çimlenmenin metabolik ve biyokimyasal ayrıntılarını analiz etmek mümkün olmaktadır.

2. Olgunlaşmamış erken bölünme fazındaki proembriyoların kültürü: Bu tip erken embriyo dönemlerinden itibaren embriyoların besin ihtiyaçlarının ortaya konulmasını ve farklılaşmasını sağlamaktadır. Embriyo izolasyonu oldukça güç bir iştir bu nedenle güç bir kültür yöntemidir.

Embriyo kültürünün uygulama alanları;

- Biyolojik temel çalışmalarda
- Tohumun çimlenmemesi durumunda
- Islah süresini kısaltmada
- Yaşayan embriyoların kurtarılmasında
- Haploid bitki üretilmesinde tohum canlılıklarının hızlı test edilmesi
- Ender bitkilerin çoğaltılmasında kullanılmaktadır.

2.2. Kaynak Araştırması

2.2.1. *Compositae (Asteracea)* familyasında yüzey sterilizasyonu

Cuenca et al. (1998), ilkbaharda çiçeklenen meristematik sürgünlerin doğadan toparlanması ile *Centaurea pau*'de sterilizasyon çalışması yapmışlardır. Gövde 50 mm parçalar halinde kesildikten sonra sabunlu suda bekletilip musluk suyundan geçirilmiştir. 1 dk etanolde bekletildikten sonra 3 damla tween-80 içeren %7 CaOCl'de 20 dk manyetik karıştırıcıda yüzey sterilizasyonuna bırakılmış 4 kez 5'er dk steril saf su ile durulanmıştır. 50 mm'lik gövde eksplantları 20 mm'lik uzunluğunda 1-2 boğumlu parçalar halinde kesilmiş ve yerleştirilmiştir.

Takashi and Daisuke (1997), *Centaurea macrocephala* bitkisinin serada yetiştirilen 4-6 yapraklı sürgünlerinden 1 cm uzunluğunda sürgün uçlarını keserek kullanmışlardır. Eksplantlar 30 sn musluk suyundan geçirildikten sonra %0,1 Tween-20, %0,5 klorür içeren NaOCl içerisinde 10 dk yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Sonra steril saf suda yıkanıp yaprakların alt kısmından 0,5 cm'lik eksplantlar elde edilmiştir.

Cuence and Marco (2000), yazın erken dönemlerinde tarlada yetiştirilen *Centaurea spacchii*'nin nodlu segmentlerinden *in vitro* kültür için tek bir eksplant kullanmışlardır. 25-30 cm'lik gövdeler 50 mm'lik parçalar halinde kesilip 10 dk sabunlu su da yıkanmıştır. Musluk suyundan geçirildikten sonra %70 etanolde 1 dk bekletilip 3 damla %80-Tween içeren %7 CaOCl'de yüzey sterilizasyonundan sonra 4 kez 5 dk steril sudan geçirilmiş ve 20 mm uzunluğundaki nodlu segmentler halinde kültüre alınmıştır.

Hammatt and Evans (1985), tehdit altında bulunan *Centaurea junaniana*'da yaprak sterilizasyonu çalışmışlardır. Araştırmacılar, yapraklara %20 v/v NaOCl'de 20 dk süre ile yüzey sterilizasyonu uygulamış ve daha sonra 4 kez 5'er dk süre ile steril bidistile saf su ile durulayarak başarılı olmuşlardır.

Seneviratne et al. (1995), *Hevea* bitkisinin sürgünlerindeki yüksek miktardaki mikrobiyal bulaşıklığı gidermeye çalışmışlardır. Tarlada yetiştirilen RRIC 100, RRIC 121 ve seradan alınan RRIC 100, RRIC 121 ve PB 86 çeşitlerinin yaprakları koparılarak 6-8 cm'lik genç yeşil sürgünleri %70 Etanol'de 1 dakika bekletildikten sonra %5-10-15 -20 NaOCl ile 5-10-15-20 dk yada % 0,1-0,2 HgCl₂ 5-10 dk yüzey sterilizasyon işlemleri karşılaştırılmıştır. %1 benomil kullanımının ve NaOCl konsantrasyonunun ve uygulama süresinin artırılmasının fungal bulaşıklığı azalttığını fakat bitkilerde kararmaya neden olduğunu söylemişlerdir. En iyi sonuçların seradan alınan çeşitlerde %0,2 HgCl₂'ün 10 dk uygulama süresinde elde edildiğini, bulaşıklığın %20 oranına ve kararmanın %10'a düşürüldüğünü tespit etmişlerdir.

Grzegorzcyk and Walker (1997), üzüm bitkisinde yüzey sterilizasyonunu çalışmışlardır. Phylloxera (*Daktulospharia vitifoliae* [*Viteus vitifoliae*])'nın vitis türlerinde bulaşıklığa neden olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada değişik oranlarda NaOCl ve etanol'ün etkisine bakılmıştır. % 50 etanol 7 dk muamelesinin en iyi sonucu verdiğini ve steril saf su ile durulamaya gerek olmadığını bildirmişlerdir.

Moutia and Dookun (1999), şeker kamışında yüzey sterilizasyonu çalışmasında %2,7 NaOCl (pH 6) ile %46,8, %1 HgCl₂ kullanımında ise %56,3 oranında bulaşıklık sorununu halletmişlerdir. %2,7 NaOCl (pH 6)'in bitki dokuları için fitotoksik olduğu ve %100 bitki ölümüne neden olduğu saptanmıştır.

Zito et al. (1998), tarladan alınan soya fasülyesi tohumlarında yüzey sterilizasyonu çalışmasında 4 ayrı deneme kurmuşlardır. 1. ve 2. denemede 1 dk suda 3 ve 4. denemede ise 1 dk etanol de ayrı ayrı pH 5 ve serbest değerlerinde %40 NaOCl de muamele etmişlerdir. En iyi sonuçlar 1 dk su (pH5) ve %40 NaOCl ile elde edilmiştir.

Kim et al. (1999), *Lettuce* bitkisinde klorinli ve ozonlu su içeren UV dalgalarına maruz bırakılarak spreyle yıkayarak yüzey sterilizasyonu çalışmışlardır. 100; 150; 200 mg/l klorin içeren suda 20 dk %90-99; 4 °C de 30 dk %1,0; 1,5 mg/l ozon içeren su ile %99 ; UV vortex ve spreyle yıkama sonucu ise %90 oranında bulaşıklığın azaldığını tespit etmişlerdir.

Bhattacharya et al. (1998), *Mussaenda philippica* bitkisinde değişik eksplantlar hasat zamanına göre değişik bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS ortamında kallus oluşumu ve sürgün tomurcuklarının olgunlaşmasını çalışmışlardır. Şubat-nisan, mayıs-temmuz, ağustos-ekim, kasım-ocak aylarında tarlada yetiştirilen bitkilerde hasat zamanının fenolik maddeler ve oksidasyonlarının kallus ve sürgün tomurcuklarının olgunlaşmasını etkilediği ortaya çıkarılmıştır. En yüksek oranda fenolik maddeye mayıs-temmuz ayında en düşük oranda ise kasım-ocak ayında rastlamışlardır. Yüzey sterilizasyonundan önce eksplantların %10 DMSO 4 °C'de 10 dk bekletilmesinin fenolik madde oluşumunu önlediğini kallus ve sürgün tomurcuklarının etrafında kararma olmadığını bildirmişlerdir.

Naseem et al. (1998), *Cicer arietinum* tohumlarında yüzey sterilizasyonu çalışmışlardır. En iyi sonuçların (%98), %10 NaOCl'de 10 dk ve %70 etanolde 3 dk muamelelerinden elde etmişlerdir.

Taylor et al. (1998), *Piper methysticum* bitkisinin doku kültürü çalışmasında endojen bulaşıklığın büyük bir sorun olduğunu bildirmişlerdir. Seradan alınan bitkilerin benomil ve rifampicin ile muamelesi sonucu bulaşıklığın önüne geçilemediğini rapor etmişlerdir. Bir diğer uygulama da, ayrı ayrı birkaç çeşit antibiyotik kültür ortamına ilave edilmesinden sonra 3-5 hafta hiç bulaşıklık çıkmamasına rağmen daha sonra bulaşıklığın tekrar çıktığını gözlemişlerdir. Bulaşıklık olmayanlar yeni bir ortama aktarılırken bulaşık olanlara 2. bir yüzey sterilizasyonu uygulanmıştır. Böylece az sayıda da olsa bitkiyi kurtarabildiklerini bildirmişlerdir.

2.2.2. Compositae (Asteracea) familyasında sürgün rejenerasyonu ve köklendirme

Cuenca et al. (1998), Doğu İspanya'da tehdit altında ve endemik olan *Centaurea paui* bitkisinin çiçekli gövdelerinde hızlı çoğaltım çalışmışlardır. *In vitro* ortamda en iyi sürgün oluşumunun 0,5 mg/l BAP içeren ya da 2,0 mg/l KIN içeren MS ortamında olduğunu bildirmişlerdir. En iyi sürgün bitki büyüme düzenleyicilerinin olmadığı ortamda gerçekleştirilmiştir. Ortama sitokinin ilavesinin sürgünlerin büyüme kapasitesini azalttığını bildirmişlerdir. En iyi köklenmenin ise 2,0 mg/l 3-IAA ve 2,0 mg/l IBA içeren MS ortamından elde edildiğini ve köklenmenin 4 hafta sonra % 40 oranında olduğunu tespit etmişlerdir.

Takashi and Daisuke (1997), *Centaurea macrocephala* bitkisinin koltuk altı meristemlerinde hızlı çoğaltım çalışmışlardır. 25 µM IBA içeren hypnex ortamında sürgünlerin %70 oranında köklendiği gözlenmiştir.

Hammatt and Evans (1985), tehdit altındaki *Centaurea junaniana* bitkisinin yaprak, kök, hipokotil ve kotiledonlarının sürgün rejenerasyon kapasitesini araştırmışlardır. En iyi sürgün oluşumu 5 mg/l BAP ve 0,2 mg/l NAA içeren

MS ortamında gözlenmiştir. En iyi köklenme 0,01 mg/l IBA içeren MS ortamından bitki başına 25 adet, kök uzunluğu bakımından ise 20 mm olarak elde edilmiştir.

Cuence and Marco (2000), tehdit altında olan endemik *Centaurea spacchii*'nin çiçekli meristemlerinde hızlı çoğaltım yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada %15 kontaminasyon gözlenmiştir. 1 mg/l BAP içeren MS besin ortamında yüksek oranda sürgün oluşumu gözlenmiştir. Fakat oluşan sürgünlerin boyunun uzamadığı bildirilmiştir. Tek çeşit oksin kullanımı ile 6 hafta sonunda köklenme oranı düşük olduğu gözlenmiştir. İki çeşit oksin kullanımında ise en iyi sonuçların 2 mg/l IAA ve 2 mg/l IBA içeren MS besin ortamında %60 köklenme elde edildiği gözlenmiştir. Sürgünlerin %50'si 3 hafta içinde köklenmeye başlamıştır. Seraya aktarılan bitkilerin ise %80'inin canlılığını koruduğu rapor edilmiştir.

Mesa et al. (1995), *Heliantus tuberosus* L. (*Jerusalem artichoke*) bitkisinde olgunlaşmamış embriyodan sürgün rejenerasyonu ve köklendirme çalışmaları yapmışlardır. En iyi sürgün rejenerasyonun %2 sukroz 2,0 mg/l BAP içeren MS ortamında; en iyi köklenmenin ise 0,1 mg/l IAA ve 0,5 mg/l NAA içeren ortamdaki elde edildiğini bildirmişlerdir. Sürgünler tarlaya aktarılmadan önce kırmızı toprak kum ve organik madde içeren saksılara konulmuştur. Bitkilerin tarlaya aktarıldıklarında %100 canlılıklarını korudukları belirtilmiştir.

Xiaoli et al. (1992), *Lettuce (Lactuca sativa* L.) da somatik embriyogenezisi araştırılmışlardır. Çalışmada 2,0 mg/l NAA veya 0,2 mg/l BAP ve 2,0 mg/l NAA içeren MS ortamında kotiledonlardan %70'ten fazla somatik embriyogenezis olduğu tespit edilmiştir. 2,4-D içeren MS ortamında ise herhangi bir sonuç elde edilemediği bildirilmiştir.

Jeannin and Hahne (1991), *Heliantus annuus* Ha300 hattında zigotik embriyogenezis üzerine çalışmışlardır. En iyi sonuçların BAP ve yüksek

oranda sukroz içeren MS ortamından elde edildiğini ve bitkilerin fertil olduğunu bildirmişlerdir.

Han and Xi (1989), *Lettuce* bitkisinde embriyodan hızlı çoğaltım araştırmışlardır. Araştırmada, 2,0 mg/l NAA veya 0,5 mg/l KLN yada 0,2 mg/l NAA ve 2,0 mg/l BAP içeren MS ortamında kotiledonlardan %76-79 oranında embriyogenezis elde edilmiştir. Ortalama 0,35 g kalluslardan 40 günün sonunda 80 embriyo elde edildiği bildirilmiştir.

Antonova et al. (1992), *Peredovik uluchshennyi* bitkisinde olgunlaşmamış embriyolarda çalışmışlardır. Olgunlaşmamış embriyolar üzerinde 1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında 4-7 gün sonra embriyolar oluştuğu bildirmişlerdir. Oluşan embriyoların GA₃ içeren MS ortamında hipokotil ve ilk gerçek yaprak çiftinin oluşturduğu gözlenmiştir.

Sarvesh et al. (1993), *Guizotia abyssinica* bitkisinin Ootacamund çeşidinde kotiledon eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu çalışılmıştır. Fide eksplantlarından kallus oluşumu için 1,4 µM KLN 9,0 µM 2,4-D içeren LS ortamı kullanılmıştır. 2,4,5-T ve oluşan kalluslar LS ortamında alt kültüre alındığında somatik embriyoların oluştuğu gözlenmiştir. 4,4 µM BAP ve 11,4 µM IAA içeren MS ortamında kotiledon eksplantlarından çoklu sürgünler elde edildiği bildirilmiştir. Rejenere olan bitkilerin saksılara aktarıldığında tohum tuttuğu morfojilerinin normal ve fertil olduğunu tespit edilmiştir.

Encheva et al. (1993), *Heliantus annuus*'un 3 hattını mutagen olan gama ışınına (7-10 Gy) maruz bırakılarak ve gama ışınına maruz bırakılmadan olgunlaşmamış embriyo ve somatik embriyogeneziste meydana gelen varyasyonlar üzerindeki etkisine bakmışlardır. Yağ asidi, tohumlardaki yağ miktarı, tohum ağırlıkları çiçek tabla çapı, bitki uzunluğunda genetik varyasyonlar meydana geldiği belirtilmiştir.

Lauzer and Vieth (1992), Kuzey Amerika'da yetiştirilen *Cynara scolymus* bitkisinin Green Globe çeşidinde hızlı çoğaltım ve vitrifikasyon üzerine çalışmışlardır. Araştırmada *In vitro*'da tohumdan elde edilen sürgün uçlarından 0,5 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda BAP içeren, MS ortamında sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Hızlı çoğaltım aşamasında meristematik yaprakların besin ortamına değmesinin vitrifikasyona yol açtığı belirtilmiş, besin ortamına değmeleri engellenerek vitrifikasyondan kurtuldukları ve 1 mg/l NAA içeren MS besi ortamında 2 ay sonra % 65 oranında köklendikleri bildirilmiştir.

Krogstrup and Norgaard (1991), *Psiada coronopus* bitkisinin 5 µM BAP ile diğer bitki büyüme düzenleyicileri ile birlikte MS ortamında hızlı çoğaltım başarısına bakmışlardır. Oluşan sürgünlerin NAA ve IBA içeren MS besin ortamında köklendikleri tespit edilmiştir.

Sakr et al. (1991), *Chamomilla recutita* bitkisinin yaprak, gövde, meristematik uç, kök, çiçek ve tohum eksplantlarının rejenerasyon kabiliyetlerine bakmışlardır. Kinetin, BAP, Kinetin + BAP veya BAP + NAA içeren MS besin ortamında rejenerasyon kabiliyeti araştırılmıştır. 4 haftalık kültürde en fazla sürgün sırasıyla tohum, meristematik uç ve yaprak sapından elde edilen kallustan elde edilmiştir. Köklenme ise MS ortamında gerçekleştirilmiştir.

Mohamed et al. (1991), *Witloof chicory* bitkisinin değişik eksplantları hızlı çoğaltım amaçlı kullanılmışlardır. Araştırmacılar yaprak eksplantları dışındaki eksplantlarda bulaşıklığın fazla olduğunu bildirmişlerdir. Yapraktan %50 sürgün oluşturdukları, bu sürgünlerin çiçeklendiği ve tohum bağladığı gözlenmiş olup en iyi sonuçlar 0,05 µM veya 0,1 µM TDZ veya 8,0 µM BAP ve 0,1 µM NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir.

Couchou et al. (1992), *Arnica montana* bitkisinin hızlı çoğaltımını çalışmışlardır. Kullanılan sürgünleri hem seradan hem *in vitro*'dan çalıştıktıklarını bildirmişlerdir. Hızlı çoğaltım için 1 mg/l BAP ve 0,1 mg/l NAA içeren MS veya B₅ kullanılmıştır. 6. hafta sonunda MS besin ortamında 7,7

sürgün, B₅ ortamında 9,0 sürgün elde edilmiştir. Sürgünler NAA içermeyen ortamda alt kültüre alınmış ve sonuçların düştüğü gözlenmiştir. Sürgünler 0,1 mg/l NAA içeren MS ortamında köklenmiştir. Seradan alınan bitkilerde en iyi köklenmenin 0,2; 0,3 mg/l NAA içeren B₅ ortamında olduğunu rapor etmişlerdir. *In vitro*'daki bitkilerin %95'i seraya başarı ile aktarılmıştır. Kış koşullarında tarlaya aktarılanlardan %93'ünün canlılığını koruduğu ve sonraki yaz mevsiminde % 64'ünün çiçeklendiği gözlenmiştir.

Estrella and Lazerte (1994), *Polymnia sonchifolia* bitkisinin koltuk altı meristemlerinin BAP ve IBA içeren MS besin ortamında hızlı çoğaltımını çalışmışlardır. BAP + IBA içeren MS ortamında 10,1 gün sonra %90 sürgün oluşmuştur ve eksplant başına 12,4 adet sürgün elde etmişlerdir.

Arelló et al. (1991), *Gerbera jamesonii* bitkisinin Apelplosen Marleen, Clementine ve Pimpernel çeşitlerinde kapitulum eksplantı BAP, IAA ve kinetin içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır. En iyi kallus oluşumunun BAP ve 0,5 mg/l IAA içeren MS besin ortamında Appel Bloesen ve Marleen çeşitlerinden elde edildiği bildirilmiştir.

Whipkey et al. (1992), *Artemisia annua*, bitkisinin tarladan alınan P1, P2, P3 hatlarında sürgün rejenerasyon kabiliyetini araştırmışlardır. En iyi kallus oluşumu 1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında en fazla sürgün sayısı ise 10 mg/l BAP içeren MS besin ortamında gözlenmiştir. P2 hatında elde edilen sürgünler 5 ay sonra hızlı çoğaltım ortamına alınmıştır. 0, 2, 4, 6, 8 ve 10 mg/l BAP, 0 ve %10 CW içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. En yüksek oranda sürgün 6 mg/l BAP %10 CW içeren ortamdan elde edilmiştir. Sürgünler IBA içeren ortamlarda köklendirilmiş ve seraya aktararak büyümeye bırakılmıştır.

Mesa et al. (1995), *Heliantus tuberosus* bitkisinde hızlı çoğaltım çalışmışlardır. En iyi sürgün oluşumu 2 mg/l BAP ve 20 g/l sukroz içeren Murashige ve Skoog besin ortamında elde edilmiştir. *In vitro* ortamda en iyi köklenme 0,1 mg/l IAA ve 0,5 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edilmiştir.

Köklenen bitkilerin sera koşullarına adapte edilip kırmızı toprak kum ve organik madde içeren saksılara aktarıldıktan sonra %100 canlılığını koruduğu gözlenmiştir. Tüm bitkiler normal olup tohum elde edilmiştir.

2.2.3. Değişik familyalarda *ex vitro* köklendirme çalışmaları

Desta and Legesse (1998), *Juniperus procera* Hochot Endl bitkisinin genç ve yaşlı sürgünlerinde köklenme sağlamak amacıyla *ex vitro*'da 10^{-3} - 10^{-9} M IAA, IBA, NAA ve 2,4-D içeren MS besin ortamıyla muamele etmişlerdir. Genç sürgünlerin %2'si 16 hafta sonra ve %24'ü 32 hafta sonra köklenmiştir. Yaşlı sürgünlerde ise tek bir bitkinin 32 hafta sonra köklendiği gözlenmiştir.

Ofori et al. (1999), *Milicia excelsa* bitkisinde yapraksız sürgünler *ex vitro*'da 0 - 0,016 IBA ile muamele edilmiştir. Çalışmada, 4 farklı köklendirme ortamı (İnce kum, 2 mm; kalın kum, 2-4 mm; talaş ve kalın kum, 1:1) kullanılmıştır. En fazla talaş ortamında köklenme olduğu gözlenmiştir. IBA'nın ise olumlu etkisi gözlenememiştir.

Shiembo et al. (1996), *Iringia gabonensis* bitkisinde serada köklendirme çalışmışlardır. Yaprakları koparılan sürgünler 0, 8, 40, 200, 250 µg IBA ile muamele edilerek talaş, ince kum, kalın kum, çakıl, çakıl-talaş (1:1), kalın kum-talaş (1:2) olmak üzere 6 değişik ortamda köklenmeye bakılmıştır. En iyi kök oluşumu 200-250 µg IBA'da gözlenmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Bitki Materyali

Çalışmada kullanılan *Centaurea tchihatchefii* Fisch et. Mey Ankara'nın Gölbaşı ilçesindeki Mogan gölünün batısında yer alan Ankara Valiliği Çevre Koruma Vakfına ait Süleyman Demirel Ormanı'ndan toplanmak suretiyle temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Bitki büyüme ortamları ve kültür koşulları

Denemelerde MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige and Skoog 1962, ile %3 sukroz içeren (Çizelge 3.1) %2 sukroz, katılaştırılma amacıyla %0,8'lik agar (type A, Sigma) ile kullanılmıştır. Ortam hazırlığında çift distile saf su kullanılmış olup, gerektiğinde besin ortamına farklı konstrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilmiştir. Besin ortamının pH'sı 1N NaOH ya da 1N HCl kullanılarak 5,8'e ayarlandıktan sonra 1,4 kg/cm² basınç altında ve 121 °C'de 20 dakika tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Tüm kültürler beyaz floresan ışığı altında 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda 24 ± 1°C sıcaklıkta tutulmuşlardır.

Çizelge 3.1. Murashige and Skoog (1962), ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları

Ortamda Bulunan Maddeler	Konsantrasyonlar (mM)
KNO ₃	18,79
NH ₄ NO ₃	20,61
KH ₂ PO ₄	1,26
CaCl ₂	2,99
MgSO ₄ 7H ₂ O	1,50
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,11
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,10
FeNa EDTA	0,10
H ₃ BO ₃	0,10
KI	5,00
MnCl ₂ H ₂ O	0,10
Na ₂ MoO ₄ 2H	1,03
ZnSO ₄ 7H ₂ O	29,91
Glycine	26,64
Nicotinic acid	4,06
Pyridoxin-HCl	2,43
Thiamine-HCl	0,30
Myo-inositol	0,56

3.2.2. Bitki büyümesini düzenleyiciler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Sigma Aldrich Chemical Co.'dan temin edilmiştir. Hormon dozları uygun çözücülerde çözüldükten sonra standart şekilde istenilen miktarda ve oranda stok solusyonları hazırlanmıştır (Çizelge 3.2.). Hormonlar ortama otoklavlanmadan önce ilave edilmiştir. Hazırlanan hormon dozlarının stok solusyonları +4°C'de bir iki ay saklanmıştır.

Çizelge 3.2. Kullanılan hormon dozları ve çözücüler

Hormon Dozları	Çözücü	Saklama Koşulları (°C)
Gibberellik asit	Su	
Oksinler		
NAA	1N NaOH	+4
IBA	Etanol	
CPA	Etanol	
Sitokininler		
BAP	1N NaOH	
Kinetin	1N NaOH	

3.2.3. *In vitro* çalışmaları

3.2.3.1. Tohum sterilizasyonu ve çimlendirme

Tohumlarda yüzey sterilizasyonu için en yüksek başarının alınacağı en düşük dezenfektan dozu belirlenmeye çalışılmıştır. *C. tchihatchefii* tohumlarının yüzey sterilizasyonu için tohumlar farklı dozda (%10, %15, %20, %30, %50 ve %60) ticari çamaşır suyu kullanılarak (Axion-Türkiye, %5 NaOCl) ile 10, 20 ve 30 dakika manyetik karıştırıcıda çevrilerek yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar steril saf su ile 3 kez durulanmıştır. Steril edilen tohumların steril petri kapları içerisinde %3 sukroz içeren ve % 0,8 agar ile katılaştırılan MS besin ortamında 24 ± 1 °C'de 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda çimlenmeye bırakılmıştır. Çimlenme sağlanamayınca bitkide dormansiyi kırmak için çalışmada 13 gün +4 °C (vernelizasyon muamelesi)'de bekletilip bütün tohumlar %60 çamaşır suyu 10 dk uygulama süresiyle yüzey sterilizasyonu yapıp birinci denemede 2 mg/l gibberellic acid-GA₃, 2. denemede ise karanlık 18°C ve 3. denemede ise

aydınlık (16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodu) 24 °C sıcaklık uygulanmıştır. Ayrıca, hormon (GA₃) ile 4 saat muamele edilen tohumlar kurutma kağıdı arasında karanlık ve aydınlık uygulamasındaki tohumlar ise MS besin ortamı içeren petrilere çimlendirmeye bırakılmıştır.

3.2.3.2. Koltuk altı meristem sterilizasyonu ve hızlı çoğaltım

Koltuk altı meristemleri doğadan toplanan 4-5 günlük genç sürgünlerden 4-5 cm kesilerek elde edilmiştir.

Çizelge 3.3. Koltuk altı meristemlerini sterilizasyonu için kullanılan çamaşır suyu doz ve süreleri

Çamaşır Suyu Dozu (%)		Süre (dk)		Ön Muamele	
1.	%25	15		1 dk sabunlu su; 20 dk musluk suyu	
2.	%25	15		10 dk sabunlu su; 20 dk musluk suyu; 1 dk etanol	
3.	%35	15			
4.	%75	15			
1.gün		2. gün			
Çamaşır Suyu Dozu (%)	Süre (dk)	Çamaşır Suyu Dozu (%)	Süre (dk)	30 dk musluk suyu + MS besin ortamına %0,2 (v/v) PPM ilavesi	
5.	%25	10	%25		5,0
6.	%25	15	%25		7,5
7.	%30	5	%30		2,5
8.	%30	10	%30		5,0
9.	%35	5	%35		2,5
10.	%35	10	%35		5,0
11.	%40	5	%20		2,5
12.	%40	10	%20		5,0

Çizelge 3.3' te verilen doz ve sürelerde ön muamele ve yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Ayrıca, her doz ve sürede Tween 20 (2-3 damla/200 ml) uygulanmıştır. Steril edilen gövde eksplantları 1 cm kesilerek steril magentalar içerisinde %3 sukroz içeren ve % 0,8 agar ile katılaştırılan MS besin ortamında 24 ±1 °C'de 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda çimlenmeye bırakılmıştır.

Doğadan toplanan sterilizasyonu başarılı genç sürgünlerin koltuk altı meristemleri sterilizasyondan 4 hafta sonra 0,5 mg/l BAP (0; 0,01mg/l IAA; 0,01mg/l CPA)'lı MS besin ortamı içeren magentalara alınmıştır.

3.2.3.3. Kapitulaların sterilizasyonu ve embriyo kültürü

Kapitulalar %50'lik dozda ticari çamaşır suyu (Axion-Türkiye, %5 NaOCl) ile 10, 15, 20 ve 30 dakika muamele edilmiştir. Kapitulalar 3 kez steril saf sudan geçirildikten sonra açılıp olgunlaşmamış tohum içindeki olgunlaşmamış embriyolar dikkatlice çıkarılmıştır.

Çizelge 3.4. *C. tchatcheffii*'nin olgunlaşmamış embriyo eksplantlarında kullanılan farklı KIN, BAP ve NAA büyüme düzenleyicilerini içeren MS besin ortamları

Ortam		
	BAP mg/l	NAA mg/l
1-	1,00	0,50
2-	1,00	1,00
3-	2,00	0,50
4-	2,00	1,00
5-	0,50	2,00
6-	0,50	4,00
7-	1,00	0,25
8-	2,00	0,25
	Kinetin mg/l	NAA mg/l
9-	1,00	0,25
10-	1,00	0,50
11-	2,00	0,25
12-	2,00	0,50

Sterilizasyonu sağlanan olgunlaşmamış embriyolar ise Çizelge 3.4'te verilen ortamlara konulmuştur.

3.2.3.4. Rejenere olan *C. tchihatcheffii* sürgünlerinin köklendirilmesi

Rejenere olan sürgünler 10 mm uzunluğa geldiğinde kesilerek farklı konsantrasyonlarda oksin (IBA; 0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 mg/l) içeren MS ortamına köklendirme amaçlı konulmuştur. Her magentaya 4 adet sürgün yerleştirilmiştir.

3.2.4. *Ex vitro*'da köklenme

3.2.4.1. Doğadan toplanan *C. tchihatcheffii* genç sürgünlerinin sera koşullarında köklendirilmesi

Doğadan alınmış genç sürgünler 8-10 cm uzunluğunda kesilerek sera koşullarında kum içerisine 5-10-15 dk süresince 0, 500, 1000 ppm (parts per million) IBA ile muamele edip $\frac{3}{4}$ 'ü toprak altında kalacak şekilde köklendirme ortamına yerleştirilip 10 gün sonra kök sisteminin gelişmesine bakılmıştır.

3.2.5. Toprak analizi

Bitkilerin çimlenmesinde toprağın etkisini bulmak amacıyla bitkinin doğal olarak yetiştiği alandan toprak örnekleri alınarak analiz yapılmıştır.

a- Elektriksel iletkenlik (EC): 1:2,5 toprak-su karışımında elektriksel iletkenlik (Wheatstone körrüsü) ile ölçülerek belirlenmiştir (Richards, 1954).

b- Toprak reaksiyonu (pH): Toprak reaksiyonu (pH) McL (1982), tarafından bildirildiği şekilde 1:2,5 toprak-su karışımında cam elektrotlu pH metre ile ölçülmüştür.

c- Mekanik analiz (Tekstür): Toprak analizlerinde; kum, kil ve silt fraksiyonları Bouyoucos (1951), tarafından bildirildiği şekilde hidrometre yöntemiyle ve tekstür sınıfı Soil Survey Manual (1951)'e göre belirlenmiştir.

d- Kalsiyum karbonat: Kalsiyum karbonat Nelson, (1982) tarafından bildirildiği şekilde Scheibler kalsimetresiyle belirlenmiştir.

e- Organik madde: Organik madde Nelson and Sommers (1982) tarafından bildirildiği şekilde; toprak örneğindeki organik maddenin $K_2Cr_2O_7$ ve H_2SO_4 eleyükseltgenmesinden sonra ortamda tepkimeye girmemiş $Cr_2O_7^{-2}$ 'nin standart $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ çözeltisi ile titre edilmesi suretiyle bulunan indirgenmemiş $Cr_2O_7^{-2}$ miktarının organik karbonun belli bir bölümünün eşit olduğu varsayılarak hesaplaması yapılmıştır.

f- Azot: Toplam azot Bremner (1965) tarafından bildirildiği şekilde Kjeldhal yöntemine göre belirlenmiştir.

g- Fosfor: Bitkiye yararışlı fosfor Olsen et al. (1954) tarafından bildirildiği şekilde; 0.5M pH'sı 8.5 olan $NaHCO_3$ 630 nm boyunda spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

h- Potasyum: Bitkiye yararışlı potasyum Richards (1954) tarafından bildirildiği şekilde; nötr 1N amonyum asetat ile ekstrakte edilen K fleimfotometre ile belirlenmiştir.

3.2.6. İstatistiksel değerlendirmeler

Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş olup her muamele, içerisinde 5 adet eksplantın bulunduğu 3 tekerrürlü 100 x 10 mm'lik petri kutularından oluşmuştur. Elde edilen veriler "SPSS for Windows" programı yardımıyla varyans analizine tabi tutulmuş, muamele ortamlarını karşılaştırmak amacıyla M-STAT C bilgisayar programı kullanılarak 6 yada daha az muamele ortamı için Duncan testi kullanılmıştır. Yüzde değerler, istatistik analizinden önce arcsin değerlerine çevirilmiştir (Snedecor and Cochran 1967).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Her bitki yüzeysel olarak bakteri, mantar ve benzeri organizmalardan temizlenebilmesi için gerekli dezenfektan dozu ve sterilizasyon süresi farklıdır. Dolayısıyla en uygun dezenfektan dozu ve sterilizasyon süresinin belirlenmesi önemlidir (Yıldız, 2000; Bhatti 2001). Bir eksplantın yüzey sterilizasyonu için en etkili ancak en düşük dezenfektan dozunun belirlenmesi gerekmektedir (Kyte, 1987). Tohum yüzey sterilizasyonunda hidrojen peroksit, civa, gümüş nitrat ve antibiyotikler kullanılabilirse de ticari sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) en yaygın kullanıma sahiptir (Özcan ve Özgen, 1996).

4.1. Yüzey Sterilizasyonu

4.1. 1. *C. tchihatcheffii* tohumlarının yüzey sterilizasyonu

C. tchihatcheffii tohumlarının yüzey sterilizasyonu için tohumlar farklı dozda (%10, %15, %20, %30, %50 ve %60) ticari çamaşır suyu (Axion-Türkiye, %5 NaOCl) kullanılarak 10, 20 ve 30 dakika muamele edilmiştir. Farklı sürelerde uygulanan farklı çamaşır suyu dozlarının bulaşıklık yüzdelerine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı Çamaşır suyu konsantrasyonlarının ve muamele sürelerinin *C. tchihatcheffii* tohumlarının yüzey sterilizasyonundaki etkisine ait varyans analizi

VK	SD	Bulaşık Olmayan Tohum Yüzdesi (%)	
		KO	F
Çamaşır Suyu Yüzdesi Ve Uygulama Süresi	17	4436,17	15,36**
Hata	36	288,89	
Toplam	53		

**0,01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.1'de de görüldüğü gibi bulaşıklık yüzdesi bakımından farklı oranlarda kullanılan çamaşır suyu ve uygulama süreleri arasındaki fark 0,01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Bu farklılıkların önem düzeylerini belirlemek amacıyla yapılan Duncan Testi sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı Çamaşır suyu konsantrasyonlarının ve muamele sürelerinin *C. tchihatcheffii* tohumlarının yüzey sterilizasyonundaki etkisine ait Duncan sonuçları

Çamaşır Suyu Yüzdesi (%)	Uygulama Süresi (dk)	Bulaşık Olmayan Yüzdesi**
%10	10	0,00 e
%10	20	0,00 e
%10	30	0,00 e
%15	10	0,00 e
%15	20	0,00 e
%15	30	33,33 bcd
%20	10	0,00 e
%20	20	20,00 cde
%20	30	26,67 cde
%30	10	13,33 cde
%30	20	66,67 ab
%30	30	20,00 cde
%50	10	53,33 bc
%50	20	80,00 a
%50	30	93,33 a
%60	10	93,33 a
%60	20	93,33 a
%60	30	93,33 a

*0,01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi çamaşır suyu dozu ve uygulama süresi bakımından en iyi sonuç %50'lik çamaşır suyu 30 dk ve %60'lik çamaşır suyu 10-20-30 dakikada ve %93,33 oranında sağlanmıştır. Ancak, bu dozla %50-30 dk, %50-20 dk uygulama dozlarından elde edilen sonuçlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz olup, aynı gruba girmiştir. En düşük değerler % 10; 10, 20, 30 dk ile %15'te gözlenmiştir. *Cicer arietinum* tohumlarında yapılan yüzey sterilizasyonda %10 NaOCl 10 dk ve %70 3 dk etanolde %98 oranında başarı sağlandığı bildirilmiştir (Nasem et al., 1998). Zito et al.

(1998), soya fasülyesi tohumlarından 1 dk su (pH5) ve %40 NaOCl ile sterilizasyonu başarmışlardır. Bu çalışmada da yüzey sterilizasyonunu sağlamak için NaOCl'in çeşitli doz ve süreleri kullanılmıştır. 0, 20 ve %20; 10 dk ve %30; 20 dk uygulama dozlarından elde edilmiştir. Ancak bulaşık olan ve olmayan tohumlarda hiç çimlenme gözlenememiştir. Bu durum uygulanan muamelelerin ya bulaşıklığı önlemede yetersiz kaldığını ya da bulaşıklığı önleyen muamelelerin çimlenmeyi engellediği sonucunu çıkarmaktadır.

4.1.2. C. *tchihatcheffii*'nin olgunlaşmamış embriyolarının yüzey

sterilizasyonu

C. *tchihatcheffii* embriyolarının yüzey sterilizasyonu için kapitulalar %50'lik dozda ticari çamaşır suyu (Axion-Türkiye, %5 NaOCl) ile 10, 15, 20 ve 30 dakika muamele edilmiştir. 3 kez steril saf sudan geçirildikten sonra kapitulalar açılıp olgunlaşmamış tohum içindeki olgunlaşmamış embriyolar çıkarılmıştır. Farklı sürelerde uygulanan farklı çamaşır suyu dozlarının 5 gün sonra ki bulaşıklık yüzdelerine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3'de de görüldüğü gibi bulaşıklık olmayan yüzdesi bakımından farklı uygulama süreleri arasındaki fark 0,01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Bu farklılıkların önem düzeylerini belirlemek amacıyla yapılan Duncan Testi sonuçları Çizelge 4.4 'de verilmiştir.

Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi uygulama süresi ve çamaşır suyu dozu bakımından en iyi sonuç (%80 bulaşık olmayan) %50 lik çamaşır suyu 30 dk'lık uygulama süresinde sağlanmıştır. Bu nedenle olgunlaşmamış embriyodan adventif sürgün rejenerasyonu elde edilirken bu doz ve süre tercih edilmiştir.

Çizelge 4.3 *Centaurea tchihatcheffii* olgunlaşmamış embriyolarının %50 Çamaşır suyu konsantrasyonu ve farklı muamele sürelerinin yüzey sterilizasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Bulaşıklık Olmayan Embriyo Yüzdesi (%)	
		KO	F
Çamaşır Suyu Yüzdesi ve Uygulama Süresi	3	5386,67	14,60**
Hata	16	370,00	
Toplam	19		

**0,01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.4. *Centaurea tchihatcheffii* olgunlaşmamış embriyolarının %50 çamaşır suyu konsantrasyonu ve farklı muamele sürelerinin yüzey sterilizasyonuna etkisine ait Duncan sonuçları

Çamaşır Suyu Yüzdesi (%)	Süre (dk)	Bulaşıklık Olmayan Embriyo Yüzdesi (%)
%50	30	80 a
%50	20	40 ab
%50	15	20 b
%50	10	4 c

**0,01 düzeyinde önemli

4.1.3. *C. tchihatcheffii*' nin yeşil materyalinin yüzey sterilizasyonu

Doğadan toplanan bitkilerin 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 su da bekletme süresi 1 dk 'ya 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 2. bir sterilizasyona tabi tutulmuştur.

Çizelge 4.5. Farklı Çamaşır suyu konsantrasyonlarının ve muamele sürelerinin *Centaurea tchihatcheffii* yeşil materyalinin yüzey sterilizasyonundaki etkisine ait varyans analizi

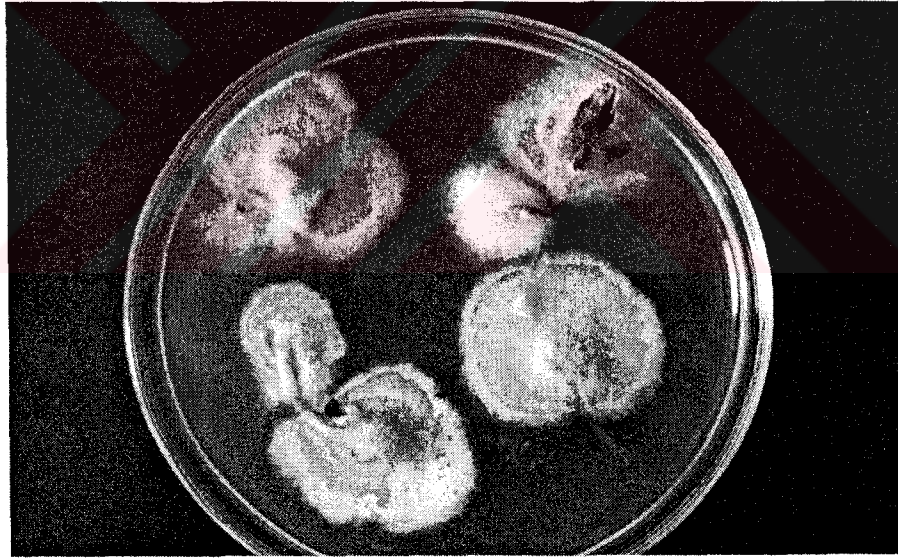
VK	SD	Bulaşık Olmayan Bitki Yüzdesi (%)		Yeşil Bitki Yüzdesi (%)		Yeşil ve Canlı Kalan Bitki Yüzdesi (%)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Muamele	12	3700,85	8,20**	1222,22	2,84**	781,20	5,08**
Hata	26	451,28		430,79		153,85	
Toplam	38						

**0,01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.5' te de görüldüğü gibi bulaşıklık olmayanların yüzdesi bakımından farklı oranlarda kullanılan çamaşır suyu ve uygulama süreleri arasındaki fark 0,01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Bu farklılıkların önem düzeylerini belirlemek amacıyla yapılan Duncan sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi çamaşır suyu ve uygulama süresi dozu bakımından en iyi sonuç ve en yüksek değer çift sterilizasyonla %30-5 dk, %30-10 dk, %40-5 dk olurken tek sterilizasyonda ise %35-15 dk olmuştur. Yeşil ve canlı kalan bitki yüzdesine bakıldığında en iyi sonuç çift sterilizasyonla %30-5 dk muamelesinde alınmış olup, yine çift sterilizasyonla %40-5 dk ve %40-10 dk muamelelerindeki sonuçlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz olup, aynı gruba girmiştir. En düşük değerler ya da en fazla bulaşıklığın gözlemlendiği muamele tek sterilizasyonla %25-15 dk uygulamalarında görülmüştür (şekil 4.1). Bu hızlı çoğaltım çalışmasında da çift sterilizasyon %30-5 dk tercih edilmiştir. Hammatt and Evans (1985), tehdit altındaki *Centaurea junaniana*'da yaprak eksplantının sterilizasyonu çalışmışlardır. Yapraklar %20 v/v NaOCl 20 dk süre ile bekletilip daha sonra 4 kez 5'er dk süre ile steril bidistile saf su ile durularak steril yaprak eksplantları elde edilmiştir. Cuenca et al. (1998), *Centaurea pau*'de sterilizasyon çalışması için gövde 50 mm parçalar halinde kesildikten sonra sabunlu suda bekletilip musluk suyundan geçirmişlerdir. 1 dk etanolde bekletildikten sonra 3 damla tween-80 içeren %7 CaOCl'de 20 dk manyetik

karıştıcıda yüzey sterilizasyonuna bırakılmış 4 kez 5'er dk steril saf su ile durulanmıştır. *Centaurea macrocephala* bitkisinin seradan alınan eksplantları 30 sn musluk suyundan geçirildikten sonra %0,1 Tween-20, %0,5 klorür içeren NaOCl içerisinde 10 dk yüzey sterilizasyonu yapılmış ve steril saf su da yıkanıp yaprakların alt kısmından 0,5 cm'lik eksplantlar elde edilmiştir (Takashi and Daisuke, 1997). Cuence and Marco (2000), *Centaurea spacchii*'nin 50 mm'lik gövde parçaları 10 dk sabunlu su da yıkanmış ve musluk suyundan geçirildikten sonra %70 etanolde 1 dk bekletilip 3 damla %80-Tween içeren %7 CaOCl de yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. 4 kez 5 dk durulandıktan sonra ve 20 mm uzunluğunda steril nodlu segmentler elde edilmiştir. Bu çalışmada da çamaşır suyunun tüm yüzeye işlemesi için Tween 20 kullanılmıştır.



Şekil 4.1. Doğadan toplanan *Centaurea tchihatcheffii*'nin koltuk altı meristemlerindeki yüzey sterilizasyona ait bulaşıklık

Taylor et al. (1998), *Piper methysticum* bitkisinin doku kültürü çalışmasında endojen bulaşıklığın büyük bir engel olduğunu bildirmişlerdir. Seradan alınan bitkilerin benomil ve rifampicin ile muamelesi sonucu bile bulaşıklığın önüne geçilemediğini rapor etmişlerdir.

Çizelge 4.6. Farklı çamaşır suyu konsantrasyonlarının ve muamele sürelerinin yeşil materyalin yüzey sterilizasyona ait Duncan sonuçları

Muamele	Çamaşır Suyu Dozu (%)	Süre (dk)	Ön Muamele	Bulaşık Olmayan Bitki Yüzdesi (%)	Yeşil Bulaşık Bitki Yüzdesi (%)	Yeşil Kalan Yüzdesi (%)	Canlı ve Bitki Yüzdesi (%)
1.	%25	15	1 dk sabunlu su; 20 dk musluk suyu; 1 dk etanol	0,00 e	20,00 b	0,00 d	
2.	%25	15		20,00 d	0,00 b	6,66 cd	
3.	%35	15	10 dk sabunlu su; 20 dk musluk suyu; 1 dk etanol	100,00 a	0,00 b	0,00 d	
4.	%75	15		26,67 cd	73,33 a	6,66 cd	
	1. gün	2. gün					
	Çamaşır Suyu Dozu (%)	Süre (dk)	Çamaşır Suyu Dozu (%)	Süre (dk)			
5.	%25	10	%12,5	5	46,67 cd	6,66 b	20,00 bcd
6.	%25	15	%12,5	7,5	66,67 bc	6,66 b	0,00 d
7.	%30	5	%15	2,5	100,00 a	0,00 b	33,33 a
8.	%30	10	%15	5	100,00 a	6,67 b	6,66 cd
9.	%35	5	%17,5	2,5	33,33 cd	26,66 b	6,66 cd
10.	%35	10	%17,5	5	66,67 bc	20,00 b	6,66 cd
11.	%40	5	%20	2,5	93,33 ab	0,00 b	26,66 abc
12.	%40	10	%20	5	68,67 b	13,33 b	26,66 abc

**0,01 düzeyinde önemli

Taylor et. al. (1998), bir diğ er uygulamalarında ise, ayrı ayrı birkaç çeş it antibiyotiğ in kùltür ortamına ilave edilmesinden sonra 3-5 hafta hiç bulaş ıklık ç ıkmamasına rağ men daha sonra bulaş ıklığ ın tekrar ç ıktığ ını gözlemiş lerdir. Bulaş ıklık olmayanlar yeni bir ortama aktarılırken, bulaş ık olanlara da 2. bir yüzey sterilizasyonu uygulanmıştır. Böylece az sayıda da olsa bitkiyi kurtarabildiklerini bildirmiş lerdir. Bu ç alışmada da yeş il materyalin bulaş ıklığ ını gidermede ç ift yüzey sterilizasyonun etkili olduğ u tespit edilmiştir. Ancak haftalar sonra endojen kaynaklı bulaş ıklığ ın tekrar ortaya ç ıktığ ı görülmüştür.

Seneviratne et al. (1995), *Hevea* bitkisinin sürgünlerindeki yüksek miktardaki mikrobiyal bulaş ıklığ ı gidermeye ç alışmış %70 Etanol NAOCI ile 5-10-15-20 dk yada % 0.1-0.2 HgCl₂ 5-10 dk yüzey sterilizasyonu konsantrasyonunun ve süresinin artırılmasının bulaş ıklığ ı azalttığ ı fakat bitkilerde kararmaya neden olduğ unu söylemiş lerdir. Ayrıca, %1 benomil kullanımının fungal bulaş ıklığ ı azalttığ ını bildirmiş lerdir. Bu ç alışmada da fungal bulaş ıklığ ı ortadan kaldırmak için benomil yerine ç ift yüzey sterilizasyonu denemesinde 2. gün ki sterilizasyondan sonra MS besin ortamına %0,2 v/v PPM konulmuştur.

4.2. Ç imlenme

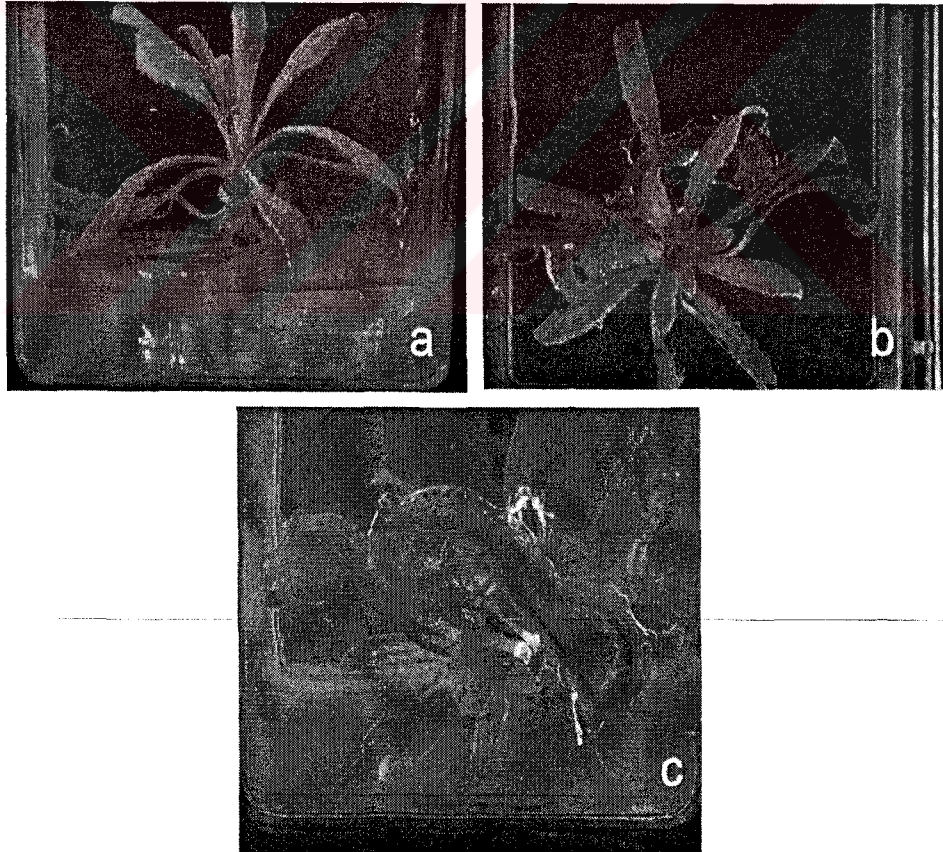
4.2.1. Tohum ç imlenmesi

Dormansiyi kırmak için 13 gün +4 °C (vernelizasyon muamelesi)'de bekletilen bütün tohumların %60 ç amaş ır suyu 10 dk yüzey sterilizasyonu yapılmış birinci denemede 2 mg/l gibberelik asit-GA₃, 2. denemede karanlık 18 °C ve 3. denemede ise aydınlık (16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodu) 24 °C sıcaklıkta tutulmuştur. Ç imlenme başlangıcından 150 gün sonra ç imlenme yüzdelere ait varyans analizine ait sonuçlar Ç izelge 4.7'de verilmiştir. Ç izelge 4.7'de de görüldüğü gibi muameleler ile ç imlenme yüzdesi bakımından fark önemsiz bulunmuştur. 13 gün +4 °C de bırakılan ve karanlık inkübatörde 18 °C de bekletilen tohumlardan yalnızca biri 150 gün sonra

çimlenmiştir (Şekil 4.2). Ayrıca, bitkinin de kök gelişiminin anormal olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar bitkinin tohumdan zor çimlendiğini göstermektedir. Alınan sonuçlara bakıldığında uzun bir vernalizasyon dönemine ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.7. GA₃, karanlık ve aydınlık muamelelerinin *Centaurea* tohumlarının çimlenmesi üzerine ait varyans analizi sonuçları

VK	SD	KO	F
Muamele	2	44,44	1,00
Hata	6	44,44	
Toplam	8		



Şekil 4.2. *C. tchihatcheffii*'nin olgun tohumdan çimlenmesi (a) yandan görünüşü (b) üstten görünüşü (c) alttan görünüşü (anormal kök gelişimi)

4.3. Hızlı Çoğaltım

In vitro teknikleri birçok bitki türünde hızlı çoğaltıma imkan sağlamaktadır (Obleseby, 1978). Bütün bitki çoğaltım tekniklerin amacı, istenen sağlıklı genotiplerin kısa sürede fazla miktarda üretilmesidir. *In vitro*'da kallustan rejenerasyonda somaklonal varyasyon söz konusu olduğundan pratikte bitki çoğaltımında koltuk altı meristemler kullanılır (Hussey 1980; George and Sherrington, 1984; Lindsey and Jones, 1989). Hızlı çoğaltım teknikleri değerli süs bitkilerinin üretiminde ve ticareti yapılan bitkilerin genetik sağlığının korunmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Chu, 1992; Huetemann and Preece, 1993; Mantell et al. 1985; Pierik, 1987).

Centaurea tchihatcheffii yapılan *in vitro* hızlı çoğaltım çalışmalarında koltuk altı meristemleri *in vitro* koşullarda izole edilerek 0,5 mg/l BAP + 0; 0,01 mg/l CPA ve IAA içeren MSO ortamlarında kültüre alınmıştır (Şekil 4.3).

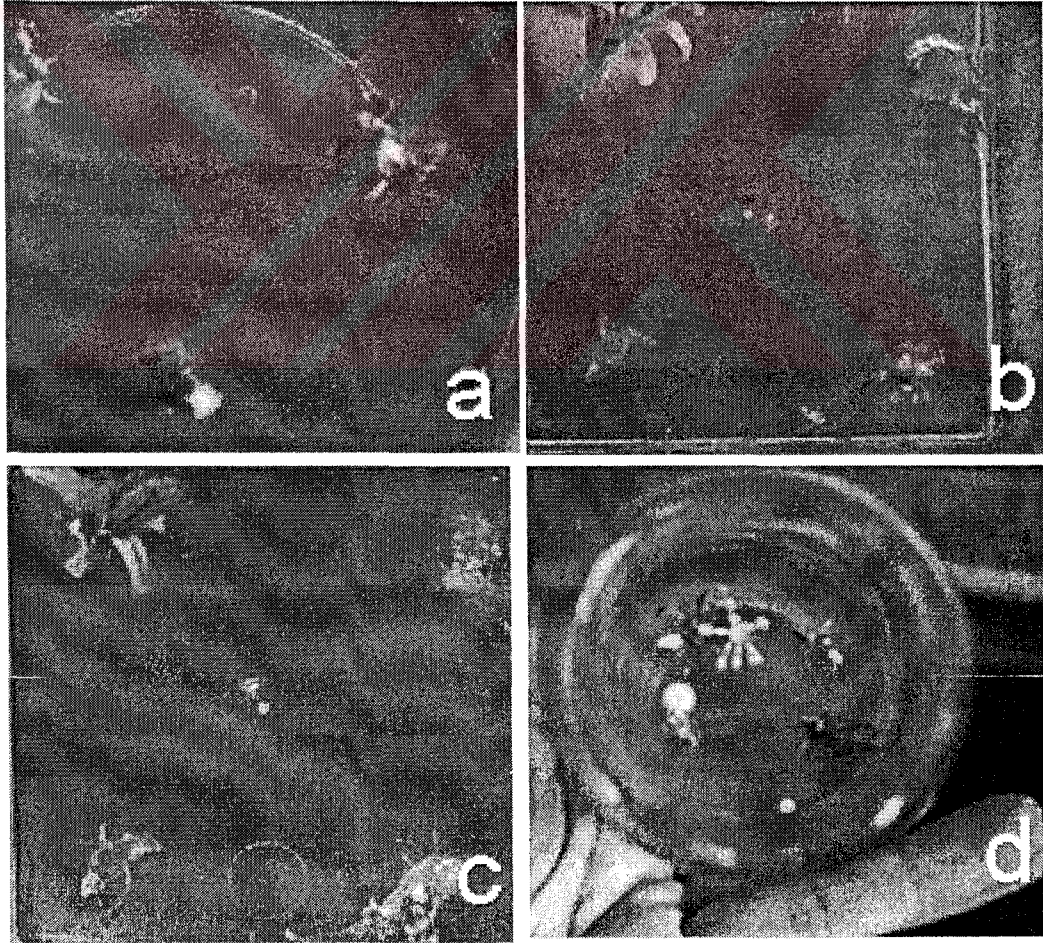
Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, ortalama sürgün uzunluğu ve vitrifikasyon bakımından varyans analizi sonuçları Çizelge 4.8' de verilmiştir.

Çizelge 4.8'e göre kullanılan ortamların sürgün oluşturan eksplant yüzdesine etkisi 0,05 düzeyinde önemli bulunmuştur. Vitrifikasyon ve sararma, eksplant başına sürgün sayısı ve ortalama sürgün uzunluğu bakımından sonuçlar arasındaki fark ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesinde görülen 0,05 farklılığın önem düzeyini belirlemek için yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi sürgün uzunluğu bakımından en iyi sonuç 0,5 mg/l BAP - 0,01 mg/l CPA içeren MS ortamından elde edilmiştir.

Çizelge 4.9'a göre yüksek oranda vitrifikasyon ve sararma gözlenmiştir (Şekil 4.4). Lauzer and Vieth (1992), Kuzey Amerika'da yetiştirilen *Cynara scolymus* bitkisinin Green Globe çeşidinde hızlı çoğaltım ve vitrifikasyon üzerine çalışmışlardır.

Araştırmada, *in vitro*'da tohumdan elde edilen sürgün uçlarından 0,5 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda BAP içeren, MS besin ortamında sürgün rejenerasyonu elde edilmiş ancak, hızlı çoğaltım aşamasında meristematik yaprakların besin ortamına değmesinin vitrifikasyona yol açtığı belirtilmiştir. Bu çalışmada karşılaşılan vitrifikasyon sebebinin eksplantın yüzeye değmesi, besin ortamının şeker konsantrasyonu veya pH değerinden kaynaklandığı düşünülebilir. Sürgün uzunluğu bakımından en iyi değerler 0,5 mg/l BAP - 0,01 mg/l CPA içeren ortamdan elde edilmiştir. 0,05 mg/l BAP yada 0,05 mg/l BAP - 0,01 mg/l IAA içeren ortam arasında ise istatistiksel farklılık yoktur.



Şekil 4.3. Doğadan toplanan *C. tchihatcheffii*'nin genç sürgünlerinin hızlı çoğaltıma alındıktan sonraki (a) 1. hafta (b) 2. hafta (c) 3. hafta (d) 4. hafta

Çizelge 4.8. *Centaurea tchihatcheffii*'nin koltuk altı meristemlerinin hızlı çoğaltılmasına ait varyans analizi sonuçları

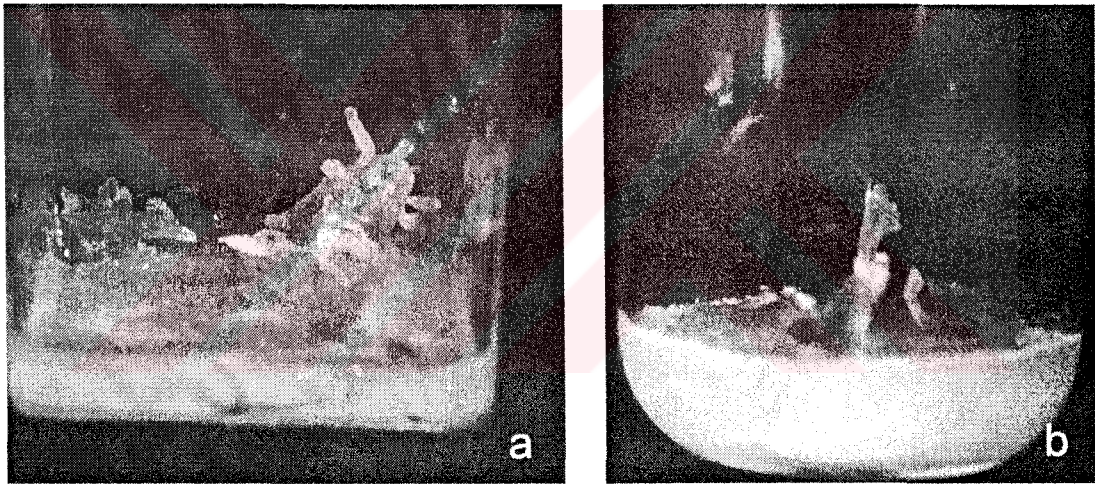
VK	SD	Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi		Eksplant Sürgün Sayısı (adet)	Başına Ortalama Uzunluğu	Sürgün		Vitrifikasyon ve Sararma	
		KO	F			KO	F	KO	F
Bitki Büyüme Düzenleyicileri	2	486,11	0,37*	3,89	1,19	0,42	7,62	277,78	1,00
Hata	6	1319,44		3,27		5,556E-02		277,78	
Toplam	8								

*0,05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.9. *Centaurea tchihatcheffii*'nin koltuk altı meristemlerinin 0,5 mg/l BAP ve 0,01 mg/l IAA ve CPA içeren ortamda hızlı çoğaltımına ait Duncan sonuçları

Ortamlar	Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)	Vitrifikasyon Yüzdesi (%)	Sürgün Sayısı (adet)	Sürgün Uzunluğu*
0,5 BAP	33,33	100,00	1,67	0,20 b
0,5 BAP - 0,01 CPA	50,00	100,00	3,22	0,83 a
0,5 BAP - 0,01 IAA	25,00	83,33	1,00	0,17 b

*0,05 düzeyinde önemli



Şekil 4.4. Doğadan toplanan *C. tchihatcheffii* sürgünlerinin hızlı çoğaltım çalışmasında görülen yüksek orandaki vitrifikasyon ve sararma

4.4. Sürgün Rejenerasyonu

4.4.1. Olgunlaşmamış embriyonik eksenden adventif sürgün

rejenerasyonu

C. tchihatcheffii ile yapılan *in vitro* sürgün rejenerasyon çalışmalarında embriyonik eksen eksplantı steril koşullarda kültüre alınmıştır. Kültüre alınan embriyolar için en uygun çiçek safhasının (çiçek açtıktan 6-8 gün sonra) şekil 4.5. (b)'de olduğu gibi olgunlaşmamış tohum içindeki en uygun

olgunlaşmamış embriyoların ise şekil 4.6 (c)'de gibi (çiçek açtıktan 6-8 gün sonra) olduğu görülmüştür. Kültür başlangıcından 5 gün sonra eksplantlar üzerinde kallus oluşumu başlamış olup 1 hafta sonra da gelişen bu kalluslar üzerinde adventif sürgün uçları gözlenmiştir. Dört hafta sonra sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, magenta başına sürgün sayısı ve vitrifikasyon yüzdesine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, magenta başına sürgün sayısı 0,01 düzeyinde önemli bulunurken, vitrifikasyon yüzdesi (%) önemsiz bulunmuştur. Alınan sonuçlarda görülen farklılığın önem düzeyini belirlemek için yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.10. Olgunlaşmamış embriyonik eksenden dört haftalık adventif sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları

VK	SD	Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı		Magenta Başına Sürgün Sayısı		Vitrifikasyon Yüzdesi (%)	
		KO	F	KO	F	KO	F	KO	F
		Muam.	11	2618,37	3,7**	16,9	12,67*	267,15	12,67*
Hata	24	694,44		1,31		21,08		729,17	
Toplam	35								

*0.05 düzeyinde önemli

**0,01 düzeyinde önemli

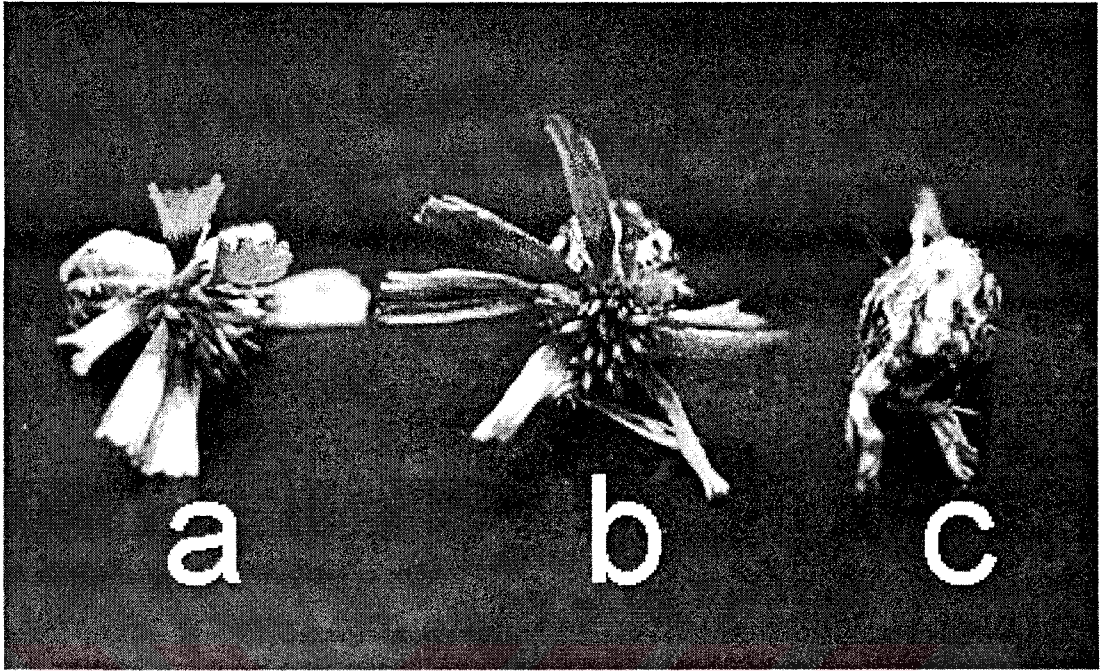
Çizelge 4.11'de görüldüğü gibi sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından en iyi değerler 1, 4, 6 ve 9. ortamdaki elde edilmiştir. Ancak eksplant başına sürgün sayısı ve magenta başına sürgün sayısı dikkate alındığında en iyi sonuçların 9. ortamdaki alındığı gözlenmiştir. Jeannin and Hahne (1991), *Heliantus annuus* Ha300 hattında zigotik embriyogenezis üzerine çalışmalar yaparken en iyi sonuçların BAP ve yüksek oranda sukroz içeren MS ortamında olduğunu tesbit etmişlerdir. Antonova et al. (1992), *Peredovik uluchshennyi* bitkisinde olgunlaşmamış embriyolarda olgunlaşmamış embriyolar üzerinde 1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında 4-7

gün sonra embriyolar oluştuğu bildirmişlerdir. Ayrıca, vitrifikasyon yüzdesi bakımından muameleler arası fark gözlenememiştir. Bu çalışmada da eksplant başına sürgün sayısı dikkate alındığında en iyi ortamın 1 mg/l KİN – 0,25 mg/l NAA içeren MS besin ortamı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7. ve 4.8.).

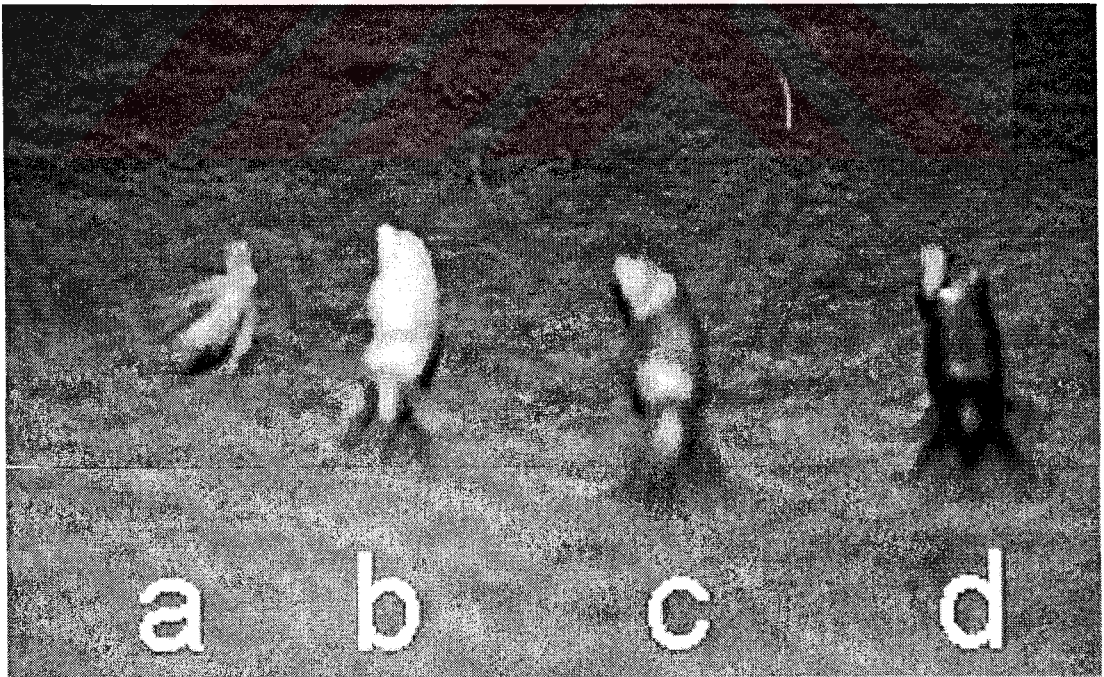
Çizelge 4.11. Olgunlaşmamış embriyonik eksenden dört haftalık adventif sürgün rejenerasyonuna ait Duncan sonuçları

Ortamlar	Muamele		Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı	Magenta Başına Sürgün Sayısı	Vitrifikasyon Yüzdesi (%)
	BAP mg/l	NAA mg/l				
1	1,00	0,50	100,00 a	1,67 cde	6,67 cde	33,33
2	1,00	1,00	50,00 abc	2,17 cde	8,67 cde	33,33
3	2,00	0,50	33,33 c	0,50 e	2,00 e	41,66
4	2,00	1,00	100,00 a	3,25 bcd	13,00 bcd	8,33
5	0,50	2,00	91,67 a	4,75 b	19,00 b	33,33
6	0,50	4,00	100,00 a	3,00 bcd	12,00 bcd	41,66
7	1,00	0,25	83,33 ab	3,33 bc	13,33 bc	25,00
8	2,00	0,25	41,67 bc	1,83 cde	7,33 cde	25,00
	Kinetin mg/l	NAA mg/l				
9	1,00	0,25	100,00 a	9,50 a	38,00 a	8,33
10	1,00	0,50	50,00 abc	2,50 cde	10,00 cde	25,00
11	2,00	0,25	50,00 abc	1,67 cde	6,67 cde	16,67
12	2,00	0,50	25,00 c	1,08 de	4,33 de	8,33

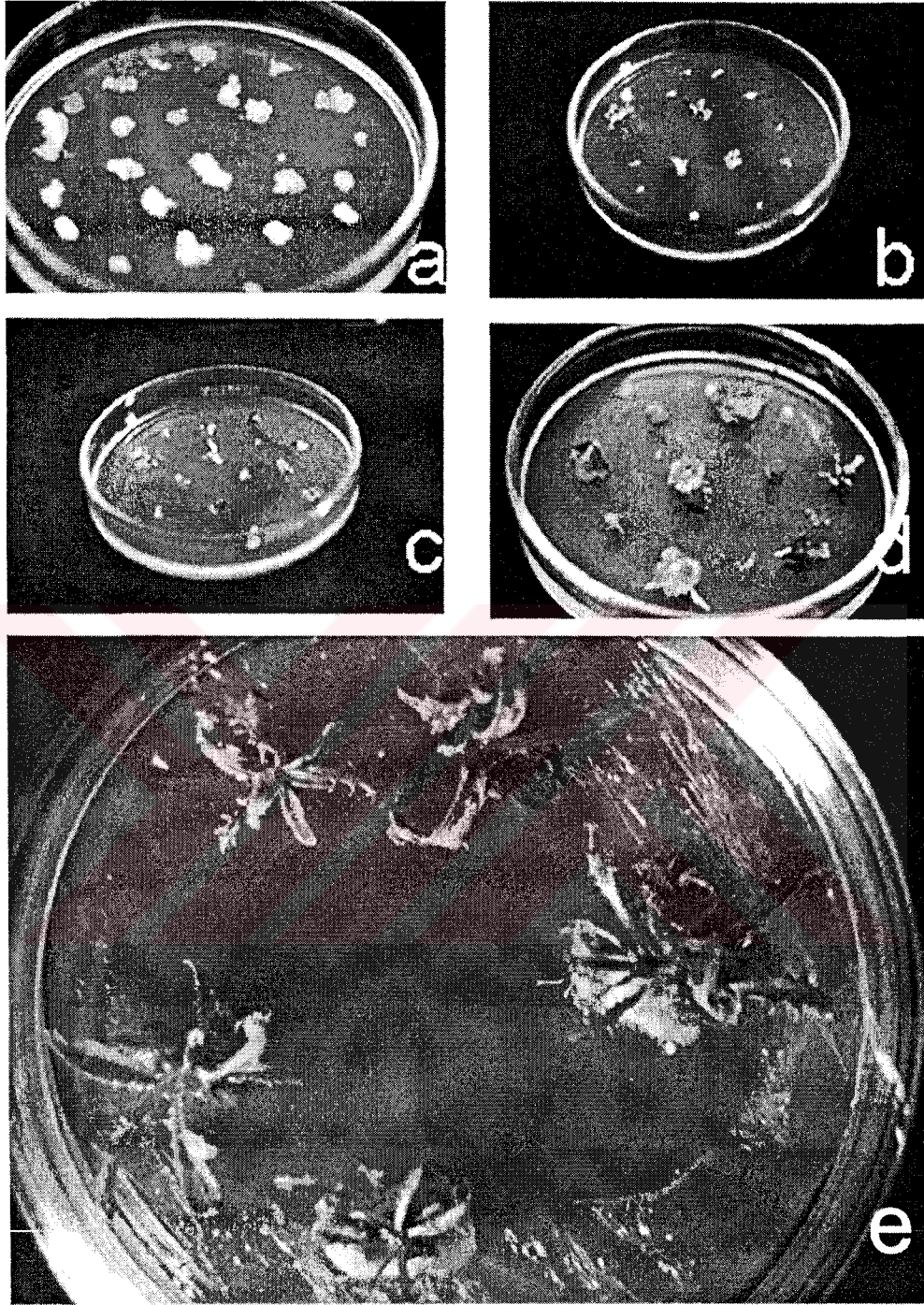
**0.01 düzeyinde önemli



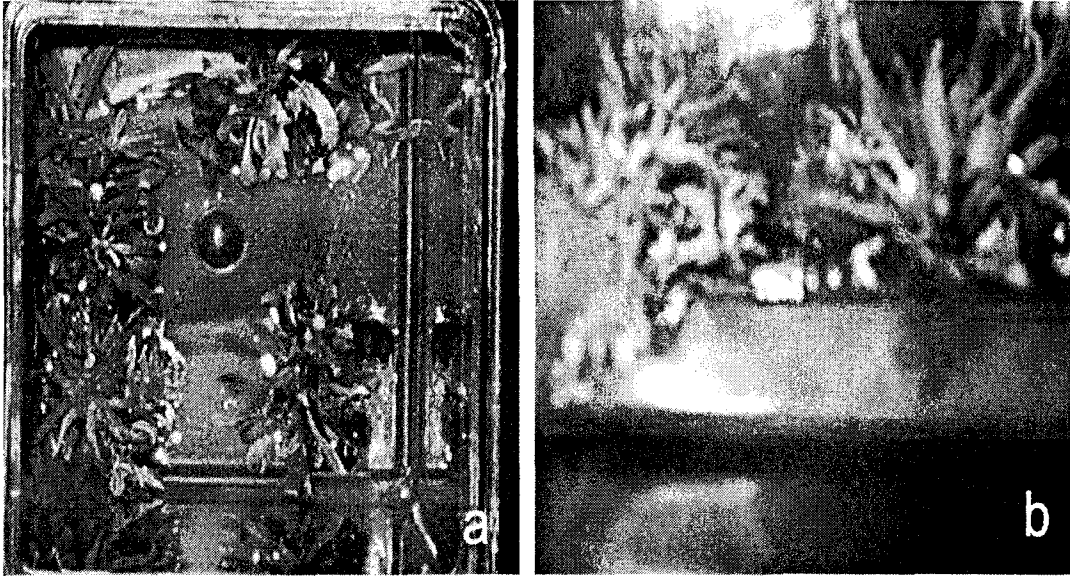
Şekil 4.5. *C. tchihatcheffii*'nin çiçek safhaları



Şekil 4.6. *C. tchihatcheffii*'nin tohum safhaları



Şekil 4.7. Olgunlaşmamış embriyo'dan adventif sürgün rejerasyonu (a) KIN içeren besin ortamında 5 gün sonraki kallus oluşumu (b) BAP içeren MS besin ortamında 1 hafta sonra sürgün uçlarının gelişimi (c) KİN içeren MS besin ortamında 1 hafta sonra sürgün uçlarının gelişimi (d) KİN içeren MS besin ortamında 1,5 hafta sonra sürgün uçlarının gelişimi (e) KİN içeren MS besin ortamında 3 hafta sonra sürgün gelişimi



Şekil 4.8. KİN içeren MS besin ortamında olgunlaşmamış embriyodan 6 hafta sonraki adventif sürgün gelişimi (a) üstten görünüşü (b) yandan görünüşü

4.5. Köklendirme

4.5.1. Serada köklendirme

Gerek *in vitro* gerekse *ex vitro* çalışmaların daha kolay ve hızlı yürümesi için *Centaurea tchihatcheffii* bitkisi köklü olarak Ankara Gölbaşı'ndaki doğal alanından toplanmış ve seraya adapte edilmiştir (Şekil 4.9. a, b).

Doğadan toplanan bitkilerden 8-10 cm'lik 9'arlı genç sürgünler 0; 5; 10 ve 15 dk uygulama sürelerinde 3'erli tekerrürlü denemelerle 0; 500 ve 1000 ppm IBA'da bekletilerek serada steril kum içeren saksılarda köklendirmeye bırakılmıştır (Şekil 4.9. c, d) Köklenen bitkiler saksılara geçirilmiştir. (Şekil 4.9. e, f) Köklenen bitkilerin kök gelişimleri verilmiştir (Şekil 4.10.). Çizelge 4.12'de *C. tchihatcheffii* 'nin 10 cm sürgünlerinden sera koşullarında köklendirmesine ait varyans analizi sonuçları verilmiştir. Çizelge 4.12'deki sonuçlar 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmıştır ve sonuçlar Çizelge 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.9. (a, b) Laboratuvar çalışmasında kolaylık sağlamak amacıyla doğadan toplanan *C. tchihatceffii*'nin bitikisinin sera koşullarında muhafazası (c, d) *C. tchihatceffii* genç sürgünlerin sera koşullarında tohum elde etmek amacıyla IBA muamelesi ile köklenme denemesi (e, f) Köklenen ve çiçeklenen bitkilerin saksılara aktarılması



Şekil 4.10. Doğadan toplanan yeşil sürgünlerden sera koşullarında değişik IBA doz ve sürelerinde köklenme çalışması (a) kontrol (b) 500 ppm IBA 5 dk (c) 500 ppm IBA 10dk (d) 500 ppm IBA 15 dk (e) 1000 ppm IBA 5 dk (f) 1000 ppm IBA 10 dk (g) 1000 ppm IBA 15 dk uygulamalarına ait köklenme

Çizelge 4.12. *C. tchihatcheffii*'nin 10 cm'lik sürgünlerinden 1 haftalık sera koşullarında köklendirilmesine ait sonuçların varyans analizi

VK	SD	Canlı Bitki (adet)		Ölü Bitki (adet)		Kök Oluşturan Bitki (%)		Çiçekli Bitki (%)		Çiçek Süresi (gün)		Açma		En Uzun Bitki (cm)		En Kısa Bitki (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F
Muamele	6	4,87	6,82**	4,87	6,82**	0	-	85,86	59,29**	19,76	59,29**	44,55	65,94**	1,44	10,01**		
Hata	14	0,71		0,71		0		0,62		0,33		0,68		0,14			
Toplam	20																

**0,01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.13. *C. tchihatcheffii* 'nin 10 cm'lik (1 haftalık) sürgünlerinden sera koşullarında köklenmesine Duncan sonuçları

IBA (ppm)	Süre (dk)	Canlı Bitki (adet)	Ölen Bitki (adet)	Kök Oluşumu	Çiçek Oluşturan Bitki	Çiçek Açma Süresi (gün)	En Uzun Bitki Boyu (cm)	En Kısa Bitki Boyu (cm)
500	5	7,33 bc	1,67 bc	0,00	1,00 d	7,33 a	7,50 d	2,45 cd
500	10	7,00 bc	2,00 bc	0,00	6,67 b	3,33 d	15,25 a	3,91 a
500	15	7,00 bc	2,00 bc	0,00	1,00 d	6,33 ab	11,00 bc	2,97 bc
1000	5	6,67 c	2,33 b	0,00	0,00 d	0,00 f	4,12 b	1,91 d
1000	10	5,00 d	4,00 a	0,00	5,00 c	5,33 bc	10,33 c	2,57 cd
1000	15	9,00 a	0,00 d	0,00	15,00 a	2,00 e	12,50 b	3,51 ab
Kontrol	-	8,33 ab	0,67 cd	0,00	1,00 d	5,00 c	3,33 e	2,43 cd

**0,01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.13'teki sonuçlara göre 1. hafta sonunda muamelelerin hiçbirinde kök oluşumu gözlenememiştir. Canlı kalan materyal bakımından en iyi sonuçlar 1000 ppm 15 dk da gözlenmiş olup herhangi bir oksin muamelesi yapılmayan kontrol denemesi de istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir. En düşük sonuçlar ise 1000 ppm 10 dk muameleden elde edilmiştir. Çiçek oluşturan bitki bakımından en iyi sonuçlar 1000 ppm 15 dk da ve en düşük sonuçlar 1000 ppm 5 dk da elde edilmiştir. Çiçek açma süresi bakımından 500 ppm 5 dk muamelesinde çiçekler 7,33 günde ve 1000 ppm 5 dk muamelesinde ise hiç çiçek açmamıştır. 1500 ppm - 15 dk muamelesinde ise çiçekler 2 günde açılmıştır. En uzun bitki açısından en iyi sonuçlar 500 ppm 10 dk da elde edilirken kontrol denemesinde hiç gelişme gözlenmemiştir. En kısa bitki açısından en fazla gelişme 500 ppm 10 dk da elde edilirken en az gelişme 1000 ppm 5 dk da elde edilmiştir.

10 gün sonra sürgünlerinde kök oluşumu başlamıştır. Çizelge 4.14'te *C. tchihatcheffii*'nin köklenmesine ait 15 günlük sonuçlara ait varyans analizi verilmiştir.

Çizelge 4.14'te de görüldüğü gibi köklenme yüzdesi, köklenmeyen bitki yüzdesi, ölen bitki (adet), kök sayısı (adet), kök uzunluğu (mm), toprak üstündeki sürgünlerin uzunluğu (cm) bakımından farklı oranlarda kullanılan IBA ve uygulama süreleri arasındaki farklılık 0,01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Bu farklılıkların önem düzeylerini belirlemek amacıyla yapılan Duncan Testi sonuçları Çizelge 4.15' te verilmiştir.

Çizelge 4.15 Duncan Testi sonuçlarına göre 2. hafta sonunda kontrol denemesi dışında tüm hormon ve uygulama sürelerinde kök oluşumu gözlenmiştir. En iyi kök oluşumu 500 ppm IBA ve 10 dk uygulama süresinde elde edilmiştir. Diğer hormon dozları ve sürelerinde ise sonuçlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz olup, aynı gruba girmiştir. Ölen bitki sayısı bakımından en fazla ölen bitki kontrol denemesinde görülürken en az ölen bitki 1000 ppm 15 dk muamelede gözlenmiştir. Kök sayısı bakımından en fazla kök oluşumu 1000 ppm 5 dk (42,53 adet) da elde edilmiş olup 500 ppm

10 dk; 1000 ppm 10 dk süre ve dozlarındaki kök sayısı sonuçları istatistiksel olarak önemsiz olup aynı sütuna girmiştir. Kontrol denemesinde ise hiç kök oluşumu görülmemiştir. Kök uzunluğu bakımından en fazla gelişme 500 ppm 10 dk da alınmıştır. Yine kontrol denemesi kök oluşumu gözlenmemiştir. Bitkilerin toprak üzerindeki kısımlarının ortalamalarına bakıldığında en iyi gelişme 1000 ppm 5 dk da olduğu görülmüş (34,80 cm) fakat 500 ppm 10 dk süreli muamele ile arasındaki farklılık önemsiz olup aynı gruba girmiştir. Kontrol denemesinde ise en düşük (3,30) gelişme gözlenmiştir.

Desta and Legesse (1998), *Juniperus procera Hochot Endl* bitkisinin genç ve yaşlı sürgünlerinde köklenme sağlamak amacıyla *ex vitro*'da 10^{-3} - 10^{-9} M IAA, IBA, NAA ve 2,4-D ile muamele etmişlerdir. Ofori et al. (1999), *Milicia excelsa* bitkisinde yapraksız sürgünleri *ex vitro*'da 0; 0,016 IBA ile muamele edilmiştir. Çalışmada, 4 farklı köklendirme ortamı (İnce kum, 2 mm; kalın kum, 2-4 mm; talaş ve kalın kum, 1:1) kullanılmıştır. En fazla talaş ortamında köklenme olduğu bildirilmiştir.

Irvingia gabonensis bitkisinde serada yapılan köklendirme çalışmasında; yaprakları koparılan sürgünler 0, 8, 40, 200, 250 µg IBA ile muamele edilerek talaş, ince kum, kalın kum, çakıl, çakıl-talaş (1:1), kalın kum-talaş (1:2) olmak üzere 6 değişik ortamda köklenmeye bakılmıştır. En iyi kök oluşumu 200 - 250 µg IBA'da gözlenmiştir (Shiembo et al., 1996).

Araştırmacıların, farklı hormon ve dozlar kullanarak çeşitli bitkileri serada köklendirme çalışmaları başarılı olmuştur. Bu araştırmada da *C. tchihatcheffii*'nin farklı dozlarda IBA ile muamelesi sonucu köklendirilmesi sağlanmıştır.

Çizelge 4.14. *Centaurea* (2 haftalık) sürgünlerinin sera koşullarında köklendirmesine ait sonuçların varyans analizi

VK	SD	Köklenen Bitki (adet)		Köklenmeyen Bitki (adet)		Ölen Bitki (adet)		Kök Sayısı (adet)		Kök Uzunluğu (mm)		Toprak Üstündeki Kısımın Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F
Muamele	6	8,11	6,31**	22,64	31,69**	8,41	5,70**	574,86	11,02**	44,83	11,42**	306,71	12,72**
Hata	14	1,29	0,71	1,48	52,17	3,92	24,12						
Toplam	20												

** 0,01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.15. *Centaurea sürgünlerinin* (2 haftalık) sera koşullarında köklendirmesine ait Duncan sonuçları

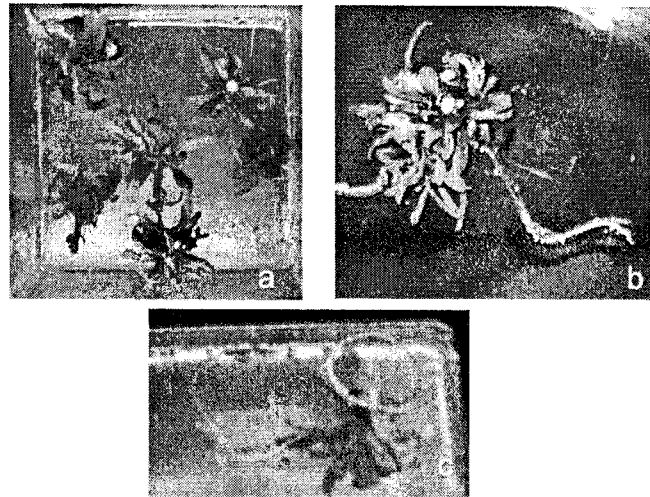
Uygulanan IBA Dozu (ppm)	Süre (dk)	Köklenen Bitki (adet)	Köklenmeyen Bitki (adet)	Ölen Bitki (adet)	Kök Sayısı (adet)	Kök Uzunluğu (mm)	Toprak Üstünde Kalan Kısımın Uzunluğu (cm)
500	5	3,33 a	1,00 cd	3,67 b	18,41 c	5,94 b	21,67 bc
500	10	5,00 a	2,00 cd	2,00 bc	36,42 ab	12,98 a	28,02 ab
500	15	3,33 a	2,33 bc	3,33 b	25,83 bc	6,83 b	21,48 bc
1000	5	4,67 a	0,67 d	3,67 b	42,53 a	8,73 b	34,80 a
1000	10	3,00 a	2,00 cd	4,00 b	30,67 abc	5,97 b	21,67 bc
1000	15	4,00 a	3,67 b	1,00 c	21,73 c	7,14 b	23,28 b
Kontrol		0,00 b	9,00 a	6,33 a	0,00 d	0,00 c	3,30 d

0,01 düzeyinde önemli

4.5.2. Rejenere olan adventif sürgünlerin *in vitro*'da köklendirilmesi

In vitro şartlarda sürgün rejenerasyonunun sağlandığı besin ortamlarında köklenmeyi sağlamak mümkün olmamaktadır. Bu nedenle sürgünlerin sitokin içeremeyen, fakat köklenmeyi teşvik edici hormonların (IBA gibi) bulunduğu ortamlara transfer edilmesi gerekmektedir (Gönülşen, 1987). *C.tchihatcheffii*'nin rejenere olan sürgünleri 1 cm uzunluğuna geldiklerinde kesilerek IBA (0; 0,25; 0,50; 0,75 ve 1,00 mg/l) içeren MS besin ortamlarında 3'erli tekerrürler halinde ve her tekerrürde 4'er eksplant olmak üzere köklendirmeye alınmıştır. Farklı dozlarda IBA içeren ortamlarda sürgünler 12. günden sonra köklenmeye başlamışlardır.

Sekiz hafta sonra kök oluşturan bitki sayısının varyans analizi ve Duncan testi yapmak için yetersiz olduğu gözlenmiştir. Kontrol denemesinde ve 0,75 mg/l IBA'da 1; 0,25 ve 0,50 mg/l IBA'da 2; ve 1,00 mg/l IBA'da 3 adet bitkinin kök oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.17). Mesa et al. (1995), *Heliantus tuberosus* L (*Jerusalem artichoke*) bitkisinde olgunlaşmamış embriyodan köklendirme çalışılmalarında en iyi köklenmenin 0,1 mg/l IAA ve 0,5 mg/l NAA içeren ortamdan elde edildiğini bildirmişlerdir. Cuenca et al. (1998), *Centaurea paui* bitkisinde en iyi köklenmenin ise 2,0 mg/l 3 IAA ve 2,0 mg/l IBA içeren MS ortamından elde edildiğini ve köklenmenin 4 hafta sonra % 40 oranında olduğunu tespit etmişlerdir. Takashi and Daisuke (1997), *Centaurea macrocephala* bitkisinde 25 µM IBA içeren hypnex ortamında sürgünlerin %70 köklendiği gözlenmiştir. Hammatt and Evans (1985), tehdit altındaki *Centaurea junaniana* bitkisinin en iyi köklenme 0,01 mg/l IBA içeren MS ortamında olduğunu bildirmişlerdir. Cuenca and Marco (2000), tehdit altında olan endemik *Centaurea spacchii*'nin tek çeşit oksin kullanımı ile 6 hafta sonunda köklenme oranı düşük olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada da tek çeşit oksin kullanımı sonucu kök oluşumunun düşük oranda olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.11. *In vitro*'da 0,5 mg/l IBA içeren MS ortamda köklendirme (a) üstten (b) yandan (c) alttan görünüşü

4.6. Toprak Analizi

Centaurea tchihatcheffii'nin dünyada sadece Ankara Gölbaşı'nda sınırlı bir alanda yayılış göstermesi ve daha önce bu bölgenin toprak yapısı hakkında elde herhangi bir bilgi olmaması nedeniyle çalışmaya toprak analizi yapılmasının yararlı olacağı düşünülmüştür. Bölgeye ait toprak analizi sonuçları aşağıda verilmiştir. (Çizelge 4.16.).

Çizelge 4.16. *Centaurea tchihatcheffii*' nin yayılış alanındaki toprak yapısı

Kireç- CaCO ₃	pH (1/2,5 toprak / su)	EC (1/2,5 toprak/su)	Organik Madde
8,25	7,27	0,118	1,76
Kil (%)	Silt (%)	Kum (%)	Tekstür sınıfı
44,91	35,19	19,90	C (Kil)

Çizelgede de görüldüğü gibi *Centaurea tchihatcheffii*' nin yaşadığı alandaki toprağın killi özellikte olduğu görülmektedir. İleride bitkinin kültüre alınmasında ve ekonomik olarak değerlendirilmesinde bu bulgular temel teşkil edecektir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Doku kültürü çalışmalarında en önemli aşama sterilizasyondur. Bu çalışmada, tohum yüzey sterilizasyonunda bulaşıklık çok yüksek oranda olup bulaşıklığın önlenmesi bakımından en iyi sonuç %50'lik çamaşır suyu 30 dk ve %60'lık çamaşır suyu ile 10, 20 ve 30 dakika uygulama süresinde sağlanmıştır. Ancak, bulaşık olmayan tohumlarda ise çimlenme gözlenmemiştir. Dormansiyi kırmak için çalışmada 13 gün +4 °C (vernelizasyon muamelesi)'de bekletilip bütün tohumlar %60 çamaşır suyu 10 dk uygulama süresiyle yüzey sterilizasyonu yapıp birinci denemede 2 mg/l gibberellic acid-GA₃, 2. denemede ise karanlık 18 °C ve 3. denemede ise aydınlık (16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodu) 24 °C sıcaklıkta tutulmuştur. Çimlenme başlangıcından 150 gün sonra 13 gün +4 °C'de bırakılan ve karanlık inkübatörde 18 °C de bekletilen tohumlardan yalnızca biri çimlenmiştir. Sonuçlar bitkinin tohumdan zor çimlendiğini göstermektedir. 2001'de Gölbaşı'nda 80 bitki sayılmış olup 2002'de bu sayı 2500 bitkiye ulaşmıştır (Vural, 2002 sözlü konuşma). Doğal koşullarda bitki bir yıl az sayıda olur iken takip eden yıl fazla miktarda bulunabilmektedir. Bu da bize tohumların uzun süre vernelizasyona ihtiyacı olduğunu düşündürmektedir.

Olgunlaşmamış embriyoların sterilizasyonuna bakıldığında %80 oranında bulaşıklık sorununun halledildiği görülmektedir.

Doğadan toplanan yeşil materyalin sterilizasyonunda çift sterilizasyon sayesinde %30 çamaşır suyu dozunda 5 dk uygulama süresinde %33,3 oranında bulaşıklık giderilmiş daha sonra bu eksplantlar 6-8 hafta sonra bitkinin iç kısımlarında kalan bakteri, fungusların eksplantı tekrar bulaştırdığı görülmüştür. Bu nedenle hızlı çoğaltım için yeteri kadar deneme kurulamamış denemeler kısıtlı kalmıştır. Hızlı çoğaltım çalışmasında 0,5 mg/l BAP - 0,01 mg/l CPA içeren ortamda az sayıda da olsa sürgün elde edilmiştir. Ancak, oluşan sürgünlerin boylarındaki artış sınırlı olmuştur. Aynı zamanda hızlı

çoğaltım çalışmasında çok yüksek oranlarda vitrifikasyon gözlenmiştir. Kullanılan % 3 sukrozun vitrifikasyon sebebi olabileceği düşünülmektedir. Bitki materyalin yeterli olmaması nedeniyle vitrifikasyonu düşürmek ve optimizasyonu sağlamak için yeni denemeler kurulamamıştır. Ayrıca kullandığımız oranda IAA' in sürgün oluşumuna etkisi olmadığı da gözlenmiştir.

Olgunlaşmamış embriyonik eksenden adventif sürgün rejenerasyonu elde edilirken sitokinin olarak BAP ve KİN, oksin olarak ise NAA kullanılmıştır. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından en iyi değerlerin 1 mg/l KİN – 0,25 mg/l NAA içeren MS besin ortamında elde edildiği gözlenmiştir. Bitkinin soyunun tehdit altında olduğu düşünülürse tespit edilen 1 mg/l KİN – 0,25 mg/l NAA içeren MS besin ortamının bundan sonraki çalışmalarda sürgün rejenerasyon ortamı olarak kullanılabilmesi ve herbisitlere dayanıklı transgenik bitki elde edilebileceği düşünülmektedir.

Köklenme için 2 ayrı çalışma yapılmıştır. Serada yapılan çalışmada 10. günden itibaren kök oluşumunun başladığı 2. hafta sonunda ise kontrol denemesi dışında tüm hormon ve uygulama sürelerinde kök oluşumu gözlenmiştir. En iyi kök oluşumu 500 ppm IBA ve 10 dk uygulama süresinden elde edilmiştir.

In vitro'daki köklendirme denemelerinde 12. günden itibaren kök oluşumu başlamıştır. Kök oluşturan bitki açısından 3 adet kök veren bitki ile en iyi ortamın 1 mg/l IBA olduğu ve kök uzunluğu bakımından en uzun kökün (6 cm) 0,25 mg/l IBA içeren MS ortamında olduğu gözlenmiştir. Köklenme için kullanılan oksin (IBA) aynı zamanda kallus oluşumunu da teşvik etmektedir. Bu çalışmada da kullanılan IBA dozlarının kallus oluşumunu teşvik ettiği tespit edilmiştir. Yine *in vitro*'daki köklendirme çalışmasında yüksek oranda vitrifikasyona rastlanmıştır. Bunun da kullanılan sukroz oranının bitki için yüksek oranda olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Hem kallus oluşumunun hemde vitrifikasyonun ve sürgün oluşumunu olumlu yönde teşvik ettiği kök oluşumunu büyük oranda engellediği tahmin edilmektedir. 0,5

mg/l IBA içeren MS ortamının hızlı çoğaltım ortamındaymış gibi sürgün (9-10 adet) oluşumunu olumlu yönde teşvik ettiği gözlenmiştir.

5.2. Öneriler

Yapılan bu tez çalışması sonucunda, yurdumuzda endemik olan *C. tchihatcheffii* nin yakın gelecekte tehdit altında olacağı düşünülmesi ve daha önce bu bitki ile ilgili herhangi bir doku kültürü çalışmasının olmaması nedeniyle *C. tchihatcheffii* nin olgun ve olgunlaşmamış tohum ve yeşil materyalinin (doğadan alınan sürgünler) çeşitli oksin ve sitokin içeren ortamlar kullanılarak hızlı çoğaltımı ve yüksek oranda adventif sürgün eldesi amaçlanmıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilen yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyonunu teşvik eden en iyi ortamın belirlenmesi ileride yapılacak olan transgenik bitki eldesi çalışmalarında yardımcı olacaktır. Bitkinin doğada kaybolma riskinin olması nedeniyle elde edilen steril sürgünlerin hızlı çoğaltım ortamına ya da köklendirmeye alınıp tohum elde edilmesi ileriki yıllarda bitkinin geleceğini garanti altına alacaktır. Bu çalışmadaki hızlı çoğaltım sonuçları ümit verici olup bundan sonra yapılacak daha başarılı hızlı çoğaltımlarla bitkiler seri halde üretilip süs bitkisi olarak yurt içi ve dışı pazarlarında haklı yerini alabilecektir.

C. tchihatcheffii'nin yayılış alanında hava su kirliliği yanında toprakların bilinçsiz kirlenmesine de neden olan yabancı otlarla mücadelede kullanılan herbisitler bu endemik bitkinin zarar görerek azalmasına neden olmaktadır. Bitkinin Ankara Valiliği tarafından korumaya alınması en azından herbisitlerle mücadele konusunda daha hassas olunacağını işaretidir. Ayrıca bölgedeki ağaçlandırma çalışmaları da bu step bitkisine zarar vermektedir. Yine koruma alanı olmasına rağmen civar köylülerinin çiçekli dönemde bitkileri tohum bağlamadan koparıp kesme çiçek olarak satması da üzerinde durulması gereken bir konudur. Çevre köylüleri ile yapılan sözlü konuşmalarda bitkinin önemi hakkında herhangi bir bilgiye sahip olmadıkları da tesbit edilmiştir. Gölbaşı Belediyesi tarafından bölgede yapılacak olan bitkinin önemi hakkında seminerler yararlı olacaktır. Bitkinin en yoğun olarak lokalize olduğu

alanda yol yapılması ve bu alan üzerine piknik yeri yapılacak olması *C. tchihatcheffii*'nin gelecek nesillere bu gen kaynağımızın aktarılması konusunda endişeler yaratmaktadır. Ankara Valiliği tarafından bitkinin aynı bölgede 3-5 hektarlık bir alana naklini sağlayıp Ankara ve çevresindeki önemli bitkilerin de bu alana getirilip Botanik Bahçesi yapılarak korunacağı düşüncesi biraz olsun kaygıları hafifletmektedir.



KAYNAKLAR

- Aartrijk, J.V., Linde, P.C.G., Telgen, H. J., Jong, J., 1990, Regeneration of adventitious buds in ornamental species, **Integration of *in vitro* Techniques in Ornamental Plant Breeding. Proc. Symp.**, 10 (14), 7-20.
- Ammirato, P.V., 1983, An embryogenesis, **Handbook of Plant Cell Culture**, Evans, D.A., Sharp, W. R., Ammirato, P.V. and Yamada, Y. (eds.), vol. 1, Macmillan, New York, 82-123.
- Ammirato, P.V., 1983, The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures, suspension culture techniques and hormone requirements, **Biotechnology**, 1, 68-74.
- Antonova, T.S., Borovkov, A.Y., Zezul, T.G., Krasnyanskii, S.F., 1992, Somatic embryogenesis in callus from immature embryos of sunflower, **Sel'skokhozyaistvennaya- Biologiya**, 1, 36-42.
- Arelo, E.F., Pasqual, M., Pinto, J., Barbosa, M, 1991, *In vitro* establishment of exsplants and seedling regeneration, In: **Gerbera jamesonii Bolus ex. Hook em cultura de tecidos**, Pesquisa - Agropecuaria Brasileira, 26 (2), 269-273
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M.A., 2001, Doku Kültürü: Temel laboratuvar teknikleri, In: **Bitki Biyotek. Doku Kült. ve Uygulam.**, S.Ü. Vakıf Yayınları, Konya 1-35, 262-281
- Baytop, T., 1984, *Centaurea*'nın Tıbbi bitki özelliği, **Türkiye'de Bitkileri ile Tedavi**, İstanbul Üniv. Eczacılık Fak. Yayınları, 354.
- ByeongSam, K, OuiWong, K., DongChul, K., GunHee, K., 1999, Development of a surface sterilization system combined washing process technology for leafy lettuce, **Proc. Intern. Symp. Quality of Fresh and Fermented Vegetables, Seoul- Korea Rebuclic**, 483, 311-317.
- Bhattacharya, P., Dey, S., 1998, Effect of collection season and dimethylsulfoxide pretreatment of explants on micropropagation of *Mussaenda philpica*, **Ind. J. Exp. Biol.**, 36 (10), 1061-1064.
- Bhatti, K.M., 2001, Mercimek (*Lens culinaris* Medik)'te doku kültürü çalışmaları ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı, **Doktora Tezi, Ankara Üniv. Fen Bil. Enst.**, 1-147.
- Biondi, S. and Thorpe, T.A., 1982, Requirements for a tissue culture facility, **Plant Tiss. Cult.**, Academic press, New York, 1-20.

- Bouyoucos, G.J., 1951, A recalibration of the hygrometer method for making mechanical analysis of soils, **Agron. Journ.**, 43, 434-438.
- Bremner, J.M., 1985, Methods of soil analysis part 2. Chemical and microbiological properties, **Ed. A.C.A. Black American Soc. Agron. Inc. Pub. Agronomy series, 9, Madison**, 1-100.
- Carl, D.L. and George, S.A., 1938, The development of the embryo of *Zizania aquatica* in the seed and the artificial culture, **Bull. Torrey Botan. Club**, 65, 583-586.
- Chu, I.Y.E., 1992, Perspectives of micropropagation industry, **Transplant production systems, Kratta, K. and Kozai, T (eds)**. Kluwer Academic, Amsterdam, 137-150.
- Cirik, S., Cirik, Ş., Dalay, M.C., 2001, Su bitkilerinin biyolojisi, ekolojisi, yetiştirme teknikleri, **Ege Üniv. Su Ürünleri Fak. Yayınları no: 61**, İzmir.
- Crocer, W. and Barton, L.W., 1953, Physiology of seeds, **Choron. Bot.**, 216-229.
- Cuenca, S. and Amo-Marco, 2000, *In vitro* propagation of *Centaurea spachii* from inflorescence stems, **Plant Growth Regul.**, 30, 99-103.
- Cuenca, S., Amo-Marco, J.B. and Parra, R., 1998, Micropropagation from inflorescence stems of the Spanish endemic plant *Centaurea pauri* Loscos ex. Willk. (Compositae), **Plant Cell Rep.**, 18, 674-679.
- Davis, P.H., 1975, **Flora of Turkey and The East Aegean Islands**, 5, 581-582.
- Destá, B. and Legesse, N., 1998, Asexual propagation of *Juniperus procera* from Ethiopia: a contribution to the conservation of African pencil cedar, **Forest Ecol. and Management**, 112 (1-2), 179-190.
- Ekim, T., 1994, *Centaurea tchihatcheffii*, **The Karaca Arboretum Mag.**, 2, part 3.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N., 2000, **Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı**, 1-41, 221.
- Encheva, J., Ivanov, P., Tsvetkova, F. and Nikolova, V., 1993, Development of a new initial breeding material in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using direct organogenesis and somatic embryogenesis, **Euphytica**, 68 (3), 181-185.

- Estrella, J.E. and Lazarte, L., 1994, *in vitro* propagation of jicama (*Polymnia sonhifolia* Poeppig & Endlicher): a neglected Andean crop, **Hort Sci.**, 20-25.
- Evans, D.A., Sharp, W.R and Flick, C.E., 1981, Growth and behaviour of all cultures. In: **Plant Tissue Culture - Methods and Applications in Agriculture** Thorpe, T. A. (Ed.), 45-113.
- Gönülşen, N. 1987, Bitki doku kültürü yöntemleri ve uygulama alanları, **T.O.K.B. Ege Tarımsal Araştırma Ens. Müd.** Yayın no:78, 140, Menemen – İzmir.
- Gönülşen, N. ve Özcan, S., 1983, Asma (*Vitis sp.*)'nin doku kültürü ile üretilmesi üzerinde araştırmalar, **TÜBİTAK, TOAG, VII. Bilim Kongresi (1980)**, 291-297.
- Grzegorzcyk, W. and Walker, M.A., 1997, Surface sterilization of grape *phylloxera* eggs in preparation for *in vitro* culture with *Vitis sp.*, **Am. J. of Ecol. and viticult.**, 48 (2), 157-159.
- Hammat, N. and Evans, P.,K., 1985, The *in vitro* propagation of an endangered species: *Centaurea junoniana* Svent. (Compositae) , **J. of Hort. Sci.**, 60 (1), 93-97.
- Han, Y., Xi, T., 1989, Rapid propagation of lettuce by embryos, **Plant Physiol. – Commun.**, 2, 17-20.
- Heloir, M., Fournioux, J., Oziol, L. and Basis, R., 1997, An improved procedure for the propagation of *in vitro* of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir) using axillary- bud microcuttings, **Plant Cell. Tiss. Org. Cult.**, 49, 223-225.
- Hosoki, T. and Kimura, D., 1997, Micropropagation of *Centaurea macrocephala* Pushk. Ex Willd. by Shoot- axis Splitting, **Hort Sci.**, 32 (6), 1124-1125.
- Huetemann, C.A. and Preece, J.E. 1993, Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture, **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 33, 105-119.
- Hussey, G., 1980, Micropropagation, **The Garden**, 106 (7-8), 286-291; 321-325
- Jeanin G, Hahnen, G., 1991, Donor plant growth conditions and regeneration of fertile plants somatic embryos induced on immature zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus* L.), **Plant Breeding**, 107 (4), 280-287.

- Krogstrup, P. and Norgaard J.V. 1992, Micropropagation of *Psiada coronopus* (Lam) Benth, a threatened endemic species from the island of Rodrigues, **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, 7 (2), 227-230.
- Kyte, L., 1987, Micropropagation, plants from test tubes, **An Introduction to Micropropagation Timber Press Portland**, 59-78.
- Lauzer, D. and Vieth, J. 1992, Micropropagation of seed derived plants of *Cynara scolymus* L. cv. 'Green Globe', **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 21 (3), 237-244.
- Lindsey, K. and Jones, G.K., 1989, Plant biotechnology in Agriculture, Chapter 4 **Current Applications of Plant Cell and Tissue Culture, Open Univ. Press**, 57-58.
- Mantell, S. H., Maathews, J. A., and Mckee, R.A., 1985, Principles of plant biotechnology, **Blackwell Sci. Pub. Boston**, 130-157.
- Marks, G.E., 1973, Selecting asparagus plants as sources of haploids, **Euphytica**, 22, 330-316.
- McLean, E.O., 1982, Soil and lime requirement, In: **Methods Of Soil Analysis Parts 2. Chemical And Microbiological Properties 2nd addition**, Ed. A.L. Amer. Soc. of Agron; 199-224, Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- McLoughlin, A.J. and Kuster, E., 1972, The effect of humic substance on the respiration and growth of microorganisms, **Plant and Soil**, 37, 17-25.
- Mesa, A.R., Lajonchere, G. and Prieto, M., 1995, Rapid micropropagation of *Helianthus tuberosus* L. (*Jerusalem artichoke*), **Pastos- y-Forrajes**, 18 (1), 103-105.
- Miller, T. and Skoog, F. 1953, *In vitro* culture of higher plants, **Am J. Bot.**, 40, 768-773.
- Mohamed-Yasseen, Y. and Splittstoesser, W.E., 1991, *In vitro* regeneration of plants from stored *Witloof chicory*, **Plant Growth Regul. Society of America-Quarterly**, 19 (1), 41-45.
- Moutia, M. and Dookun, A., 1999, Evaluation of surface sterilization and hot water treatments on bacterial in bud culture of sugarcane, **Experimental Agric.**, 35 (3), 265-274.
- Murashige, T., 1974, Plant propagation through tissue cultures, **Annu. Rev. Plant Physiol.**, 25, 135-166

- Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, **Physiol. Plantarum.**, 15, 473-497
- Naseem, A.A., Tahir, F. and Sultana, K., 1998, Optimal sterilization procedure for *Cicer aritinum* L. seeds, **Hamdard Medicus**, 42 (2), 49-50
- Nelson, D.W. and Sommers, L.E., 1982, Total carbon, organic carbon, organic matter, In: **Methods of soil analysis part 2. Chemical and Microbiological Properties Second Addition**, Ed. A.L. Am. Soc. Agron., 539-579
- Nelson, R.E., 1982, Carbonate and gypsum, In: **Methods of Soil Analysis Part 2. Chemical and Microbiological Properties Second Addition**, Ed. A.L. Am. Soc. Agron, 181-197.
- Nitsch 1968, as cited by Pierik, R.L.M. 1987, *In vitro* culture of higher plants, **Ann. Sci. Nat. Bot. Biol.**, 9, 1-92.
- Obleseby, R.P., 1978, Tissue cultures of ornamentals and flowers, problems and perspectives, In: **Propagation of higher plants through tissue culture**, Hughes, K. W. S., Henke, R and Constantine, M. (eds.), U.S. Dept. Energy, Washington, D.C.
- Ofori, D.A. Newton, A. C., Leakey, R.R.B. and Grace, J., 1999, Vegetative propagation of *Milicia excelsa* by leafy stem cuttings: effects of auxin concentration on leaf area and rooting medium, **Forest Ecol. Management**, 84, (1-3), 39-48.
- Olsen, S.R., Cole, C.V., Watanabe, F.S. and Dean, L.A., 1954, Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate, **U.S. Deptt. of Agric.**, 339.
- Özcan, S. ve Özgen, M., 1996, Bitki genetik mühendisliği, **Kükem Dergisi**, 1, 69-95.
- Parhasarathi, B., Satyahari, D., Bhattacharya, P. and Dey, S., 1998, Effect of collection season and dimethyl sulfoxide pretreatment of explants on micropropagation of *Mussaenda phillipica*, **Indian J. Exper. Biol.**, 36 (10), 1061-1064.
- Paulet-1965 as cited by Pierik, R.L.M. 1987, *In vitro* culture of higher plants., **Rev. Gen. Bot.**, 72, 697-792.
- Pierik, R.L.M., 1987, *In vitro* culture of higher plants, **Martinus Nijhoff Dordrecht**, 139-154 and 183-230.

- Raghavan, V.D., 1980, Embryo culture, In: Vasil I.K. **Perspectives in plant Cell and Tissue Culture**, 209-236.
- Richards, L.A., 1954, Diagnosis and improvement of saline and alkali soils, **U.S. Deptt. Agric. Handbook**, 18-19.
- Sakr, S.S., Badawy, E.M, Morsi, H.A., El-Bahr, M.K. and Taha, H.S., 1991, Regeneration of *chamomile* plant (*Chamomilla recutita*, L.), **Bull. Fac. Agric., Univ. Cairo**, 42 (2), 1461-1483.
- Sarvesh, A., Reddy, T.P. and Kishor, P.B., 1993, Plant regeneration from cotyledons of *niger*, **Plant, Cell, Tiss. Org. Cult.**, 32 (2), 131-135.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L. and Leblebici, E., 1995, Asterales, **Tohumlu Bitk. Sist.**, 296- 301.
- Seneviratne, P., Flegmann, A.W. and Wijesekara, G., 1995, The problem of surface sterilization of shoot materials of *Hevea*, **J. Rubber Res. Sri Lanka**, 75, 51-60.
- Shiembo, P.N., Newton, A.C. and Leakey, R.R.B., 1996, Vegetative propagation of *Iringia gaboensis*, A West African fruit tree, **Forest Ecol. Management**, 87 (1-3), 185-192.
- Smith, P.G. 1944, Embryo culture of the tomato species hybrid, **Am. Soc. Horticult. Sci.**, 44, 147-215.
- Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. 1967, Statistical methods, **The Iowa State Univ. Press, Iowa. USA.**
- Soil Survey Manual, 1951, **U.S. Dept. Agric. Handbook**, 18.
- Spinchanu, E.K. and Butenko, R., 1991, Effect of light spectral composition on growth and development of *Artemisia balchanarorum* cuttings *in vitro*, **Soviet-Plant-Physiol.**, 38 (4), 765-773.
- Synge, H., ed., 1981., **Biological aspects of rare plant conservation**, Wiley, 1-100.
- Takashi, H. and Daisuke, K., 1997, Micropropagation of *Centaurea macrocephala* Pushk. Ex. Willd. by shoot axis splitting, **Hort Sci.**, 32 (6), 1124-1125.
- Taylor, M., Taufan, L. and Drew, R.A., 1998, Decontamination of *kava* (*Piper methysticum*) for *in vitro* propagation, **Proc. Intern. Symp. Biotechnol. Tropical and subtropical species**, 461, 267-274.

- Vural, M. ve Adıgüzel, N., 2001, Yanardönerler ağaçlara karşı, **Yeşil Atlas**, 4, 125.
- Webrouck, S.P.O. and Debergh, P.C., 1994, Applied aspects of plant regeneration (micropropagation) In: Dixon RA, Gonzales RA (eds), **Acta Hort.**, 226 (1),121-129.
- Whipkey, A., Simon, J.E., Charles, D.J. and Janick, J., 1992, *In vitro* production of artemisinin from *Artemesia annua* L. **J. Herbs Spices Medicinal Plants**, 1, 1-2.
- Woods, A., 1982, The propagation and distribution of rare and abdangered plants, **IUCN Threatened Plants Committee Newsletter**, 9, 14-15.
- Xialoi, Z., Yang, H., Wenjie, Y. and Ti, X., 1992, Somatic embryogenesis and analysis of peroxidase in cultured lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Annals of Bot.**, 69 (2), 97-100.
- Yueng, E.C. 1981, *In vitro* fertilisation and embryo culture, **The Plant Tissue culture**, (ed. T.A. Thorpe), Academic press, New York, 253-271.
- Yıldız; M. 2000, Keten (*Linum usitatisimum*) bitkisinde adventif sürgün rejenerasyon ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı. **Doktora Tezi, Ankara Üniv. Fen Bil. Enst.**,1-135.
- Zito, R.K., Sedyama, C.S., Sedyama, T., Gomes, J.L.L. and Rocha, V.S., 1998, Use of sodium hypochlorite and alcohol for surface sterilisation of soybean seeds, **Revista-Ceres**, 42 (244), 637-643.

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Balıkesir (Edremit)'de doğdu. İlk orta ve lise öğrenimini Edremit'te tamamladıktan sonra 1994 yılında girdiği Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Bölümünden 1999 yılında mezun oldu. Aynı yıl Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Yüksek Lisansa başladı. Kasım 2000'de Kırkkale iline sınıf öğretmeni olarak atandı. 2002 Şubatında Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Araştırma görevlisi oldu ve halen görevine devam etmektedir. İngilizce bilmektedir.



**GAZİ ÜNİVERSİTESİ KURULU
EDREMIT YAYIN MERKEZİ**