

1.GİRİŞ

Türkiye, bitki çeşitliliği bakımından dünyanın en zengin ülkelerinden biridir. Bu oluşumun en önemli nedenleri; iklim farklılıkları, topografik, jeolojik ve jeomorfolojik çeşitlilikler, deniz, göl, akarsu gibi değişik su ortamı çeşitlilikleri, yükseklik ve ekolojik farklılıklardır (Atalay, 1994). Türkiye florasının ilginçliği, bu farklılıkların sonucu olarak meydana gelen tür zenginliğinin yanısıra, çok sayıda endemik tür içermesinden de kaynaklanmaktadır (Özel, 2002). Endemik sözcüğü botanikte bölge, kıta, ülke gibi sınırlı yayılışa sahip bitki grupları için kullanılmaktadır. Fakat pratikte büyük çoğunlukla, yeryüzünün sadece bir bölgesinde veya daha küçük alanlarında yayılış gösteren türler için endemik terimi kullanılmaktadır. Endemik türlerin sınırlı yayılışı iki nedenden kaynaklanabilmektedir:

1. Bitki eski jeolojik devirlerde geniş bir yayılışa sahip iken, daha sonra çevre koşullarının değişmesi sonucu büyük oranda ortadan kalkmış olabilir. Bu durumda tür sığınabildiği çok özel çevre koşullarında varlığını devam ettirebilir. Bu türler için '*paleoendemik*' veya '*konservatif endemik*' terimleri kullanılmaktadır. Bunlar aynı zamanda çok eskiden kalma oldukları için '*relikt türler*' olarak da bilinirler.

2. Sınırlı yayılışın ikinci nedeni olarak, türün yeni oluşu gösterilebilir. Bunlar henüz yayılma aşamasında olduklarından, yayılış alanları dardır. Bu türler için '*neoendemik*' terimi kullanılmaktadır (Gemici et al., 1992).

Ülkemizde bulunan 9222 bitki türünün, 2891'i endemiktir (Erik ve Tarıkahya, 2004). Avrupa ülkelerindeki endemik tür sayısı toplamı 2750 kadar (Ekim et al., 2000) iken Türkiye'de bu sayının bu kadar fazla olması önemlidir. Bu nedenle doğal kaynakları koruma alanlarında, endemizmin sebep ve sonuçları araştırmacıların ilgisini çeken bir konudur.

Endemik ve endemik olmayan bitkilerimizin çoğu nesillerini devam ettirirken, sanayileşme ve şehirleşme, tarım alanlarının genişletilmesi, turizm olayı, doğadan çeşitli amaçlar için toplanma, tarımsal mücadele ve kirlenme, ağaçlandırma, yangın gibi nedenlerden kaynaklı tehlikelerle karşı karşıyadırlar. Bunun yanı sıra, endemik

bitkilerimizin birçoğu bozkır ya da yüksek çayırlarda ve ormanlık alanlarda bulunmaktadır. Bunlardan bozkır ve yüksek dağ çayırlarında bulunanları aşırı otlatma, ormanlarda bulunanları ise aşırı tahribin tehtidi altındadır. Gerek bitki biyoçeşitliliği, gerekse yüksek endemizm oranı ve bu bitkilerin karşı karşıya oldukları tehlikeler göz önüne alındığında ülkemize ait güncel koruma stratejilerinin belirlenmesi gereği ortaya çıkmaktadır. Birçok önemli ve endemik bitki türünün yeterince korunması, tehlike altına girmemesi veya yok olmaması konusunda araştırmacılara bu anlamda büyük sorumluluklar düşmektedir.

Türkiye’de bulunan endemik bitkilerin tamamı ile endemik olmayıp soyu tehdit altında olan türler, 1994 yılında IUCN (International Union for Conservation of Nature and Naturel Resources =Dünya Koruma Birliği) tarafından teklif edilen “RED DATA BOOK KATEGORİLERİ” ne göre sınıflandırılmış ve “Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı” adı ile yayınlanmıştır (Ekim et al., 2000). Adı geçen eserde hazırlanan listeler, doğa korumacılarının neyi korumalarını göstermesi açısından kuşkusuz büyük önem taşımaktadır. Ancak zamanımızın ünlü taksonomistlerinden birisi olan İsviçre’li botanikçi Greuter (1979)’ın “*Bitkinin yayılışı, populasyon genişliği, ekolojik istekleri, fizyolojik toleransı, döllenme sistemi, tozlaşma ve yayılma ekolojisi, çimlenme fizyolojisi, fide ve gelişmiş devrelerindeki rekabet derecesi, hatta popülasyondaki böcekler gibi populasyon yaşamının devamı ile doğrudan ilgili bir çok konular hakkında ayrıntılı bilgiler gerekir.*” cümlesiyle de belirttiği gibi bitki yaşam döngüsünün aydınlatılması büyük önem taşımaktadır. Bu anlamda, çeşitli tehdit kategorilerinin oluşturulması ve bu kategorilere giren taksonların belirlenmesinin yanı sıra, sözü edilen bitkilerle ilgili olarak ayrıntılı biyolojik çalışmalar yapılması ve korunmalarına ilişkin alışlagelmiş ya da alternatif yöntemlerin oluşturulması araştırmacıların üzerinde durması gereken önemli bir konudur.

Endemik ya da endemik olmayıp soyu tehdit altında olan türlerin korunmasına ilişkin *in situ* ve *ex situ* olarak ayrımlanmış farklı stratejiler bilim dünyası tarafından kullanılmaktadır. En uygun stratejinin hangisi olduğu ise türden türe değişiklik göstermektedir (Fay, 1994).

In situ koruma, tehdit altındaki türlerin doğal parklar ya da doğal rezervlerde korunmasıdır. Milli parklar, tabiatı koruma alanları, tabiat parkları, tabiat anıtları, biyogenetik rezerv alanları, yaban hayatı koruma alanları, üretim istasyonları, gen koruma alanları, tohum meşçereleri ve özel çevre koruma bölgeleri bu yöntem içinde değerlendirilmektedir. Bu yöntemde genler ve türler, doğal yaşama ortamlarında diğer canlılarla birlikte, biyolojik bütünlük içinde korunur. Doğal çevrede devamlılık sağlamanın yararlarından biri, sorunlu türlerin kendi doğal fizyolojik ve biyolojik çevreleriyle ilgili olarak gelişmesidir (Krogstrup et al., 1992).

Ex situ koruma, bitki türlerinin doğal habitatlarından uzaklaştırılarak biyolojik çeşitliliğin doğal ortamlar dışında korunmasıdır. Tohum bankaları, sperm ve yumurta bankaları, klon bankaları, doku kültürü koleksiyonları, koleksiyon bahçeleri, botanik bahçeleri, arboretumlar, hayvanat bahçeleri gibi tesisler *ex situ* korumanın temel unsurlarındandır. Bu yöntemle materyaller kontrollü koşullarda korunabilmektedir, ancak bu yöntemin en önemli dezavantajlarından biri doğal evrimin durması ve yapay seleksiyon baskısı zorlamasıdır (Ashton, 1987).

Ex situ olarak elde edilmiş bireyleri kullanarak yabani popülasyonların güçlendirilmesi, nesli tükenmekte olan türlerin veya popülasyonların tükenme riskini azaltan önemli bir araç olarak düşünülmektedir (Bowes, 1999). Bu çalışmalarda öncelikle türün çimlenme özellikleri ile ilgili ayrıntılı araştırmalar yapılması gerekmektedir.

Tohum dağılımı ve çimlenme, türün ortamlarla uyumu için büyük öneme sahip olan üreme döngüsü evreleridir (Navarro and Guitian, 2003). Bitki hayatının başlangıç safhası olan çimlenme, tohumda büyümenin başlaması ve yedek besin maddelerinin embriyo büyümesinde kullanılmak üzere harekete geçerek, embriyonun tohum kabuğundan dışarı çıkması olayıdır (Çelik v.d. 1995). Değişen çevresel şartlara adaptasyonun bir sonucu olarak her tür, çimlenme için belirli koşullara ihtiyaç duyar (Harper et al., 1970; Stebbins, 1971; Fenner, 1985; Meyer and Monsen, 1991; Schütz and Milberg, 1997). Ancak çimlenme için gereken koşulları genel olarak iç ve dış koşullar olmak üzere iki bölümde toplamak mümkündür. İç koşul, tohumun oluşum ve yapı bakımından gelişebilme yeteneğinde olmasıdır. İçsel olarak gelişimini

tamamlamış bir tohumun çimlenebilmesi, uygun dış koşulların bulunmasını gerektirir. Ortamın her türlü etmenini kapsayan dış koşullar ise, başta su olmak üzere sıcaklık, ışık ve havanın oksijenidir.

Çimlenmenin başlayabilmesi için öncelikle tohumun su alıp şişmesi gerekir. Su olmadan tohumun endospermde, perispermde ve embriyosunda depo edilmiş besin maddeleri mobil şekle dönüşemez. Tohumun su içeriği artınca, kabukta karbondioksit ve oksijen geçirgenliği son derece artar. Tohum su almaya başlar başlamaz, tohumda meydana gelen ilk değişim solunum oranındaki artıştır; sonrası ise sırasıyla depo maddelerinin yıkımı, yıkılan ürünlerin embriyoya taşınması ve oluşan hidroliz ürünlerini kullanarak embriyonun yeni metabolik ürünleri sentezlemesiyle içeriğinde meydana gelen değişimdir. Tohumdaki depo ürünlerinde meydana gelen bu değişimler, kuru tohumlarda var olan, ancak su alınımı sürecinde aktifleşen enzimler sayesinde olur (Mayer and Poljakoff-Mayber, 1989).

Çimlenme için gereken dış koşulların en önemlilerinden biri de sıcaklıktır. Sıcaklık ihtiyacı türden türe değişiklik göstermektedir. Bazı türlerin tohumları yüksek sıcaklıkta çimlenirken, bazılarının ise düşük sıcaklıkta çimlenebilmektedir (Kaşka ve Yılmaz 1974; Bewley and Black 1986; Günay 1992; Martinez-Ghersa et al.,2000; Tobe et al.,2000).

Çimlenmeye geçişte bir diğer önemli faktör ışıktır. Işığın şiddeti, dalga boyu ve süresi çimlenmeyi etkilemektedir (Kaşka ve Yılmaz 1974, Andersson et al., 1997, Benvenuti and Macchia 1997; Densmore 1997; Noranha et al.,1997, Leinonen and Chantal 1998). Bazı türlerin tohumları çimlenme için ışığa gereksinim göstermesine rağmen, bazı türlerde ışıktaki bırakma çimlenmeyi engellemektedir (Devlin, 1975).

Tüm bu faktörler göz önüne alındığında, şayet tohumlar belli bazı koşullar altında çimlenmelerini tamamlayamıyorlarsa, o zaman dormansiden söz edilir. Dormansi, tohumların çimlenme ve büyüme kabiliyetlerini azaltan fizyolojik bir olaydır. Dormansi; i) embriyoda oluşan faktörler (içsel dormansi, primer dormansi), ii) bitkide oluşan anatomik ve biyokimyasal faktörler (kabuk ve engelleyiciler), iii) çevresel faktörler (yüksek veya düşük sıcaklık, olumsuz ışıklandırma süresi, ekilen

ortamda düşük su potansiyeli, uygulanan kimyasal engelleyiciler, sekonder dormansi) tarafından oluşturulmaktadır (Khan, 1977).

Tohum gelişimindeki yetersizlikler, çimlenme engelleri ve çimlenme koşulları özgül bir çimlenme fizyolojisi alanını oluşturmaktadır. Bu olayı, ülkemize özgü endemik bitkiler boyutunda ele aldığımızda, konu üzerindeki araştırmaların çok kısıtlı olduğu görülmektedir. Nadir, endemik ve tehdit altındaki türlerin üreme döngülerindeki farklı evreler (tohum dağılımı, çimlenme v.b.) zerine detaylı bilgi, nadirlik fenomeninin kapsamlı biçimde anlaşılmasına katkı sağlayabilir ve türlerin koruma idaresi kararlarına yardım edebilir (Menges, 1986). Oysaki elde edilmesi zor olan nadir ve tehdit altındaki doğal populusyonların çimlenme gereksinimleri genellikle bilinmemektedir. *In vitro* teknikler kullanılarak kontrollu koşullarda gerçekleştirilen çimlendirme çalışmaları bu anlamda etkili bir araç olarak karşımıza çıkmaktadır.

Ex situ olarak elde edilmiş bireyleri kullanarak yabani populusyonların güçlendirilmesi çalışmalarında başlangıç materyali olarak tohum kullanılması ucuz ve etkili bir yoldur (Cerabolini et al., 2004). Ayrıca eğer bitkiler tohumdan oğaltılırsa lokal ekotiplerin genetik farklılığı arttırılabilmektedir (Fay and Muir, 1990; Fay, 1992). Ancak populusyonların *ex situ* güçlendirilmesi için başlangıç materyali olarak tohum kullanılmasında dikkat edilecek pek çok nokta, populusyonların güçlendirilmesi çalışmalarının olumlu sonuç vermesi açısından oldukça önem taşımaktadır. Tohumların lokalitelerinden doğal olarak dağılmadan önce toplanması, canlı tohum hayatının kısa olup, tohum kalitesinin ve çimlenme yüzdesinin bilinmemesi, tohumların meyveden ayıklanıp temizlenmesinin, tohum ekstraksiyonunun zor olması, dormansi gibi bir takım problemler başarıyı sınırlayan önemli faktörler arasındadır.

Populusyonların *ex situ* güçlendirilmesi çalışmaları kapsamında, Maunder (1992) mevcut teknikleri gözden geçirdiğinde *in vitro* tekniklerin öneminden söz eder. Birçok amaca yönelik çalışmaların yapılabildiği bitki doku kültürü; aseptik Şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (eşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal

meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir. Soyu tehdit altındaki türlerin korunması ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır (Babaoğlu et al., 2002). Ayrıca, bir bitki hakkında ayrıntılı bir takım bilgilerin çoğunu elde etmek için doku kültürü yöntemleri bir araç olarak kullanılabilir. Doku kültürü teknikleri kullanılarak bitkinin pek çok özelliği ile ilgili çalışmalar laboratuvar koşullarında kısa zamanda yapılabilir.

Doku kültüründe en uygun ekspant kaynağını, daha önceden steril edilmiş tohumlardan elde edilen steril fideler oluşturur. Bu şekilde elde edilen eksplantların sterilizasyona ihtiyacı olmamakta ve yüzey sterilizasyonu işleminin zararlı etkilerinden sakınılmaktadır. Tohumların sterilizasyonu tohum kabuğu varlığından dolayı kolayca sağlanabilmekte ve böylece *in vitro*'da yararlanabilecek çok sayıda steril bitki elde edilebilmektedir. Ayrıca uzun süreli *in vivo* çimlenme denemelerinde kontaminasyon çimlenme yüzdesini düşürmektedir. Oysaki *in vitro* koşullarda, uygun bir sterilizasyon prosedürü oluşturulmuş tohumların kullanıldığı çimlenme denemelerinde bu risk oldukça azalmaktadır.

Endemik ya da tehdit altındaki bitkilerin *ex situ* koruma programları için kullanılan *in vitro* teknikler içinde mikroçoğaltım çalışmaları son yıllarda yaygın bir kullanım alanı bulmuş ve çok sayıda botanik bahçesinde kullanılır hale gelmiştir (Fay, 1992).

Çok çeşitli yöntemlerin denenebildiği *in vitro* bitki çoğaltımının en basit tipi aksiller tomurcuk gelişiminin uyartılmasıdır. Bu çalışmalarda aksiller tomurcuklar dormansiyi kırmak ve sürgün dalları üretmek için öncelikle bitki büyüme düzenleyicileri ile muamele edilmektedir. Yeni sürgünler daha sonra birbirinden ayrılmakta ve bitki üretmek için köklendirilmektedir. Alternatif olarak, sürgünler daha ileri çoğaltım için propagül olarak kullanılmaktadır. Aksiller tomurcuk proliferasyonu tipik olarak aylık kültür pasajları başına sürgün sayısında 10 kat artışla sonuçlanır. 6 aylık bir sürede, tek bir bitkiden başlayarak 1.000.000 kadar propagül ya da bitki elde etmek olasıdır (Philips and Hubstenbenger, 1995).

Kültüre alınmış dokulardan bitki rejenerasyonu önceden oluşmuş meristemi bulunmayan (adventif kökenli) kültüre edilmiş doku kısımlarından veya kallus ve

hücre kültürlerinden (*de novo* kökenli) de gerçekleştirilebilmektedir. Aksiller tomurcuklar önceden oluşmuş meristemler olmalarına rağmen, adventif rejenerasyon meristemlerin doğal olarak oluşmadığı alışlagelmedik yerlerinde gerçekleşir (İnternodyum, yaprak ayası, kotiledon v.b.). Kallustan sürgün farklılaşması da adventif tomurcuk olarak ele alınmasına rağmen, adventif tomurcukların daha çok kallus evresine gerek kalmadan doğrudan bir organ ya da organ parçasından oluşabildiği düşünülmektedir.

Adventif veya *de novo* kökenli olsun ya da olmasın bitki rejenerasyonu iki süreçten biri ile oluşur. Organogenezis ve/veya somatik embriyogenezis. Birçok bitki türü organogenezis veya somatik embriyogenezis ile rejenerasyon yeteneğindedir. Bitki türünün seçimi ve araştırmanın hedefi bitki rejenerasyon ve çoğaltım süreçlerini belirlemektedir. Endemik bitkilerin korunması ve çoğaltılmasına ilişkin mikroçoğaltım çalışmalarında her iki rejenerasyon sürecinin de denenebildiği pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Hammatt and Evans, 1985; Iriondo and Perez 1990,1996; Erdağ and Emek, 2005). Ancak ülkemizde konu ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır ve bazı üniversitelerin sınırlı sayıdaki laboratuvarlarında uygulanmaktadır.

Bizim çalışmamızda endemik bir tür olan *Centaurea zeybekii* Wagenitz kullanılmıştır. Bu tür, Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı'nda EN-ENDANGERED-Tehlikede kategorisine alınmıştır. Bir takson oldukça yüksek risk altında ve yakın gelecekte yok olma tehlikesi altında ancak henüz CR (Critically Endangered= Çok tehlikede) grubunda değilse bu kategoriye konur. Habitat özelliğinin değişimi ve türün kaplama derecesinin azalması, aktüel ve potansiyel bir toplama tehtidi altında olması, başka bir taksonun istila tehtidi, melezleme, hastalık, tohum bağlamama, kirlenme, rekabetçiler ve parazitlerin etkisi altında olması vb. tehlikelerin yüksek riski altında, son 10 yıl içinde veya 3 nesilde popülasyonda %50 azalma olacağı düşünülmüyor; yayılış alanı 5000 km² veya tek bir alanda veya 500 km² ye kadar, birey sayısı 2500'ün altında veya en çok 5 lokalizasyonda biliniyorsa ENDANGERED kategorisinde yer alır (Ekim v.d. 2000).

Tür, ayrıca küresel ölçekte tehlike altında olan türlerdendir* ve türün yer aldığı Nif dağı çok fazla sayıda endemik tür bulundurmasına rağmen henüz koruma altında değildir.

Tüm bu nedenler dikkate alınarak bu çalışmada, *Centaurea zeybekii* Wagenitz'nin *in vitro* çimlenme gereksinimlerinin belirlenmesi ile, endemik bitkilerin doğal popülasyonlarının güçlendirilmesi çalışmalarına katkı sağlanması amaçlanmıştır. Ayrıca fide gelişimi için en uygun *in vitro* ortamın belirlenmesi ve mikroçoğaltım çalışmaları ile türün çoğaltılmasına ilişkin alternatif bir prosedürün oluşturulması da temel hedeflerimiz arasındadır.

* Doğal Hayatı Koruma Vakfı (<http://wwf.org.tr/tr/default.asp>)

2. Konu İle İlgili Önceki Çalışmalar

Yaptığımız literatür araştırması dahilinde *C. zeybekii*'nin *in vitro* çimlenmesi üzerine yayınlanmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle Asteraceae familyasına ait bitkilerle yapılan *in vivo* çimlenme denemeleri ve başka familyalara ait bitkilerin *in vitro* çimlenme denemeleri çalışmaların yönlendirilmesinde referans olarak alınmıştır.

Padilla ve Encina (2002), *Annona cherimola* tohumları için en uygun *in vitro* ortamın bulunması amacıyla bir çimlenme prosedürü geliştirmişlerdir. Tohumları 8.67 µM gibberellik asit içeren vitamin destekli distile su ortamında, 30°C'de ve karanlıkta %80 gibi büyük bir oranda çimlendirebilmişlerdir.

Khan ve Gulzar (2003), çok yıllık dört otsu bitkinin (*Aeluropus lagopoides*, *Halopyrum mucronatum*, *Sporobolus ioclados* ve *Urochondra setulosa*) çimlenmesinde ışık, tuzluluk ve sıcaklığın etkisine bakmışlar, maksimum çimlenme yüzdesinin 20:30°C'de, ışık varlığı farkı olmaksızın, distile su ortamında elde edildiğini ve tuzluluk oranındaki artışla çimlenme yüzdesi arasında ters bir orantının olduğunu bildirmişlerdir.

Brandel (2004), *Bidens cernua* ve *Bidens tripartita* (Asteraceae) bitkilerinin sıcaklıkla değişen dormansi regülasyonlarını araştırmış ve değişik sıcaklık aralıklarındaki stratifikasyon uygulamaları ile tohumlardaki primer dormansinin aşılabileceğini rapor etmiştir.

C. zeybekii'nin *in vitro* çoğaltılmasına ilişkin yayınlanmış herhangi bir literatür bilgisine de rastlanmamıştır. Bu nedenle *Centaurea* cinsine ait bazı türlerin mikroçoğaltım protokolleri dikkate alınmış ve referans olarak değerlendirilmiştir.

Cuenca, Marco ve Parra (1998), mikroçoğaltım için *Centaurea paui*'nin infloresens gövdelerini eksplant olarak kullanmış, en fazla sürgün oluşumunun 0.5 mg/L BA ya da 2 mg/L KIN içeren MS ortamında olduğunu, bunun yanı sıra en uzun sürgün boyunun bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamında olduğunu belirtmişlerdir. En uygun köklenmenin 2 mg/L IAA ve 2 mg/L IBA destekli MS

ortamında olduğunu kaydetmişler ve köklenen sürgünlerin %40'ını başarılı bir şekilde saksılara aktarmışlardır.

Cuenca ve Marco (2000), tehdit altında olan endemik bitki *Centaurea spachii*'nin, floral gövdelerinden alınan nodal eksplantlarını kullanarak yaptıkları adventif sürgün çoğaltım çalışmalarında 1mg/L BA içeren MS besin ortamında yüksek oranda sürgün oluşumu kaydetmişlerdir. Çalışmada elde edilen sürgünlerin boylarının kısa olduğunu ve artan sürgün sayısı ile sürgün boyu arasında negatif bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Köklendirme denemelerinde tek çeşit oksin kullanımı ile köklenme oranının düşük olduğunu; iki çeşit oksin kombinasyonunun kullanımında ise en iyi sonuçların 2 mg/L IAA ve 2 mg/L IBA içeren MS besin ortamında olduğunu ve bu kombinasyon ile altı hafta sonunda sürgünlerin %60'ı köklendirilebileceğini ve köklendikten sonra seraya aktarılan bitkilerin %80'nin canlılığını koruduğu rapor etmişlerdir.

Takashi ve Daisuke (1997), *Centaurea macrocephala* bitkisinin koltuk altı meristemlerini kullanarak mikroçoğaltım çalışmaları yapmışlar ve elde ettikleri sürgünlerin %70'ini 25 µM IBA içeren hypnex ortamında köklendirmişlerdir.

Hammatt ve Evans (1985)'in, tehdit altındaki endemik bitki *Centaurea junaniana*'nın yaprak, kök, hipokotil ve kotiledonlarını eksplant olarak kullandıkları ve sürgün rejenerasyonunu araştırdıkları denemelerde, en yüksek sürgün sayısının 5 mg/L BA ve 0.2 mg/L NAA içeren MS ortamında, en iyi köklenme yüzdesinin ise 0.01 mg/L IBA içeren MS ortamında olduğunu belirtmişlerdir.

Pevalek ve Kozlina (1998), tehdit altındaki endemik bitki *Centaurea ragusina* için klonal çoğaltım metodu geliştirmişlerdir. Bunun için tohumdan başlanarak elde edilen 20 günlük fidelerin sürgünlerini aksiller sürgün çoğaltımı için başlangıç materyali olarak kullanmışlardır. En iyi sürgün gelişimini 1.0 µM BA ve 2.9 µM GA₃ ilaveli ½ MS ortamında olduğunu bildirmişlerdir. Elde edilen sürgünler 2.5 µM IBA içeren ½ MS ortamında köklendirildikten sonra başarılı bir şekilde saksılara aktarılmışlardır.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Bu çalışmada endemik bir bitki olan *Centaurea zeybekii* Wagenitz türü kullanılmıştır (Şekil 1-2).

Centaurea zeybekii Wagenitz'nin sistematikteki yeri ve özellikleri:

Classis : Magnoliopsida

Subclassis : Asteridae

Ordo : Asterales

Familia : Asteraceae

Section : Acrolophus (Cass.)

Centaurea zeybekii Wagenitz

C. zeybekii Wagenitz in Notes R.B.G. Edinb. 33:218 (1974)

Kısa ömürlü çok yıllıklar. Gövde dik 50-60 cm ve üst yarısında genellikle çok sayıda basit dallı. Yapraklar skabroz, neredeyse araknoid; bazal ve alt yapraklar pinnatisekten, düz veya dişli sublirat'a kadar değişir. Segmentler düz veya dentattan pinnatilobat lanseolata veya linear lanseolata kadar değişir, orta kısımdakiler taban yapraklarına benzer fakat daha küçük ve daha az parçalanmış üst kısımdakiler linear lanseolat. İnvolutrum 12-14 x 6-8 mm, ovoid, sonra boru şekilli. Appendageler orta büyüklükte, fillarilerin sadece tabanını örter, üç köşeli linguiform mor renkli, uç kısımda eşit boyda birkaç dişli (0-3mm). Çiçekler mor dıştakiler neredeyse radiant. Akenler 3-3.5 mm, pappus 2-3 mm. Çiçeklenme zamanı 6.ay. *Pinus brutia* orman açıklığı, yaklaşık 600 m.

Type: Turkey **B1** İzmir: Ostseite des Nif Da.oberhalb des Fahrweges zwischen Kurudere and Ovacık köyü, 600 m, lichter, steiniger Kiefernwald am Hang, 28 vi 1973, F.Holtz 410, P. Hünel, T. Kesercioğlu (holo. GOET!iso.EGE!Hb.F.Holtz!).

Doğu Akdeniz elementi. Sadece tip lokalitesinden biliniyor. *C. cuneifolia* ile ilişkili olup ondan geniş, azca dişli appendageleri ile ayrılır (Davis, 1975).



Şekil 1. *C. zeybekii* Wagenitz'nin doğal ortamında çekilmiş bir fotoğrafı



Şekil 2. *C. zeybekii* Wagenitz'nin çiçek görüntüsü

3.2. Metot

C. zeybekii Wagenitz'ye ait kapitulumlar İzmir-Kemalpaşa yöresine yakın Nif dağının 575 m yüksekliğinde, N 38 25 20, 01; E 027 23,463 lokalitesinden (Şekil 3) 2004 yılının Temmuz ve Ağustos ayları ile 2005 yılının Ağustos ayında toplanmıştır. Toplanan kapitulumlar (Şekil 4) laboratuvar koşullarında kilitli poşetlerde muhafaza edilmiştir. Kapitulumlardan çıkarılan akenler (Şekil 5) denemelerde başlangıç materyali olarak kullanılmıştır.



Şekil.3. *C. zeybekii* Wagenitz'nin habitatının genel bir görüntüsü



Şekil 4. *C. zeybekii* Wagenitz'nin kapitulumunun görüntüsü (bar=0.5 cm)



Şekil 5. Kapitulumdan çıkarılmış akenler (bar=0.3 cm)

Aken; tek lokuluslu ovaryumdan oluşan, içinde tek tohum bulunduran ve olgunlaştığında açılarak tohumun çıkmasına olanak verecek özel bağlantı yerleri bulunmayan, Asteraceae familyasının tipik meyvesidir. Tohum meyve çeperine bir noktadan bağlıdır ve herhangi bir müdahale olmadığı sürece meyveden ayrılmaz. Bu nedenle tezin bundan sonraki bazı kısımlarında aken yerine tohum terimi kullanılacaktır.

Bu çalışma iki aşamada planlanmıştır. Birinci aşamada, gibberellik asit (GA₃) ilaveli farklı *in vitro* ortamların, ışığın ve sıcaklığın çimlenme üzerine etkisini araştırmak amacı ile çeşitli denemeler kurularak, *Centaurea zeybekii* Wagenitz tohumlarının optimum *in vitro* çimlenme koşullarının belirlenmesine ve çimlenen fideliklerin dış ortamlara aktararak populasyonun *ex situ* elde edilmiş bireyler kullanılarak güçlendirilmesine çalışılmıştır. İkinci aşamada ise, *in vitro* koşullarda çimlenen tohumlardan steril fide gelişimi için uygun ortamların belirlenmesinin yanı sıra, bu fidelerin çeşitli kısımlarının eksplant olarak kullanılması ile aksiller ve adventif sürgün çoğaltımının teşvik edilmesi ve sonuçta çok sayıda bitki eldesi ile türün çoğaltılmasına ilişkin alternatif bir metot geliştirilmesi hedeflenmiştir.

3.2.1. *In vitro* çimlenme denemeleri için yapılan ön hazırlıklar

3.2.1.1. Tohum canlılık testi

Tohumun çimlenebilme yeteneğinde olması için öncelikle canlı olması gerekmektedir. Bu nedenle tohumların canlılıklarını belirlemek amacıyla Tetrazolium testi (Aggrawal et al., 1973) uygulanmıştır. Bu testte canlılık tohumların 2,3,5 trifenil tetrazolium klorür (TTC) çözeltisi ile muameleleri sonucu kırmızı renk alıp almamaları ile belirlenmektedir ve araştırmacılar genellikle % 0.1- 1.0'lik konsantrasyonlarının yaygın olarak kullanıldığını bildirmişlerdir. Bu amaç doğrultusunda 0.1 g TTC (SİGMA) tartılarak bir balon jojeye konulmuş ve üzeri distile su ile 100 ml'ye tamamlanmış ve böylece % 0.1 lik TTC çözeltisi hazırlanmıştır. Tohumların bir kısmı jilet yardımıyla steromikroskop altında ikiye bölünmüş ve bir yarısı uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan yarısı bir petriye alınmıştır. Hazırlanan %0.1'lik tetrazolium solüsyonu petrilerdeki tohumların üstünü örtecek şekilde dökülmüş ve en az yarım saat süre ile beklemeye bırakılmıştır. Bu sürenin

sonunda canlı tohum sayısı yüzde olarak belirlenmiştir. Tohumların bir kısmı karanlıkta oda sıcaklığında (yaklaşık 20 °C ve % 50-60 nemde) saklanmış ve iki yıl süresince 6 aylık periyotlarla TTC testi uygulanarak canlılıkları belirlenmiştir.

3.2.1.2. Tohumların çimlendirileceği kavanozların hazırlanması

Çalışmalarımızda tohumları kültüre almak için 210 cc'lik geniş ağızlı cam kavanozlar kullanılmıştır. Boş kavanozlar ağızları kapalı bir şekilde 105 kPa basınç altında 121°C'de 20 dakika boyunca otoklavda steril edildikten sonra, laminar hava akımlı steril çalışma kabini içerisine alınmıştır. Kavanozların içerisine yerleştirilecek olan filtre kağıtları, 12x12 cm ebatlarında kesilmiş ve alüminyum folyoya sarılarak pastör fırınında 170°C'de 1 saat kalmak suretiyle steril edilmiştir. Steril edilen filtre kağıtları üzerlerindeki alüminyum folyoya %70'lik alkol sıkılarak kabin içine alınmışlardır. Filtre kağıtları kabin içerisinde steril eldiven kullanılarak katlandıktan sonra üzerlerinde tohumları taşıyabilmeleri için fiziksel destek sağlayacak köprüler oluşturacak şekilde kavanozlara yerleştirilmişlerdir (Şekil 6). Daha sonra kavanozların ağızları kapatılarak yeniden otoklavda 105 kPa basınç altında 121°C'de 20 dakika boyunca sterilize edilmişlerdir.



Şekil 6. Tohumlara destek sağlaması amacıyla hazırlanmış kağıt köprü

3.2.1.3. Çimlenme denemelerinde kullanılan besi ortamlarının hazırlanması ve sterilizasyonu

Çimlenme denemelerimizde tohumları kültüre etmek için GA₃ içeren ve içermeyen MS (Murashige and Skoog, 1962), B₅ (Gamborg et al., 1968), White (White, 1963) sıvı ortamları ve vitamin destekli distile su ortamları (Çizelge 1) kullanılmıştır. Bu ortamlar aşağıda verildiği şekilde hazırlanmıştır.

Makro besin elementleri, miktar olarak fazla olması ve hassas terazide tartım yaparken hata yapma payının çok az olmasından dolayı, besi ortamı hazırlanırken her defasında ayrı ayrı tartularak 1000 ml'lik erlen içerisinde bir miktar distile su ile çözündürülmüşlerdir.

Mikro besin elementleri, vitaminler ve aminoasitler için önceden stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Stoklar çoğunlukla 5 ml içerisinde, 1 litrelik ortamda bulunması gereken miktar olacak şekilde, 100 ml'lik çözeltiler halinde balon jöjelerde hazırlanmıştır. Daha sonra koyu renkli şişelere aktarılarak +4 °C'de karanlıkta muhafaza edilmiş ve gerektiğinde kullanılacak olan miktarlar pipet yardımıyla alınarak ortamlara ilave edilmiştir.

Ortamlara ilave edilen gibberellik asit (GA₃) için de stok solüsyonlar hazırlanmıştır. 5 ml'sinde 1 mg/L madde olacak şekilde çoğunlukla 25-30 ml'lik stoklar halinde hazırlanan çözeltilerin pH'ı 5.0'a (Smith, 1992; Franklin and Dixon, 1994; Gamborg and Philips, 1995; George, 1993) ayarlanmış ve daha sonra koyu renkli şişelere aktarılarak +4 °C'de karanlıkta muhafaza edilmiştir.

In vitro ortamlar için gerekli bileşenler ve sukroz (MERCK) Çizelge 1'de gösterildiği miktarlarda ilave edildikten sonra solüsyonun hacmi distile su ile son hacime yakın olacak şekilde tamamlanmıştır. En son olarak ortamların pH'ları MS ve distile su için 5.8'e, White ve B₅ için 5.5'e ayarlanmış ve sterilizasyon sonrası ilave edilecek GA₃ miktarı dikkate alınarak final hacimleri tamamlanmıştır. Ortamlar ağızları alüminyum folyo ile kapatılıp paket lastiği ile tutturulduktan sonra otoklavda 105 kPa basınç altında 121°C'de 15 dakika sterilize edilmişlerdir. Sterilize edilen kavanozlar, ortamlar ve önceden stoğu hazırlanan GA₃ çözeltisi kabin içerisine alınmışlardır.

Çizelge 1. Çimlenme denemelerinde kullanılan ortamların temel elementleri ve miktarları

Makro Elementler	MS	B₅	White	DS
	mg/L			
NH ₄ NO ₃	1650	-	-	-
KNO ₃	1900	2500	80	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134	-	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	150	-	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	300	-
KCl	-	-	65	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	250	-	-
Na ₂ SO ₄	-	-	200	-
NaH ₂ PO ₄	-	-	16.5	-
MnSO ₄ .H ₂ O	-	10	-	-
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	-	7	-
KH ₂ PO ₄	170	-	68	-
Mikro Elementler				
KI	0.83	0.75	0.75	-
H ₃ BO ₃	6.2	3.0	1.5	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	2.0	3.0	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	-	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	-	-
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	-	-
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	-	2.5	-
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	-	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8	-	-
Vitaminler ve Organikler				
Myo-inositol	100	-	100	100
Nikotinic asit	0.5	1.0	-	0.5
Pridoksin-HCl	0.5	1.0	-	0.5
Thiamin-HCl	0.1	10.0	-	10
Glisin	2	-	-	20
Diğer Elementler				
Sakkaroz	30 gr	20	20	30
Agar	-	-	-	-
pH	5.8	5.5	5.5	5.8

Laminar hava akımlı steril kabin içerisine alınan GA_3 cozeltisi steril enjektör yardımıyla cekildikten sonra, enjektörün ucuna $0.22 \mu m$ 'lik filtre takılarak cozelti steril bir erlene szlmstr. Bu Şekilde steril edilen stok GA_3 , daha önceden steril edilmiş ortamlara hesaplanan miktarlarda (1, 2, 3 mg /L) eklenerek toplam 16 farklı ortam hazırlanmıştır. Hazırlanan bu sıvı ortamlar filtre kağıdının seviyesini aŐmayacak Şekilde kavanozlara dökülmüŐtür. Kavanozların ağızları ateŐten geçirildikten sonra sıkıca kapatılarak tohumların ekilmesi için hazır hale getirilmiŐlerdir (Şekil 7).



Şekil 7. Tohum ekimi için hazır hale getirilmiŐ bir kavanoz

3.2.1.4. Alet ve ekipmanların sterilizasyonu

Bütün *in vitro* calıŐmaların içerisinde gerçekleŐtiĐi laminar hava akımlı steril calıŐma kabininin içi ve dışı calıŐmaya baŐlamadan önce olası kontaminasyonu engellemek için %70'lik etil alkol (EtOH) ile silinmiŐ ve ardından bir saat UV ıŐıĐına maruz bırakılmıştır.

Tohum sterilizasyonu ve ekimi sırasında kullanılacak olan ince delikli tel süzgeç, mikropipet uçları, cam petriler, pens, makas, erlen, boş cam malzemeler ve beher gibi tüm aletler alüminyum folyo ile sarılarak veya ağızları kapatılarak 105 kPa basınç altında $121^\circ C$ de 20 dakika boyunca otoklavda sterilize edilmiŐler ve otoklavlama sonrası hızlı bir Şekilde kabin içerisine alınmışlardır.

3.2.1.5. Tohumların hazırlanması ve sterilizasyonu

İçerisinde tohumları taşıyan akenler kapitulumlardan çıkarıldıktan sonra bir takım morfolojik kriterler göz önüne alınarak seçilmiştir. Çimlenme denemeleri için kabukları sağlam, koyu renkli, dolgun, aynı morfolojik özelliğe ve büyüklüğe sahip olgun akenler kullanılmıştır.

Akenler yarım saat akan çeşme suyu altında yıkandıktan sonra küçük bir beher içinde steril kabin içerisine alınıp 10 dakika boyunca % 70'lik etil alkol ile muamele edilmiştir. Bu işlemin ardından % 4.5 lik NaOCI'de 15 dakika boyunca tutulup, daha sonra 3 kez steril distile su ile yıkanmıştır. Yıkama sırasında aken kaybını engellemek için daha önceden otoklavda steril edilen ince delikli tel süzgeç kullanılmıştır.

3.2.2. *In vitro* çimlenme denemeleri

Bu denemelerde *C. zeybekii* tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine GA₃ ilaveli farklı *in vitro* ortamların, ışığın ve sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Çimlenme kriteri olarak radikula çıkışı esas alınmıştır. Her yeni deneme bir önceki denemenin en iyi sonuçları baz alınarak kurulmuştur. Sonuçlar her deneme için 6 hafta sonunda değerlendirilmiştir.

3.2.2.1. *In vitro* ortamların etkisi

Steril edilen tohumlar farklı konsantrasyonlarda (0, 1, 2 ve 3 mg/L) gibberellik asit içeren çimlendirme ortamlarına (sıvı MS, White, B₅, vitamin destekli distile su) kültüre edilmişlerdir. Denemeler her kavanoza 10'ar tohum olacak şekilde 2 tekrarlı olarak yapılmıştır (Şekil 8). Kültürler 24±2 °C'de 16/8 saat fotoperiyotta tutulmuştur.

3.2.2.2. Işığın etkisi

Çimlenme üzerine ışığın etkisini araştırmak için ilk denemenin sonuçlarına göre 1 mg/L GA₃ ilaveli vitamin destekli distile su ortamı hazırlanmıştır. Bu ortamlara aktarılan tohumları içeren kavanozların bir kısmı 24±2 °C'de karanlıkta tutulurken

(Şekil 9), bir kısmı ise 16/8 saat fotoperiyota maruz bırakılmışlardır. Denemeler her kavanoza 10'ar tohum gelecek şekilde iki tekrarlı olarak yapılmıştır.



Şekil 8. *In vitro* ortamlara kültüre edilmiş tohumlar



Şekil 9. Karanlık ortamı sağlamak amacıyla alüminyum folyoya sarılmış olan kavanozlar

3.2.2.3. Sıcaklığın etkisi

Üçüncü denemede tohum çimlenmesi üzerine sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Bu denemede de 1 mg/L GA₃ ilaveli distile su ortamı temel ortam olarak kullanılmıştır. Sterilize edilen tohumlar ortamlara aktarıldıktan sonra kavanozlar 15, 20, 25, 30 ve 35 °C'lik sıcaklıklarda çimlenmeye bırakılmışlardır. Her sıcaklık denemesi için 10'ar tohum kullanılmıştır ve denemeler 2 tekrarlıdır.

3.2.2.4. Çimlenmiş tohumların saksılara alınması

In vitro şartlarda çimlendirilmiş tohumların bir kısmı bahçe toprağı içeren saksılara alınmış ve her gün sulamak koşuluyla 8 ay boyunca gelişimleri gözlenmiştir.

3.2.3. Mikroçoğaltım denemeleri

3.2.3.1. Steril fide gelişimi için en uygun *in vitro* ortam belirleme denemeleri

In vitro çimlenmiş tohumların bir kısmı gelişimlerinin gözlenmesi ve *in vitro* çoğaltım çalışmalarında eksplant kaynağı olarak kullanılmak üzere sağlıklı ve steril bitki eldesi için çeşitli *in vitro* besi ortamlarına alınmışlardır.

Besi ortamlarının hazırlanması

In vitro bitkicik gelişimi için Çizelge 1'de verilen ortam bileşenleri (MS, White, B₅) daha önce sözü edildiği şekilde hazırlanmış ve fidelere destek sağlamak amacı ile bu ortamları katılaştırmak için 8 g/L agar-agar (MERK) kullanılmıştır. Hazırlanan ortamların pH'ları 0.1N NaOH ve 0.1N HCl çözeltileri ile MS ve vitamin destekli distile su ortamları için 5.8'e, White ve B₅ ortamları için 5.5'e (Barnes, 1979; Fomesbech and Fomesbech, 1980) ayarlandıktan sonra distile su ile son hacimleri tamamlanmıştır. Su banyosunda 1 saat homojenize edilen ortamlar kavanozlara paylaştırılıp ağızları kapatılarak 121°C'de 15 dakika 105 kPa basınç altında sterilize

edilmiştir. Sterilize edilen kavanozlar uygun bir yerde soğumaya bırakılmış ve karanlıkta muhafaza edilmiştir.

Çimlenen tohumların *in vitro* ortamlara aktarılması

Bu denemelerde çimlenen tohumlar steril kabin içerisinde MS, B₅ ve White ortamlarına alınmışlar ve 24 ± 2 °C'de 16/8 saat fotoperiyot koşullarının sağlandığı iklim odasında tutulmuşlardır. Denemeler her erlene bir fidelik gelecek şekilde 10 tekrarludur ve her deneme 3 kez tekrar edilmiştir. Yaklaşık 8 hafta sonra (dört haftada bir alt kültür edilmiştir) fideliklerin gelişimleri (sürgün boyu, sürgün sayısı, yaprak sayısı, yaprak genişliği, kök boyu ve kök sayısı) incelenerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.2.3.2. Aksiller sürgün çoğaltım denemeleri

Aksiller sürgün çoğaltım denemelerinde bitki gelişimi için en uygun ortam olarak belirlenen MS ortamında gelişen yaklaşık 4 haftalık steril fideler, primer köklerinden ayrılarak farklı sitokin tip ve konsantrasyonlarını (0.2, 0.5, 1 ve 2 mg/L BA, 0.2, 0.5, 1 ve 2 mg/L KIN ve 0.001, 0.005, 0.01 ve 0.02 mg/L TDZ) içeren MS temel besi ortamlarına aktarılmışlar ve 24±2 °C'de 16/8 saat fotoperiyot koşullarının sağlandığı kültür odasına alınmışlardır. 4 haftalık süre sonunda artan sürgün sayıları belirlenerek aksiller sürgün çoğaltım için en uygun sitokin tip ve konsantrasyonu, sürgün sayısı ve sürgün boyu açısından değerlendirilmiştir.

3.2.3.3. Direkt adventif sürgün oluşturma denemeleri

Bu denemede *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş steril fidelerin yaprakları eksplant olarak kullanılmış ve bu eksplantlardan direk adventif sürgün rejenerasyonu teşvik edilmeye çalışılmıştır. İki aylık steril fidelerin yaprakları aksiller tomurcukları olmaksızın abaksial yüzleri ortamla temas edecek şekilde farklı büyüme düzenleyicileri ilave edilmiş MS ortamlarında kültüre edilmişlerdir. Sürgün rejenerasyon ortamları olarak BA (0.2, 0.5, 1 ve 2 mg/L), KIN (0.2, 0.5, 1 ve 2 mg/L) ve TDZ (0.001, 0.005, 0.01 ve 0.02 mg/L) serileri kullanılmıştır. Denemeler

her uygulama için her erlene 4 eksplant gelecek şekilde 5 tekrarlı olarak yapılmıştır ve tüm denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

3.2.3.4. Köklendirme ve dış ortama alıştırma denemeleri

Denemeler sonucu elde edilen aksiller ve adventif sürgünler köklenmeleri için 0.5, 1, 2 ve 5 mg/L IAA, IBA, NAA içeren MS ve ½ MS ortamlarına alınmıştır. Köklenen sürgünler kademeli bir şekilde dış ortamlara aktarılarak aklimatize edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Yabani Populasyonun *In vitro* Koşullarda Çimlendirilen Tohumlar Aracılığı İle Güçlendirilmesi

4.1.1. Tohum üretimi ve aken yapısı ile ilgili morfolojik gözlemler

Arazide yapılan gözlemler sırasında çiçeklenmenin geç döneminde *C. zeybekii* kapitulumları incelendiğinde, boş kapitulumlara rastlanmamış bunun yanı sıra akenler kapitulumlardan çıkarılırken herhangi bir böcek ya da böcek yumurtası gözlenmemiştir. Bu durum çiçek sterilitesinin olmadığı ve tohumların kapitulum içinde iken herhangi bir predatör tarafından etkilenmediğinin bir göstergesi olabilir. Ancak tohumların kapitulumlardan dökülmesi sırasında bir etkiye maruz kalıp kalmadığının anlaşılması için ayrıntılı gözlemlerin yapılmasına ihtiyaç vardır.

Laboratuvar koşullarında kilitli poşetlerde muhafaza edilen kapitulumlarda ortalama tohum üretimi kapitulum başına 5-25 aken olarak gözlenmiştir. Akenler monomorfiktir ve hepsi pappus bulundurmaktadır. Monomorfik ve pappuslu aken üretimi *C. solstitialis* dışındaki pek çok *Centaurea* türü için yaygın bir durumdur (Callihan et al.1993).

Temmuz ayında toplanan kapitulumlarda bulunan dış kısımdaki akenlerin koyu renkli, iç kısımdaki akenlerin ise daha açık renkli oldukları gözlenmiştir. Bu gözlem aken gelişiminin sentripetal olduğunu düşündürmektedir. Benzer durum Maddox ve arkadaşları (1996) tarafından dimorfik akene sahip olan *C. solstitialis* için de belirtilmiştir.

4.1.2. Tohum canlılık testi

Hartman ve Kestler (1983), tohumların çimlenebilmeleri için canlı olmaları gerektiğini ve bu canlılığının belirlenmesi için değişik testler uygulanabileceğini

belirtmişlerdir. Bunlardan biri olan tetrazolium testi, tohumdaki respirasyon enzimlerinin aktivitesine bağılı olarak, canlı tohumları cansız tohumlardan ayıran biyokimyasal bir testtir. Testin uygulanması sırasında tohumların su almasıyla dehidrogenaz enziminin aktivitesi artar, bu da hidrojen iyonlarının salınımına yol açar. Salınan hidrojen iyonları renksiz tetrazolium tuz çözeltisini, formazan adı verilen kimyasal bileşiğe indirger. Formazan solunum yapan canlı hücreleri kırmızı renge boyar, cansız hücreler ise renk almaz. Tohumların canlılığı tohumdaki dokuların boyanmasına göre karar verilir.

Temmuz ve Ağustos aylarında toplanan tohumlara uygulanan tetrazolium testinin sonuçlarına göre, Temmuz ayında toplanan kapitulumlardan çıkarılan akenler içindeki tohumların çok az bir kısmı boyanmış (%30) ve bu boyanmanın da çok açık renkte olduğu gözlenmiş (Şekil 10) hiç boyanmayan tohum yüzdesinin ise oldukça fazla olduğu görülmüştür (Şekil 11). Ağustos ayında toplanan kapitulumlardan çıkarılan akenler içindeki tohumların ise % 98'i boyanmış ve çok net olarak kırmızı renk aldıkları görülmüştür (Şekil 12). TTC testi sonuçlarına göre Ağustos ayında toplanan tohumların %98'nin canlı oldukları söylenebilir.



Şekil 10. Tetrazolium testine göre boyanmış bir temmuz tohumu



Şekil 11. Tetrazolium testine göre boyanmamış bir temmuz tohumu



Şekil 12. Tetrazolium testine göre boyanmış bir Ağustos tohumu

Tohum canlılığı, tohumların çimlenme kapasitesinde olmasının ve uygun çimlenme koşulları altında normal bir bitkiyi oluşturabilecek olmasının bir belirtisidir. Zigotik embriyolarda, tohumun içindeki şartlar normal gelişmeyi teşvik eder ve çimlenmeyi engeller (Kermode, 1990). Tohumların olgunlaşma evresi üç dönemden oluşmaktadır. Olgunlaşma evresi lipidlerin depo edilmesi, protein birikimi ve -genel bir fenomen olmamasına rağmen- kuruma toleransının kazanılması ile karakterize edilmektedir (Bewley and Black, 1994). Tohumun kuruma sürecine ulaşması zigotik embriyo gelişim programının kesilmesi ve çimlenme sürecine başlamasını göstermektedir (Kermode, 1990). Bizim bulgularımıza göre tohumların toplandığı Temmuz ve Ağustos aylarında kapitulumlarda morfolojik açıdan hiçbir fark olmamasına rağmen tohumların tetrazolium testine farklı yanıt vermeleri, Temmuz ayında tohum toplamanın bitkinin reproduktif gelişim evresinde bir kesinti meydana getirdiğinin bir göstergesidir. Olasılıkla Temmuz ayında toplanılan tohumların büyük çoğunluğu bu ayda henüz gelişimlerini tam olarak tamamlayamamış ve ana bitki ile bağlantıları kesildiği için bir süre sonra ölmüşlerdir. Bu nedenle tetrazolium testinde cansız tohumlar çok yüksek oranda görülmüştür. Bu sonuç bize, tohumların bu dönemde cansız olduklarını değil, yanlış zamanda toplanmaları nedeni ile zigotik embriyo gelişiminin kesintiye uğraması sonucu sonradan öldüklerini düşündürmektedir. Temmuz ayında toplanılan tohumların %30'nun TTC testine pozitif cevap vermeleri kapitula içindeki ovullerin olgunlaşmasının zamana bağlı olarak varyasyon gösterdiğinin bir kanıtı olabilir. Olasılıkla olgun tohumlar boyanmış, ancak ana bitkiden yanlış zamanda ayrılmanın nedeni ile gelişimini tamamlayamayıp ölenler doğal olarak TTC testine yanıt vermemişlerdir.

Bulgularımıza dayanarak *C. zeybekii* Wagenitz türünün tohumları ile yapılacak herhangi bir çalışmada kullanılmak üzere, tohum toplama işinin Ağustos ayı içinde gerçekleştirilmesi gerektiğini söyleyebiliriz. Ancak, bitkinin yaşam döngüsünün çevresel faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterdiği de akılda tutulması gereken bir gerçektir.

2 yıllık süre içinde 6 aylık periyotlarla tekrar edilen TTC testi sonuçları arasında pek bir fark bulunmamıştır (Çizelge 2). Tohumların toplandığı ilk ayda uygulanan testte canlılık %98, 6. ayda %98, 12. ayda %98, 18. ayda %96, 24. ayda %94 oranlarında bulunmuştur. Bitki genetik kaynaklarının *ex situ* korunması için tohum saklama etkili ve verimli bir yoldur. Geleneksel tohum bankalarında tohum canlılığı -20 °C de % 5 nem içeriğinde 10 yıl için korunabilmektedir. Aktif koleksiyonlar için 5 yılda, temel koleksiyonlar için ise 10 yılda bir canlılık kontrolü yapılmaktadır. *C. zeybeki* tohumlarının 2 yıl süre ile saklandığı, oda sıcaklığı koşullarında (ortalama 20 °C ve %50-60 nem) ve 2 yıl sonunda TTC testine yüksek oranda pozitif cevap verdikleri dikkate alındığında, türün tohumlarının canlı kalma süresinin göreceli olarak yüksek olduğunu ve tohum bankalarında saklamak için kolay bir materyal olduğunu söylemek mümkündür. Ancak konu ile ilgili ayrıntılı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Çizelge 2. Toplama tarihinden itibaren altı ay aralıklarla tohumlara uygulanan TTC testi sonuçları

Aylar	% canlılık
0	%98
6	%98
12	%98
18	%96
24	%94

4.1.3. *In vitro* çimlenme

Tetrazolium testi sonuçları ve morfolojik gözlemler dikkate alınarak, *in vitro* çimlenme denemelerinde Ağustos ayında toplanan tohumlar kullanılmıştır.

In vitro çimlenme denemelerinde kullanılmak üzere kapitulumlardan çıkarılan tohumlara uygulanan sterilizasyon prosedürü oldukça başarılı bir sonuç vermiş ve %98 oranında steril kültürler elde edilmiştir.

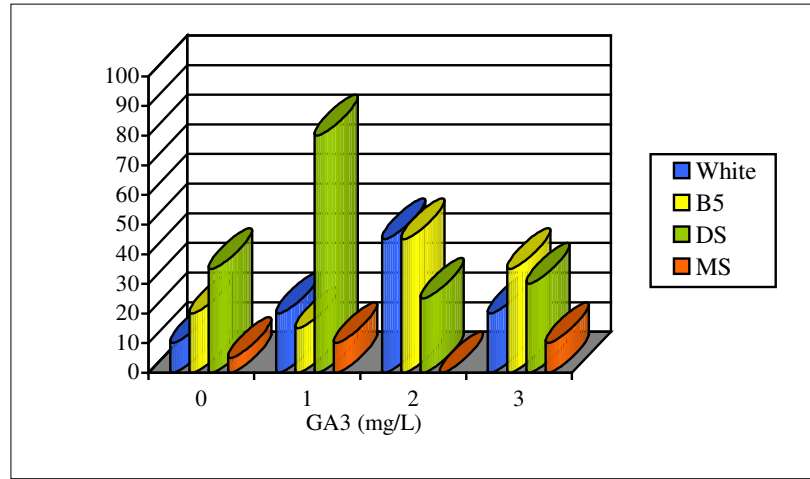
Çimlenme kriteri olarak radikula çıkışı esas alınmıştır. Her yeni deneme bir önceki denemenin en iyi sonuçları baz alınarak kurulmuştur. Sonuçlar her deneme için 6 hafta sonunda değerlendirilmiştir.

İlk çimlenme denemesinde, GA₃ destekli ve desteksiz değişik *in vitro* ortamlar kullanılmış, *C. zeybekii* türünün *in vitro* çimlenmesi için en uygun ortam araştırılmıştır. Denemelerimizin sonuçlarına göre, en yüksek çimlenme yüzdesinin vitamin destekli distile suya 1 mg/L GA₃ ilavesi ile hazırlanmış ortamda olduğu görülürken (% 80), bunu sırasıyla 2 mg/L GA₃ ilaveli White (%45) ve B₅ (%45) ortamları izlemiştir (Şekil 13). MS ortamında ise en düşük çimlenme yüzdesi (%10) elde edilmiştir. Denemelerimizde kullandığımız *in vitro* ortamların tuz içerikleri birbirinden farklıdır. Vitamin destekli DS ortamının diğer ortamlardan farkı ise hiç tuz içermemesidir. Araştırma bulgularımız çimlenme yüzdesinin ortamların içerdiği tuzlulukla ilişkili olduğunu göstermiştir. Ortamların tuz içeriği arttıkça *C. zeybekii* tohumlarının çimlenme yüzdelerinde bir azalma olmuş, yani çimlenme yüzdesi tuzluluk oranındaki artışla negatif bir ilişki göstermiştir. Yüksek tuz içeren ortamlarda çimlenme yüzdesinin az olmasının veya hiç olmamasının nedeni tuz oranındaki artışın negatif ozmotik potansiyele neden olmasındandır (Kauffman, 1969). Ayrıca tuz ve su stresi, su alınımını (Dodd and Donovan, 1999) ve depo besinlerin mobilizasyonu engellediği (Bouaziz and Hicks, 1990; Lin and Kao, 1995; Prakash and Prathapasanan, 1988) ya da çimlenen embriyolarda protein sentezini (Ramagopal, 1990) ve yapısal organizasyonu direk etkilediği için çimlenmeyi azaltmaktadır.

Genel olarak non-dormant tohumlar düşük tuz içeren *in vitro* ortamlarda çimlenebilmektedirler (Padilla and Encina 2002). Ancak White ve B₅ ortamlarında elde edilen çimlenme yüzdesinin vitamin destekli distile su içeren ortamdan düşük olması *C. zeybekii* tohumlarının çimlenmesi için mineral madde gereksiniminin olmadığını açıkça göstermektedir.

GA₃ ilavesi olmayan ortamlarda çimlenmenin daha düşük görülmesi dormansiyi düşündürebilir. Ancak sunulan değerler 6 haftalık gözlem sonuçlarıdır. Denemelerin ilerleyen sürelerinde düşük görülen yüzdelerin artması ve daha önceden yaptığımız *in vivo* çimlenme denemeleri bize tohumların dormant olmadığını göstermiştir. Ortamlara gibberellik asit ilavesi olasılıkla çimlenmeyi hızlandırıcı bir etki yaratmıştır. Gibberellinlerin çeşitli tohum türlerinde dormansiyi kırıcı, dormant olmayan tohumlarda ise çimlenmeyi hızlandırıcı etkiye sahip olduğu Khan (1977) tarafından da rapor edilmiştir.

Denemelerde kullanılan ortamların GA₃ içermeyen kontrolleri ile farklı konsantrasyonları karşılaştırıldıklarında, uygulanan GA₃'in konsantrasyona bağlı olarak çimlenme yüzdesini ortamdan ortama değişecek şekilde etkilediği görülmektedir. Bu durum olasılıkla ortam içerikleri ile tohumun içsel koşullarından kaynaklı GA₃ etki mekanizması arasındaki bir ilişkiden kaynaklanmaktadır.



Şekil 13. *C. zeybekii* tohumlarının çimlendirildiği *in vitro* ortamlarda görülen çimlenme yüzdeleri



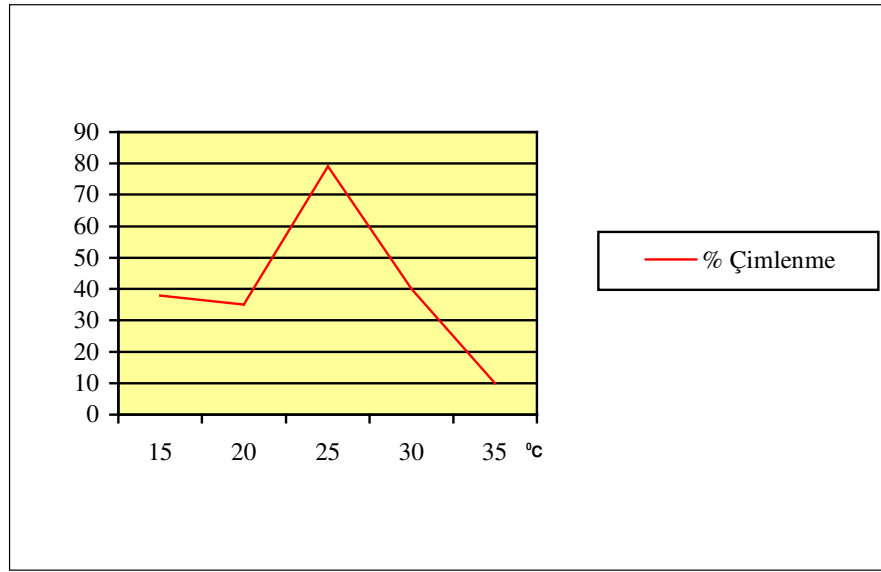
Şekil 14. Distile su ortamında çimlenmiş tohumlar

Sonuç olarak *C. zeybekii* tohumlarının *in vitro* çimlenmesi için 1 mg/L GA₃ ilaveli vitamin destekli distile su ortamı en uygun ortam olarak belirlenmiştir (Şekil 14). Vitamin destekli distile su ortamının en iyi sonuç vermesi bize avantaj sağlamıştır, çünkü bu ortam etkili olmakla beraber hazırlanması hem kolay hem de masrafsızdır.

Denemelerin bundan sonraki aşamalarında 1 mg/L GA₃ ilaveli vitamin destekli distile su ortamı temel ortam olarak kullanılmıştır. Çimlenme üzerine ışığın etkisini araştırmak için bu ortamlara ekilen bir grup tohum 16/8 saat fotoperiyoda tabi tutulurken, diğer grup karanlık ortamı sağlaması açısından kavanozların dışı alüminyum folyo ile sarılmak suretiyle 24 ±2 °C’de inkübasyona bırakılmıştır.

Yaptığımız denemenin sonuçlarına göre *C. zeybekii* tohumları karanlık koşullarda %80 çimlenme yüzdesi gösterirken, aydınlıkta bu oran %78 olarak belirlenmiş ve çimlenme yüzdeleri karşılaştırıldığında ışık ve karanlık uygulamaları arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır. Otsu kompozitleri içeren (Willis and Groves, 1991; Plummer et al.,1997; Clarke et al.,2000) pek çok küçük tohumu sahip türde çimlenme için ışık gereksiniminin yaygın olduğu Pons (1992) tarafından rapor edilmesine rağmen, ışığın tohum üzerine etkisinin genotipe bağlı ve çok geniş bir tepki çeşitliliğine sahip olduğu da unutulmaması gereken bir gerçektir.

Üçüncü denemede, *C. zeybekii* tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Bilindiği gibi tohumlar çimlenme için gereken farklı metabolik süreçler için uygun bir sıcaklığa gereksinim gösterirler. Bu nedenle sıcaklık çimlenmeyi etkileyen çok önemli hatta öncelikli dış faktörlerdendir. Denemelerimizde 24 ± 2 °C’de inkube edilen tohumlar en yüksek çimlenme yüzdesine sahipken (% 79), bu değer altında ve üstündeki sıcaklıklarda çimlenme yüzdesinin düştüğü görülmüştür (Şekil 15).



Şekil 15. *C. zeybekii* tohumlarının farklı sıcaklıklardaki *in vitro* çimlenme yüzdeleri

Tüm bu denemelerin sonucunda *C. zeybekii* tohumlarının *in vitro* koşullarda maksimum çimlenme yüzdesini gösterdiği final protokol aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

Tohumlar akan çeşme suyu altında yarım saat yıkandıktan sonra, 10 dakika boyunca % 70’lik etil alkolde tutulmalı, ardından % 4.5’lik sodyum hipoklorit solusyonu ile 15 dakika boyunca muamele edilip sterilizasyonları sağlandıktan sonra üç defa distile su ile yıkanmalıdır. Steril tohumlar 1mg/L GA₃ içeren vitamin destekli distile su ortamına aktarılarak, 24 ± 2 °C’de 16/8 saat fotoperiyotta ya da karanlık koşullarda tutulmalıdır. Bu prosedür ile *C. zeybekii* tohumları %80 oranında çimlendirilebileceklerdir.

4.1.4. Çimlendirilen tohumların saksılara alınması

In vitro koşullarda çimlendirilen (kotiledonları belirmiş) tohumların bir kısmı bahçe toprağı içeren saksılara alınmış iklim odası koşullarında yaklaşık 8 ay boyunca yaşatılabılmışlardır (Şekil 16). Bu süre içinde bitkiler sağlıklı bir gelişme göstermiş ve herhangi bir morfolojik anomali gözlenmemiştir. Ancak populasyonun geri güçlendirilmesi çalışmaları için, ilerleyen evrelerde bitkinin kapitulum sayısı, kapitulum başına tohum sayısı, bir bireydeki tohum sayısı v.b. verilerin değerlendirilmesine ve doğal ortamına plantasyonundan sonra uygun deneme düzenekleri kurularak populasyonların takip edilmesi çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Bizim çalışmamızda *in vitro* çalışmalarda kullanılmak üzere maksimum sayıda steril bitki eldesi için *in vitro* çimlenme koşullarını belirlemek temel hedefimizi oluşturduğundan çalışmalar bu sınırlar içinde tutulmuştur.



Şekil 16. Çimlendikten sonra saksılara alınan fideler

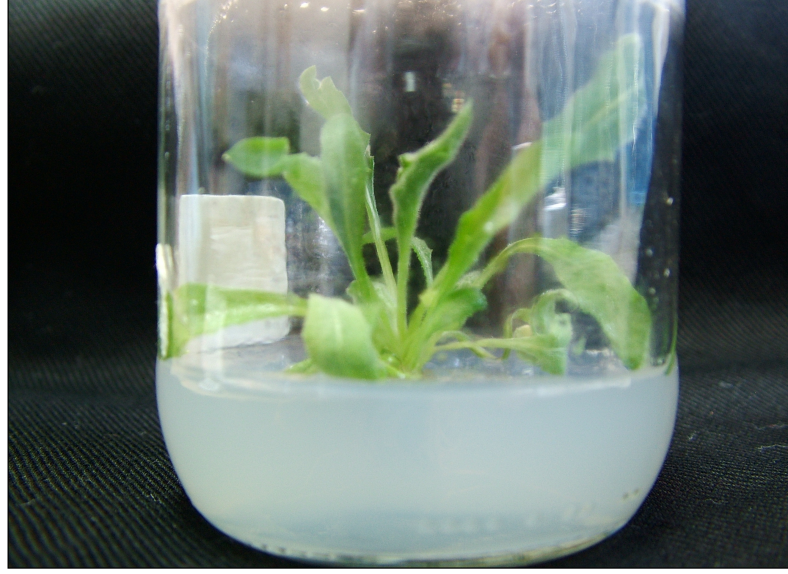
4.2. Mikroçoğaltım Denemeleri

4.2.1. Steril fide gelişimi için en uygun *in vitro* ortamın belirlenmesi

Farklı ortamlardan elde edilen steril fidelikler en uygun gelişim gösterdikleri *in vitro* ortamın belirlenmesi amacı ile B₅, MS ve White ortamlarına aktarılmışlardır. Kültür ortamının kimyasal kompozisyonu *in vitro* bitki çoğaltım çalışmalarında önemli rol oynar. Optimal koşulların altındaki ve üstündeki kültür ortamı fizyolojik hastalıklara ve doku ölümüne neden olur. Denemelerimizde White ortamına aktarılan fidelerin büyük bir kısmının yaklaşık bir ay sonra öldükleri (Şekil 17) gözlenmiştir. Olasılıkla bu ortamın içerdiği tuz miktarı bitkinin sağlıklı gelişim göstermesi açısından yetersiz kalmıştır. B₅ ve MS ortamlarına aktarılan fideler ise hemen hemen birbirine benzer şekilde sağlıklı bir gelişim göstermişlerdir (Şekil 18 ve 19). Yaklaşık sekiz hafta sonra B₅ ve MS ortamlarındaki fideler sürgün boyu, sürgün sayısı, yaprak sayısı, yaprak genişliği, kök boyu ve kök sayısı açısından incelendiğinde fide gelişimi için en uygun ortamın MS olduğu sonucuna varılmıştır (Çizelge 3).



Şekil 17. White ortamındaki bir aylık fide



Şekil 18. B₅ ortamındaki sekiz haftalık fide



Şekil 19. MS ortamındaki sekiz haftalık fide

Çizelge 3. MS ve B₅ ortamlarının fide gelişimi açısından karşılaştırılması

	B₅	MS
Ortalama yaprak genişliği (cm²)	1.25	1.89
Ortalama fide uzunluğu (cm)	5.70	11.17
Ortalama kök uzunluğu(cm)	2.88	6.90
Fide başına ortalama yaprak sayısı	6.03	5.83
Fide başına ortalama sürgün sayısı	1.43	2.30
Fide başına ortalama kök sayısı	2.17	3.23

MS ortamı yüksek tuz içeriğine sahip bir ortamdır ve *in vitro* çoğaltım çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. B₅ ortamında gelişimin MS'e göre nispeten daha az olmasının nedeni olasılıkla B₅ ortamının, MS ortamına göre daha düşük nitrat ve amonyum içermesinden kaynaklanmaktadır. Bu denemeler sonucu MS ortamında gelişen sağlıklı fideler aksiller ve adventif sürgün çoğaltımı denemelerinde başlangıç materyali olarak kullanılmıştır.

4.2.2. Aksiller sürgün çoğaltımı

Aksiller sürgün çoğaltımı denemelerinde *in vitro* bitkicik gelişimi için daha önceden en uygun ortam olarak belirlenen MS ortamında gelişen yaklaşık dört haftalık steril fideler, primer köklerinden ayrılarak BA, KIN ve TDZ içeren ve içermeyen (kontrol) MS besi ortamlarına aktarılmışlardır.

TDZ içeren ortamlara aktarılan fidelerde aksiller sürgün çoğaltımı teşvik edilmesine rağmen, sürgünlerin kısa boylu kümeler halinde belirmediği ve hemen hepsinin hiperhidrik oldukları görülmüştür. Bu nedenle denemenin daha sonraki aşamalarında bu sitokinin tipi aksiller sürgün çoğaltımı için kullanılmamıştır. Pürin olmayan, sentetik ve sitokin benzeri aktiviteye sahip olan TDZ'nin hiperhidrisiti, düşük sürgün kalitesi ve köklenme yeteneği azlığı gibi negatif etkilere neden olabileceği pek çok araştırmacı tarafından da rapor edilmiştir (Lu, 1993; Huetteman and Preece, 1993).

KIN ve BA ilaveli ortamlara aktarılan fidelerde, 4 haftalık süre sonunda artan sürgün sayıları belirlenerek, aksiller sürgün çoğaltımı için en uygun sitokin tip ve konsantrasyonu, sürgün sayısı ve sürgün boyu açısından değerlendirilmiştir (Çizelge 4). KIN ilaveli ortamlarda kontrole göre belirgin bir şekilde aksiller sürgün çoğaltımı teşvik edilmiş ve aksiller sürgün çoğaltımının en fazla olduğu konsantrasyon 0.5 mg/L olarak belirlenmiştir (Şekil 20). Diğer konsantrasyonlarda ise belirgin bir farklılık görülmemiştir.

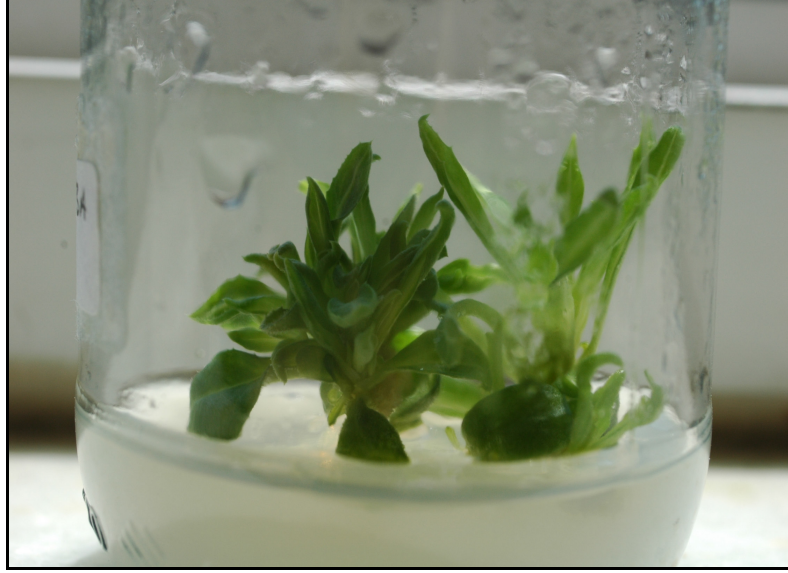
Çizelge 4. Aksiller sürgün çoğaltımı üzerine BA ve KIN etkisi

Ortamlar	Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu (mg/L)	Eksplant başına ortalama sürgün sayısı
MS	0	1.80
MS+BA	0.2	7.10
	0.5	10.05
	1	14.85
	2	9.45
MS+KIN	0.2	4
	0.5	4.50
	1	3.70
	2	2.30



Şekil 20. 0.5 mg/L KIN ilaveli MS ortamında elde edilen aksiller sürgünler

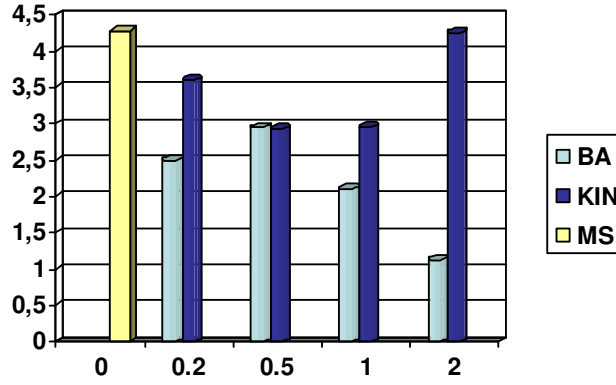
En yüksek çoğalma oranı eksplant başına 14.85 (sürgün/eksplant) sürgün sayısı ile 1 mg/L BA ilaveli ortamda elde edilmiştir (Şekil 21). Benzer sonuç, Cuenca ve Marco (2000) tarafından endemik bir bitki olan *C. spachii*'nin aksiller sürgün proliferasyonu için de rapor edilmiştir. BA'nın, daha düşük (0.2 ve 0.5 mg/L) ve daha yüksek (2 mg/L) konsantrasyonlarında eksplant başına düşen sürgün sayısında bir azalma olmasına rağmen (sırası ile 7.10, 10.05, 9.45 sürgün/eksplant), diğer sitokinin tip ve konsantrasyonları ile karşılaştırıldığında, *C. zeybekii*'nin aksiller sürgün çoğaltımı için en etkili sitokinin tipi olduğunu söylemek mümkündür. BA'nın diğer endemik veya tehdit altında olan *Centaurea* türleri için etkili bir sitokinin olduğu daha önce de pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Hammatt and Evans, 1985; Iriondo and Perez 1996).



Şekil 21. 1 mg/L BA ilaveli MS ortamında elde edilen aksiller sürgünler

BA ortamında görülen fazla sayıda aksiller sürgün sayısına karşılık, sürgünlerin boyları göreceli olarak kısadır. Sürgün boyları 0.2 mg/L BA'da 2.5 cm, 0.5 mg/L BA'da 2.95 cm, 1 mg/L BA'da 2.1 cm ve 2 mg/L BA'da 1.13cm olduğu görülmüştür. KIN ilaveli ortamlarda görülen sürgün boylarının BA ilaveli ortamlardaki sürgünlere göre nispeten daha uzun oldukları (0.2 mg/L KIN'de 3.6 cm, 0.5 mg/L KIN'de 2.93 cm, 1 mg/L KIN'de 2.96 cm) görülmüştür. Maksimum sürgün boyunun en yüksek ortalaması bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ve 2 mg/L KIN (4.26 cm) içeren MS (4.27 cm) ortamlarında elde edilmiştir (Şekil 22). BA ve KIN içeren ortamlarda artan sürgün boyuna karşılık, sürgün sayısında bir azalma yani konsantrasyona bağlı olarak sürgün sayısı artışı ile sürgün boyu arasında negatif bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Sürgün sayısı artışı ile sürgün boyu arasındaki negatif ilişki, endemik bir bitki olan *Centaurea pauri* için infloresens gövdesinin eksplant olarak kullanılması ile aksiller sürgün çoğaltımının teşvik edildiği çalışmada da rapor edilmiştir (Cuenca et. al., 1998).

Mikroçoğaltım çalışmalarında elde edilen mikrosürgünlerin kalitesi çoğu durumda göz ardı edilmektedir. Oysaki mikrosürgün kalitesi köklenme, fide güçlülüğü ve bitkiciklerin dış ortamlara aktarılma sonrası hayatta kalma başarısı için oldukça önemlidir (Singh and Syamal, 2001). Bu veriler göz önüne alınarak denemelerimizde en yüksek çoğalma oranının gözleendiği BA ilaveli ortamlarda elde edilen sürgünler, geliştirilmek üzere bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamına alınmıştır (Şekil 23).



Şekil 22. Sitokininin tipi ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişen aksiller sürgün boyları



Şekil 23. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamına alınarak geliştirilmiş aksiller sürgünler

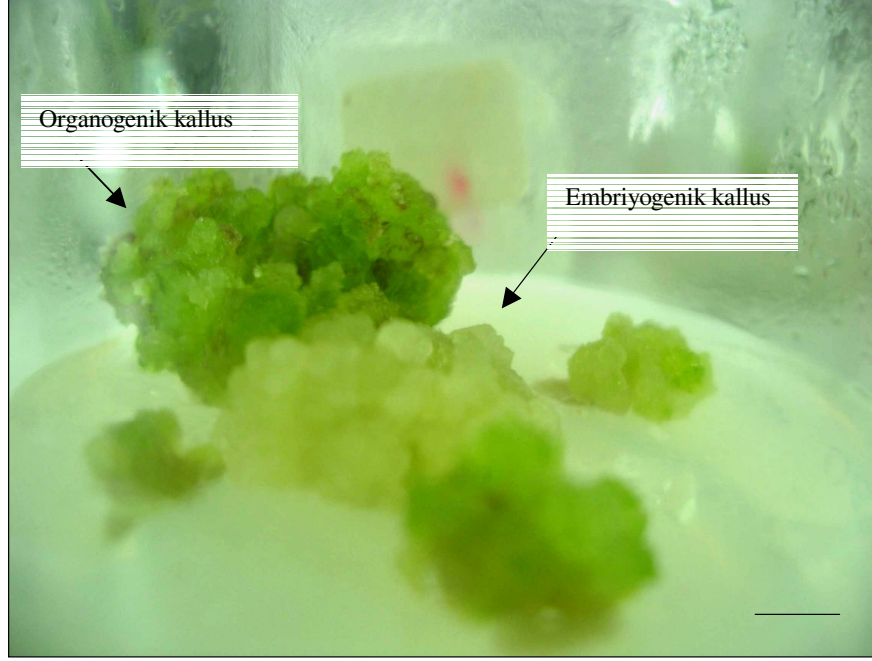
4.2.3. Direkt adventif sürgün oluşumu

Direkt adventif sürgün oluşturma denemelerinde yaklaşık 4 haftalık steril fidelerden alınan yaprak eksplantları başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Aksiller tomurcukları olmaksızın alınan yaprak eksplantları tam olarak ve abaxial yüzleri ortamla temas edecek şekilde BA (0.2, 0.5, 1 ve 2 mg/L), KIN (0.2, 0.5, 1 ve 2 mg/L) ve TDZ'nin (0.001, 0.005, 0.01 ve 0.02 mg/L) farklı konsantrasyonlarını içeren MS ortamlarına aktarılmışlardır. Bu eksplantların büyük bir çoğunluğunun aktif oldukları ve kültürde ya direkt sürgün ya da kallus oluşturarak cevap verdikleri gözlenmiştir (Çizelge 5).

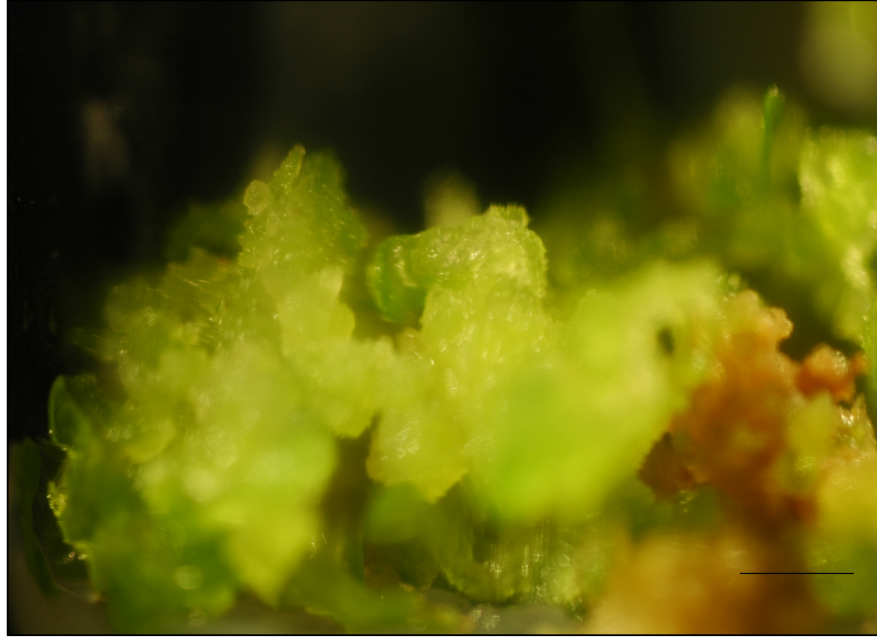
Çizelge 5. Farklı sitokin tip ve konsantrasyonlarında % kallus ve sürgün oluşumu

Sitokininler	Konsantrasyonlar (mg/L)	Kallus oluşumu (%)	Sürgün oluşumu (%)
TDZ	0.001	90	-
	0.005	100	-
	0.01	100	-
	0.02	47.5	-
BA	0.2	5	-
	0.5	52.5	-
	1	27.5	-
	2	35	-
KIN	0.2	5	12.5
	0.5	2.5	10
	1	4	25
	2	-	7.5

TDZ'nin tüm konsantrasyonlarında yüksek oranda kalluslaşma görülmüştür. Kalluslaşma oranları 0.001 mg/ L TDZ'de % 90, 0.005 ve 0.01 mg/L TDZ'de % 100'ü bulurken, bu oran 0.02 mg/L TDZ'de %47.5' e düşmüştür. TDZ, özellikle odunsu bitkilerde kallus ve sürgün oluşumunu teşvik etmek için kullanılan etkili bir sitokinin (Huetteman and Preece, 1993) olmasına rağmen, bizim çalışmalarımızda sadece kallus oluşumunu teşvik etmiştir. Kallus oluşumu somaklonal varyasyona neden olabileceğinden adventif sürgün rejenerasyonu çalışmalarında göreceli olarak istenmeyen bir ara evre olmasına rağmen, endemik bir bitki olan *C. zeybekii*'nin germplasmının sürdürülmesi adına ümit verici bir süreç olabilir. Çünkü kallus kültürleri aracılığı ile totipotent hücreler uzun süreli olarak (soğukta muhafaza) veya belli aralıklarla yeniden oluşturularak saklanabilir (alt kültürleme) ve ihtiyaç duyulduğunda bu hücrelerden yeni bitkiler oluşturulabilir. Kallus kültürleri aracılığı ile (yanı sıra başka teknikler de kullanılabilir) *in vitro* germplasm muhafazası çalışmaları gen ve tohum bankalarına alternatif oluşturabilmektedir (Brown and Thorpe, 1995). Denemeler sırasında elde edilen kalluslardan 0.005 mg/L TDZ'li ortamlarda özellikle eksplantların proksimal kısımlarında düşük oranlarda (ort.%10) açık sarı renkli embriyogenik kalluslar elde edilirken, eksplantların uç kısımlarında oluşan kallusların büyük bir çoğunluğunun yeşil renkli ve organogenik yapıda oldukları görülmüştür (Şekil 24). Eksplantların aynı ortamda olmalarına rağmen, farklı cevap vermeleri ilginçtir. Embriyogenik kallusların farklılaşması ile de teşvik edilebilen somatik embriyogenezis özel bir farklılaşma sürecidir. Bu süreci etkileyen pek çok faktörün yanı sıra, son yıllarda reaktif oksijen türleri ile de ilişkili olduğu tartışılmaktadır. Denemelerimizde gözlenen durum olasılıkla, yaprağın çeşitli kısımlarında farklı konsantrasyonlarda bulunan reaktif oksijen türleri veya -aksiller tomurcuklarından ayırmak için oluşturduğumuz kesik yüzeyde meydana gelen oksidatif stres nedeni ile -kültür sırasında sonradan oluşan reaktif oksijen türlerinin artan miktarı ile ilişkili olabilir. Artan hidrojen peroksit miktarının somatik embriyogenezisi teşvik ettiği Kairong ve arkadaşları (1999) tarafından da rapor edilmiştir. Denemelerimizde amaç, direkt adventif sürgün rejenerasyonu olduğu için, oluşan kalluslar geliştirilmemiş ve rejeneredilmeye çalışılmamıştır.



Şekil 24. 0.005 mg/L TDZ ilaveli MS ortamında gözlenen 6 haftalık kalluslar. Bar: 1 cm



Şekil 25. 0.2 mg/L BA ilaveli MS ortamında gözlenen nodüler kallus yapısı. Bar 1cm.

0.5, 1 ve 2 mg/L BA ilaveli ortamlarda da yüksek oranlarda kalluslaşma görülmüştür (Çizelge 5). Bu konsantrasyonlara aktarılan eksplantların kalluslaşma oranları sırasıyla %52.5, %27.5 ve %35 olarak belirlenmiştir. 0.2 mg/L BA içeren ortamlarda kalluslaşma oranı düşük olmasına rağmen (%5) sürgün tomurcuklarına benzer yapılarda görülmüştür. Ancak alt kültürlemeler ile bu tomurcukların sürgüne dönüşmemesi bu yapıların olasılıkla nodüler kallus olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 25). Bu nedenlerden dolayı bu sitokinin tipi de direkt adventif sürgün rejenerasyonu için etkisiz bulunmuştur. BA birçok Asteraceae türü için sürgün rejenerasyonunda etkili bir sitokin olarak değerlendirilirken (Ruffoni and Massabo, 1991), bizim çalışmamızda istenilen cevabı vermemesi ilginçtir. Fakat organogenik cevabın başta genotip olmak üzere, pek çok faktör tarafından kontrol edildiği de unutulmaması gereken bir gerçektir.

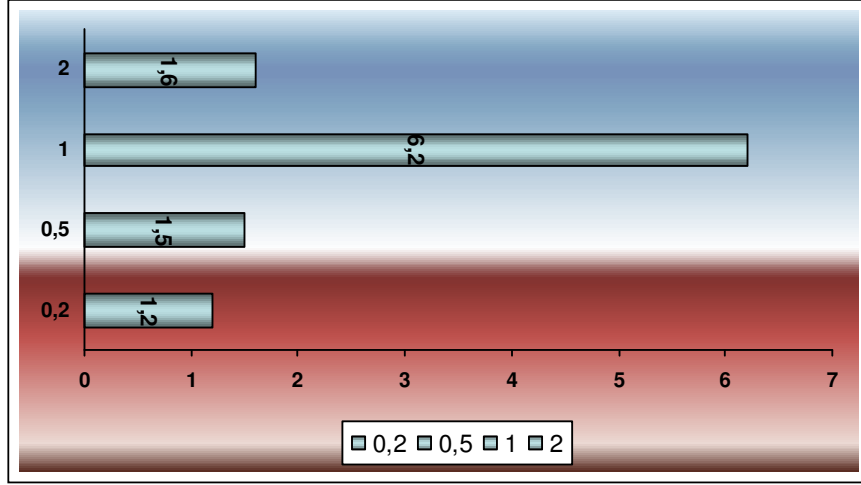
KIN ilaveli ortamlarda ise düşük oranlarda kalluslaşma görülmüştür. Kalluslaşma oranları 0.2 mg/L KIN'de % 5, 0.5 mg/L KIN'de % 2.5, 1 mg/L KIN'de % 4 iken 2 mg/L KIN içeren ortamda kalluslaşma görülmemiştir (Çizelge 5). Denenen tüm konsantrasyonlarda yaklaşık iki hafta sonra yaprakların yüzeylerinde orta damara yakın yerlerde sürgünler belirmeye başlamış (küçük yaprak çıkışı) (Şekil 26) ve iyi gelişmiş sürgünler 6. haftanın sonunda gözlenmiştir (Şekil 27). Eksplantların ortamla temas ettiği kısımlarında kalluslaşma görülmüş ancak bu kalluslar zamanla karararak etkinlik göstermemişlerdir. Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı 1 mg/L KIN içeren ortamda (6.2 sürgün/eksplant) (Şekil 28) elde edilmiştir. Maksimum sürgün boyunun en yüksek ortalaması da (4.17 cm)(Şekil 29) yine ortamda gözlenmiştir. Sonuç olarak *C. zeybekii* türünün *in vitro* elde edilmiş steril fidelerinin yapraklarının eksplant olarak kullanılması ile direkt adventif sürgün rejenerasyonu için 1 mg/L KIN ilaveli MS ortamının eksplant başına en yüksek sürgün sayısı ve maksimum sürgün boyu açısından en iyi ortam olduğunu söylemek mümkündür.



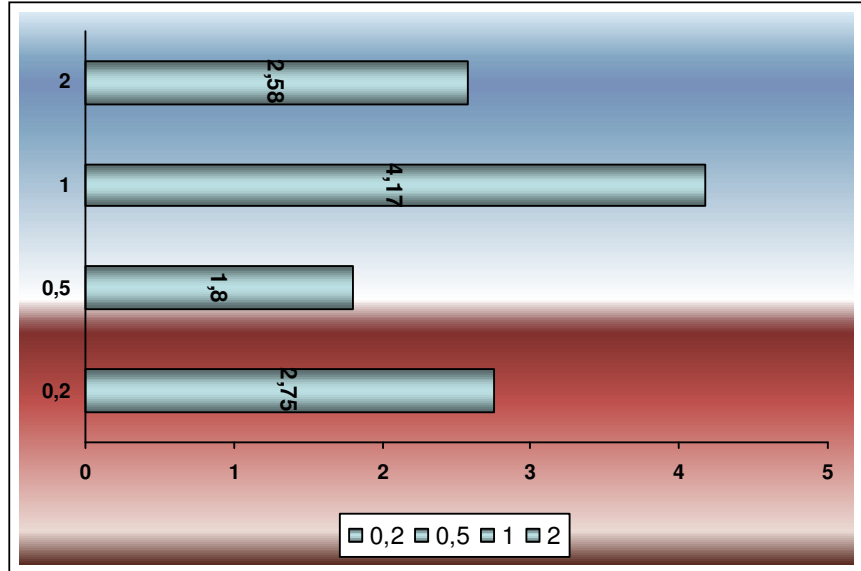
Şekil 26. 0.2 mg/L KIN ilaveli MS ortamında yapraktan direkt rejenere olmuş bir haftalık adventif sürgün. Bar: 0.5 cm



Şekil 27. 1 mg/L KIN ilaveli MS ortamında yapraktan direkt rejenere olmuş altı haftalık adventif sürgünler.



Şekil 28. KIN ilaveli MS ortamlarında oluşan eksplant başına sürgün sayısı



Şekil 29. KIN ilaveli MS ortamlarında elde edilen sürgünlerin ortalama boyları

4.2.4. Köklendirme

Aksiller ve adventif sürgün oluşumu denemelerinden elde edilen sürgünler stok kültürden ayrılarak köklenmeleri için 0.5, 1, 2 ve 5 mg/L IAA, IBA ve NAA içeren MS ve ½ MS ortamlarına alınmışlardır. MS ve ½ MS ortamları arasında köklenme teşviki açısından belirgin bir farklılık görülmemiştir. Ancak köklenme son derece düşüktür ve sürgünlerin sadece %15'i 0.5 mg/L IBA ilaveli ortamlarda köklendirilebilmişlerdir (Şekil 30). Köklenen bitkicikler dış ortamlara kademeli bir şekilde aktarılarak aklimatize edilmiştir (Şekil 31).



Şekil 30. Köklenmiş bir sürgün



Şekil 31. Dış ortamda geliştirilen fideler

SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada endemik bir bitki olan *Centaurea zeybekii* Wagenitz'nin *in vitro* çimlenmesi ve mikroçoğaltımı üzerine araştırmalar yapılmıştır. Türün kapitulularından çıkarılan tohumlar denemelerde başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Temmuz ve Ağustos aylarında toplanan tohumlara öncelikle canlılıklarının belirlenmesi amacıyla tetrazolium testi uygulanmış ve testin sonuçlarına göre Ağustos ayında toplanan tohumların %98'nin canlı oldukları görülmüştür. Bulgularımıza dayanarak *C. zeybekii* Wagenitz türünün tohumları ile yapılacak herhangi bir çalışmada kullanılmak üzere, tohum toplama işinin Ağustos ayı içinde gerçekleştirilmesi gerektiğini önerebiliriz. 2 yıllık süre içinde 6 aylık periyotlarla tekrar edilen TTC testi sonuçları dikkate alındığında, tohumların 2 yılın sonunda canlılıklarını koruduğu ve tohum bankalarında saklamak için kolay bir materyal olduğunu söylemek mümkündür, ancak konu ile ilgili ayrıntılı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

In vitro çimlenme denemelerinde kullanılmak üzere Ağustos ayında toplanan tohumlar öncelikle steril edilmiştir. Yarım saat akan çeşme suyu altında yıkandıktan sonra 10 dakika boyunca % 70'lik etil alkolde tutulan tohumlar daha sonra % 4.5 lik NaOCI'de 15 dakika steril edildikten sonra 3 kez steril distile su ile yıkanmıştır. Bu sterilizasyon prosedürü ile % 98 oranında steril kültürler elde edilmiştir.

C. zeybekii'nin *in vitro* çimlenmesi üzerine GA₃ ilaveli ve ilavesiz farklı *in vitro* ortamlar, ışık ve sıcaklık gibi faktörlerin etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, *in vitro* koşullarda maksimum çimlenme yüzdesini veren final protokol belirlenmiştir. Bu protokol aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

Tohumlar akan çeşme suyu altında yarım saat yıkandıktan sonra, 10 dakika boyunca % 70'lik etil alkolde tutulmalı, ardından % 4.5'lük sodyum hipoklorit solusyonu ile 15 dakika boyunca muamele edilip sterilizasyonları sağlandıktan sonra üç defa distile su ile yıkanmalıdır. Sterilize edilen tohumlar 1mg/L GA₃ içeren

vitamin destekli distile su ortamına aktarılarak, 24 ± 2 °C'de 16/8 saat fotoperiyot koşullarında ya da karanlık koşullarda tutulmalıdır. Bu protokol ile *C. zeybekii* tohumları % 80 oranında çimlendirilebileceklerdir.

In vitro koşullarda çimlenen bitkiciklerin bir kısmı saksılara aktararak populasyonun *ex situ* elde edilmiş bireyler kullanılarak güçlendirilmesine çalışılmıştır. Bu çalışmalarda dış ortama aktarılan fideler iklim odası koşullarında yaklaşık 8 ay boyunca yaşatılabilmektedir. Bu süre içinde bitkiler sağlıklı bir gelişme göstermiş ve herhangi bir morfolojik anomali gözlenmemiştir. Ancak populasyonun geri güçlendirilmesi çalışmaları için, ilerleyen evrelerde bitkinin kapitulum sayısı, kapitulum başına tohum sayısı, bir bireydeki tohum sayısı v.b.verilerin değerlendirilmesine ve doğal ortamına plantasyonundan sonra uygun deneme düzenekleri kurularak populasyonların takip edilmesi çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Çimlenme denemeleri ve saksıdaki bitkiciklerin gelişimleri dikkate alındığında *C. zeybekii* tohumlarının çimlenme istekleri ve fide gelişimleri için göreceli olarak çok ekstrem koşullar gerekmemektedir. Buna rağmen arazi çalışmaları sırasında bitkinin populasyonundaki birey sayısının azaldığının gözlenmesi, olasılıkla türün rekabet gücü eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Çam ormanı altında ya da tepe tacı genişliği fazla olan orman altında gözlenmemiş olması bitkinin gölgeyi tercih etmediğinin bir göstergesi olabilir. Işık isteğinden dolayı, bitki orman açıklıklarını ya da yol kenarlarını tercih edip ruderal bir bitki gibi davranmaktadır. Ancak neoendemiklerin yayılım ve ortama uyum potansiyeli yüksek diğer rudallerle rekabette, onlar kadar başarılı olamadıkları da bilinen bir gerçektir. Bitkinin göreceli olarak basit bir ortamda çimlenme ve gelişim göstermesi yani rekabetin olmadığı koşullarda iyi gelişiyor olmasına rağmen, populasyonundaki bu denli azalmanın nedenlerini olasılıkla doğal ortamında varolan diğer bitki türleri ile ekolojik rekabet ilişkilerinde aramak gerekir. Bunun için de bitkinin toprak altı ve üstü predatörlerinin varlığı ya da yokluğu, ortamdaki diğer komşuları ile olan ilişkileri v.b. kriterlerin uygun pilot bölgeler oluşturularak incelenmesine ihtiyaç vardır. Tüm bunlara karşın endemizmin çok sayıda potansiyel nedeni olabileceği ve bu nedenlerin aydınlatılması ile koruma stratejilerine daha doğru bir biçimde karar verilebileceği de unutulmaması gereken bir gerçektir. Bizim çalışmamızda *in vitro* çalışmalarda kullanılmak üzere

maksimum sayıda steril bitki eldesi için *in vitro* çimlenme koşullarını belirlemek temel hedefimizi oluşturduğundan çalışmalar bu sınırlar içinde tutulmuştur.

Farklı ortamlardan elde edilen steril fidelikler en uygun gelişim gösterdikleri *in vitro* ortamın belirlenmesi amacı ile B₅, MS ve White ortamlarına aktarılmışlardır. White ortamındaki fidelerin 4 hafta sonra öldüğü görülmüştür. Yaklaşık sekiz hafta sonra B₅ ve MS ortamlarındaki fideler sürgün boyu, sürgün sayısı, yaprak sayısı, yaprak genişliği, kök boyu ve kök sayısı açısından incelendiğinde fide gelişimi için en uygun ortamın MS olduğu sonucuna varılmıştır. MS ortamında gelişen sağlıklı fideler aksiller ve adventif sürgün çoğaltımı denemelerinde başlangıç materyali olarak kullanılmıştır.

Aksiller sürgün çoğaltımı denemelerinde MS ortamında gelişen yaklaşık 4 haftalık steril fideler, primer köklerinden ayrılarak BA, KIN ve TDZ içeren ve içermeyen MS besi ortamlarına aktarılmışlardır. TDZ içeren ortamlara aktarılan fidelerde aksiller sürgün çoğaltımı teşvik edilmesine rağmen, sürgünlerin kısa boylu kümeler halinde belirdiği ve hemen hepsinin hiperhidrik oldukları görülmüştür. KIN ilaveli ortamlarda kontrole göre belirgin bir şekilde aksiller sürgün çoğaltımı teşvik edilmiş ve aksiller sürgün çoğaltımının en fazla olduğu konsantrasyon 0.5 mg/L olarak belirlenmiştir KIN içeren ortamlarda artan sürgün boyuna karşılık, sürgün sayısında bir azalma yani konsantrasyona bağlı olarak sürgün sayısı artışı ile sürgün boyu arasında negatif bir ilişki olduğu gözlenmiştir. En yüksek çoğalma oranı eksplant başına 14.85 (sürgün/eksplant) sürgün sayısı ile 1 mg/L BA ilaveli ortamda elde edilmiştir. BA'nın, daha düşük (0.2 ve 0.5 mg/L) ve daha yüksek (2 mg/L) konsantrasyonlarında eksplant başına düşen sürgün sayısında bir azalma olmasına rağmen (sırası ile 7.10, 10.05, 9.45 sürgün/eksplant), diğer sitokin tip ve konsantrasyonları ile karşılaştırıldığında, *C. zeybekii*'nin aksiller sürgün çoğaltımı için en etkili sitokin tipi olduğunu söylemek mümkündür. Maksimum sürgün boyunun en yüksek ortalaması ise bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ve 2 mg/L KIN içeren MS ortamlarında elde edilmiştir.

Direkt adventif sürgün oluşturma denemelerinde yaklaşık 4 haftalık steril fidelerden alınan yaprak eksplantları başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Aksiller tomurcukları olmaksızın alınan yaprak eksplantları tam olarak ve abaxial

yüzleri ortamla temas edecek şekilde BA (0.2, 0.5, 1 ve 2 mg/L), KIN (0.2, 0.5, 1 ve 2 mg/L) ve TDZ'nin (0.001, 0.005, 0.01 ve 0.02 mg/L) farklı konsantrasyonlarını içeren MS ortamlarına aktarılmışlardır. Bu eksplantların büyük bir çoğunluğunun aktif oldukları ve kültürde ya direk sürgün ya da kallus oluşturarak cevap verdikleri gözlenmiştir. TDZ ve BA'nın hemen tüm konsantrasyonlarında kallus oluşumu teşvik edilmiştir. Bizim denemelerimizde direkt adventif sürgün rejenerasyonu hedeflendiğinden kallus oluşumu istenmeyen bir ara evre olmasına rağmen, bu veri *C. zeybekii*'nin germplazmının korunması adına bir seçenek oluşturabilir. Çünkü kallus kültürleri aracılığı ile (yanı sıra başka tekniklerde kullanılabilir) *in vitro* germplasm muhafazası çalışmaları gen ve tohum bankalarına alternatif oluşturabilmektedir. KIN ilaveli ortamlarda ise düşük oranlarda kalluslaşma görülmüştür. Kalluslaşma oranları 0.2 mg/L KIN'de % 5, 0.5 mg/L KIN'de % 2.5, 1 mg/L KIN'de % 4 iken 2 mg/L KIN içeren ortamda kalluslaşma görülmemiştir. Denenen tüm konsantrasyonlarda yaklaşık iki hafta sonra yaprakların yüzeylerinde orta damara yakın yerlerde sürgünler belirmeye başlamış (küçük yaprak çıkışı) ve iyi gelişmiş sürgünler 6. haftanın sonunda gözlenmiştir. Direkt sürgün rejenerasyonu gözlenen ortamlarda eksplantların ortamla temas ettiği kısımlarında kalluslaşma görülmüş ancak bu kalluslar zamanla kararak etkinlik göstermemişlerdir. Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı 1 mg/L KIN içeren ortamda (6.2 sürgün/eksplant) elde edilmiştir. Maksimum sürgün boyunun en yüksek ortalaması da (4.17 cm) yine aynı ortamda gözlenmiştir. Sonuç olarak *C. zeybekii* türünün *in vitro* elde edilmiş steril fide yapraklarının eksplant olarak kullanılması ile direkt adventif sürgün rejenerasyonu için 1 mg/L KIN ilaveli MS ortamının eksplant başına en yüksek sürgün sayısı ve maksimum sürgün boyu açısından en iyi ortam olduğunu söylemek mümkündür.

Aksiller ve direk adventif sürgün rejenerasyon denemelerinden elde edilen sürgünler köklenmeleri için NAA, IBA ve IAA'nın farklı konsantrasyonlarını (0.5, 1, 2 ve 5 mg/L) içeren ½ MS ve MS ortamlarına alınmışlardır. Denemelerde elde edilen köklendirme oranları arasında bu iki ortam arasında bir fark görülmemiş, sürgünlerin sadece %15'i 0.5 mg/L IBA ilaveli ortamlarda köklendirilerek kademeli bir şekilde dış ortama transfer edilmişlerdir.

ÖZET

Bu çalışmada endemik bir bitki olan *Centaurea zeybekii* Wagenitz'nin *in vitro* çimlenmesi ve mikroçoğaltımı üzerine araştırmalar yapılmıştır. Türün kapitulularından çıkarılan tohumlar (aken meyve) denemelerde başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Çalışma iki aşamada planlanmıştır. Birinci aşamada, farklı *in vitro* çimlendirme ortamlarının, gibberellik asitin, ışığın ve sıcaklığın çimlenme üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu denemelerde *Centaurea zeybekii* tohumlarının optimum *in vitro* çimlenme koşullarının belirlenmesi ve çimlenen fideciklerin dış ortamlara aktararak populasyonun *ex situ* elde edilmiş bireyler kullanılarak güçlendirilmesi hedeflenmiştir. İkinci aşamada ise, *in vitro* koşullarda çimlenen tohumlardan steril fide gelişimi için uygun ortamların belirlenmesinin yanı sıra, bu fidelerin çeşitli kısımlarının eksplant olarak kullanılması ile aksiller ve adventif sürgün oluşumu teşvik edilmeye çalışılmıştır.

Kapitululardan çıkarılan tohumlara öncelikle canlılık testi yapılmış ve canlılık yüzde olarak belirlenmiştir. Temmuz ve Ağustos aylarında toplanan tohumlara uygulanan tetrazolium testinin sonuçlarına göre, Temmuz ayında toplanan tohumların çok az bir kısmının boyandıkları (%30) ve bu boyanmanın da çok açık renkte olduğu gözlenmiştir. Ağustos ayında toplanan tohumların ise % 98'inin boyandıkları ve çok net olarak kırmızı renk aldıkları görülmüştür. TTC testi sonuçlarına göre Ağustos ayında toplanan tohumların hemen hepsinin canlı oldukları ve uzun bir süre (20°C sıcaklık, %50-60 nemde) canlılıklarını korudukları belirlenmiştir.

İlk denemede, GA₃ destekli ve desteksiz değişik *in vitro* ortamlar kullanılmış, *C. zeybekii* türünün *in vitro* çimlenmesi için en uygun ortam araştırılmıştır. Tohumlar akan çeşme suyu altında yarım saat yıkandıktan sonra, 10 dakika boyunca % 70'lik etil alkolde, ardından 15 dakika % 4.5'luk sodyum hipoklorit solusyonunda tutulup sterilizasyonları sağlandıktan sonra üç defa distile su ile yıkanmıştır. Steril edilen tohumlar farklı konsantrasyonlarda (1, 2 ve 3 mg/L) gibberellik asit içeren ve içermeyen çimlendirme ortamlarına (Sıvı MS, White, B₅, vitamin destekli distile su) alınarak, 24±2 °C'de 16/8 saat fotoperiyot koşulları altında kültüre edilmişlerdir. Bu

denemenin sonunda en yüksek çimlenme yüzdesinin vitamin destekli distile suya 1 mg/L GA₃ ilavesi ile hazırlanmış ortamda olduğu görülürken (% 80), bunu sırasıyla 2 mg/L GA₃ ilaveli White (%45) ve B₅ (%45) ortamları izlemiştir. Denemenin bundan sonraki aşamalarında maksimum çimlenmenin elde edildiği 1 mg/L GA₃ ilaveli distile su ortamı temel ortam olarak kullanılmıştır.

İkinci denemede çimlenme üzerine ışığın etkisi araştırılmıştır. 1 mg/L GA₃ ilaveli distile su ortamlarına ekilen bir grup tohum 16/8 saat fotoperiyoda tabi tutulurken, diğer bir grup karanlıkta 24 ±2 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Denemenin sonunda *C. zeybekii* tohumları karanlık koşullarda %80 çimlenme gösterirken, aydınlıkta bu oran %78 olarak belirlenmiş ve çimlenme yüzdeleri karşılaştırıldığında ışık ve karanlık uygulamaları arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır.

Üçüncü denemede tohum çimlenmesi üzerine sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Sterilize edilmiş tohumlar 1 mg/L GA₃ ilaveli distile su ortamlarına aktarıldıktan sonra 15, 20, 25, 30 ve 35 °C’lik sıcaklıklarda kültüre edilmişlerdir. 24±2 °C’de inkube edilen tohumlar en yüksek çimlenme yüzdesine sahipken (% 79), bu değer in altında ve üstündeki sıcaklıklarda çimlenme yüzdesinin düştüğü görülmüştür.

In vitro koşullarda çimlendirilen (kotiledonları belirmiş) tohumların bir kısmı bahçe toprağı içeren saksılara alınmış ve iklim odası koşullarında yaklaşık 8 ay boyunca yaşatılabilmişlerdir. Çimlenen tohumların diğer bir kısmı ise en uygun gelişim gösterecekleri *in vitro* ortamın belirlenmesi amacı ile B₅, MS ve White ortamlarına aktarılmışlardır. Yaklaşık 8 hafta sonra (dört haftada bir alt kültür edilmiştir) fideliklerin gelişimleri (sürgün boyu, sürgün sayısı, yaprak sayısı, yaprak genişliği, kök boyu, kök sayısı) incelenerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Denemelerimizde White ortamına aktarılan fidelerin hemen hepsinin bir ay sonra öldükleri gözlenmiştir. B₅ ve MS ortamlarındaki fideler yaklaşık 8 hafta sonra morfolojik kriterler açısından incelendiğinde fide gelişimi için en uygun ortamın MS olduğu sonucuna varılmıştır.

Bitki gelişimi için en uygun ortam olarak belirlenen MS ortamında gelişen yaklaşık 4 haftalık steril fideler aksiller sürgün çoğaltımı için, primer köklerinden ayrılarak farklı sitokininin tip ve konsantrasyonlarını (0.2, 0.5, 1 ve 2 mg/L BA, 0.2,

0.5, 1 ve 2 mg/L KIN ve 0.001, 0.005, 0.01 ve 0.02 mg/L TDZ) içeren MS temel besi ortamlarına aktarılmışlar ve 24 ± 2 °C'de 16/8 saat fotoperiyot koşullarının sağlandığı kültür odasına alınmışlardır. 4 haftalık süre sonunda artan sürgün sayıları belirlenerek aksillar sürgün çoğaltımı için en uygun sitokin tip ve konsantrasyonu, sürgün sayısı ve sürgün boyu açısından değerlendirilmiştir. TDZ içeren ortamlara aktarılan fidelerde aksiller sürgün çoğaltımı teşvik edilmesine rağmen, sürgünlerin kısa boylu kümeler halinde belirlediği ve hemen hepsinin hiperhidrik oldukları görülmüştür. En yüksek çoğalma oranı eksplant başına 14.85 (sürgün/eksplant) sürgün sayısı ile 1 mg/L BA ilaveli MS ortamında elde edilmiştir. Maksimum sürgün boyunun en yüksek ortalaması ise bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ve 2 mg/L KIN içeren MS ortamlarında elde edilmiştir. KIN ve BA içeren ortamlarda artan sürgün boyuna karşılık, sürgün sayısında bir azalma yani konsantrasyona bağlı olarak sürgün sayısı artışı ile sürgün boyu arasında negatif bir ilişki olduğu gözlenmiştir.

Direkt adventif sürgün rejenerasyonu denemelerinde *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş steril fidelerin yaprakları eksplant olarak kullanılmıştır. İki aylık steril fidelerin yaprakları aksiller tomurcukları olmaksızın abaksial yüzleri ortamla temas edecek şekilde BA (0.2, 0.5, 1 ve 2 mg/L), KIN (0.2, 0.5, 1 ve 2 mg/L) ve TDZ (0.001, 0.005, 0.01 ve 0.02 mg/L) içeren ve içermeyen MS ortamlarında kültüre edilmişlerdir. TDZ ilaveli ortamlarda yüksek oranda kalluslaşma görülmüştür. Kalluslaşma oranları 0.001 mg/L TDZ'de % 90, 0.005 mg/L ve 0.01 mg/L TDZ'de % 100'ü bulurken, bu oran 0.02 mg/L TDZ'de %47.5'e düşmüştür. BA ilaveli ortamlarda ise kalluslaşma oranları; 0.5 mg/L BA'da %52.5, 1mg/L BA'da %27.5 ve 2 mg/L BA'da ise %35 oranındadır. 0.2 mg/L BA ilaveli ortamlarda kalluslaşma oranı düşük (% 5) olmasına rağmen, organogenik cevabın nodüler kallus halinde belirmesi ve alt kültürlemeler ile bu durumun değişmemesi nedeniyle bu sitokin tipi de direk adventif sürgün rejenerasyonu için etkisiz bulunmuştur. KIN ilaveli ortamlarda ise düşük oranlarda kalluslaşma görülmüştür. Kalluslaşma oranları 0.2 mg/L KIN'de % 5, 0.5 mg/L KIN'de % 2.5, 1 mg/L KIN'de % 4 iken, 2 mg/L KIN içeren ortamda kalluslaşma görülmemiştir. Denenen tüm konsantrasyonlarda yaklaşık iki hafta sonra yaprakların yüzeylerinde orta damara yakın yerlerde sürgünler belirmeye başlamış (küçük yaprak çıkışı) ve iyi gelişmiş sürgünler 6.

haftanın sonunda gözlenmiştir. Direkt sürgün rejenerasyonu gözlenen ortamlarda eksplantların ortamla temas ettiği kısımlarında kalluslaşma görülmüş ancak bu kalluslar zamanla karararak etkinlik göstermemişlerdir. Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı 1 mg/L KIN içeren ortamda (6.2 sürgün/eksplant) elde edilmiştir. Maksimum sürgün boyunun en yüksek ortalaması da (4.17 cm) yine bu ortamda gözlenmiştir. Sonuç olarak *C. zeybekii* türünün *in vitro* elde edilmiş steril fide yapraklarının eksplant olarak kullanılması ile direkt adventif sürgün rejenerasyonu için 1 mg/L KIN ilaveli MS ortamının eksplant başına en yüksek sürgün sayısı ve maksimum sürgün boyu açısından en iyi ortam olduğunu söylemek mümkündür.

Aksiller ve adventif sürgün oluşumu denemelerinden elde edilen sürgünler stok kültürden ayrılarak köklenmeleri için 0.5, 1, 2 ve 5 mg/L IAA, IBA, NAA içeren MS ve ½ MS ortamlarına alınmıştır. MS ve ½ MS ortamları arasında köklenme teşviki açısından belirgin bir farklılık görülmemiştir. Ancak köklenme son derece düşüktür ve sürgünlerin sadece %15'i 0.5 mg/L IBA ilaveli ortamlarda köklendirilebilmiştir. Köklenen bitkicikler dış ortamlara kademeli bir şekilde aktararak aklimatize edilmiştir.

SUMMARY

In this study, *in vitro* germination and micropropagation of *Centaurea zeybekii* had been investigated. Achenes from the capitula were used as initial explants in the experiments. The experiments were divided into two steps. At the first, effects of different *in vitro* media with gibberellic acid, illumination, temperature on germination were investigated. In these experiments, determination of optimum *in vitro* germination conditions for seeds of *C. zeybekii* and reinforcement of natural population with a support from seedlings acclimated to natural conditions have been aimed. At the second step, determination of appropriate medium for sterile seedlings from *in vitro* germinated seeds and induction of axillary and adventitious shoot formation by using some parts of these seedlings have been strived out.

Viability tests were applicated to the seeds and results were shown as % of total number. According to tetrasolium test results of seeds which were collected in July and August, seeds of July were less (pale red) tinged (some parts were not tinged) and the percentage was 30 %. The seeds of August were almost completely tinged (red) and the percentage was 98 %. According to TTC tests, seeds collected in August were almost completely alive (survive long time under 20°C temperature 50-60 % humidity conditions)

In the first experiment, two different *in vitro* media (with GA₃ and not) were used to describe the most proper medium for the germination. Achenes were sterilized by using a procedure of 70 % ethanol for 10 min. 4,5 % hypochlorite for 15 min. and then they were washed three times with distilled water after the first washing under tap water for 30 minutes. Sterilized seeds were cultured under 24±2 °C 16/8 h photoperiod conditions by transferring them to germination media (liquid MS, B₅, vitamine supported distilled water) containing gibberellic acid in different concentrations and without gibberellic acid. At the result of this experiment, the highest germination rate (80 %) was in distilled water containing 1 mg/L GA₃ and followed by White (45 %) containing 2 mg/L GA₃ and B₅ (45 %). In the later steps

of the experiment, distilled water containing 1 mg/L GA₃ presented the maximum germination rate was used as main medium.

In the second experiment, effect of illumination on germination was investigated. A group of seeds cultured in media containing 1 mg/L GA₃ was exposed to 16/8 h photoperiod while the another group was kept in dark under 24±2 °C condition. Finally, germination rate of *C. zeybekii* seeds was 80 % under dark condition and it was 78 % under photoperiod condition showing no important difference between the groups.

At the third experiment, effect of temperature on germination was investigated. It was found that the highest germination rate was held (79 %) in seeds incubated under 24±2 °C and germination rate was decreased below and above this temperature.

Some of *in vitro* germinated seeds were transferred to pots and they survived 8 months under growth chamber conditions. Remaining germinated seeds were transferred to B₅, MS and White media to determine the *in vitro* medium for optimum development. Approximately 8 weeks later (subculturing in 4 weeks interval), development of seedlings (shoot length, shoot number, leaf number, leaf width, root length, root number) were evaluated. All of the seedlings which were transferred to White medium died one month later. MS was selected as the most proper medium for seedling development depending on a comparison with B₅ medium using morphological criteria after 8 weeks.

4 weeks old seedlings, that were developed on MS media which was determined as the optimum media for seedling development, were separated from primary roots and transferred to MS basal media with different types of cytokinin and concentrations (0.2, 0.5, 1 ve 2 mg/L BA, 0.2, 0.5, 1 ve 2 mg/L KIN and 0.001, 0.005, 0.01 and 0.02 mg/L TDZ) for axillary propagation. At the end of 4 week-period, increase in shoot number and shoot length were determined and optimum cytokinin type and concentration for axillary shoot propagation were determined. In spite of induction of axillary shoot regeneration in seedlings growing in TDZ media, the seedlings were developed in short groups having hyperhydricity (nearly in all). The highest propagation rate was obtained in the medium containing 1 mg/L BA with 14.85 shoot per explant. The highest average of the maximum shoot length

was obtained in MS media without plant growth regulators but containing 2 mg/L KIN. There was a decrease in shoot number which is negatively correlated with an increase in shoot length in MS media containing KIN and BA.

Leaves of *in vitro* germinated sterile seedlings were used as explants in direct adventitious shoot regeneration experiments. Leaves of sterile seedlings (two months old) without axillary buds were cultured in the media with or without BA (0.2, 0.5, 1 and 2 mg/L), KIN (0.2, 0.5, 1 and 2 mg/L) and TDZ (0.001, 0.005, 0.01 and 0.02 mg/L) as their abaxial sides down and contact with the medium. The highest callus formation rate was observed in the media containing TDZ. Although callus formation rates were 90 % in 0.001 mg/L TDZ, 100 % in 0.005 mg/L and 0.01 mg/L TDZ, it was decreased as 48 % in 0.02 mg/L TDZ. In BA containing media, callus formation rates were 52.5 % in 0.5 mg/L, 27.5 % in 1 mg/L BA and 35 % in 2 mg/L BA. Although the low percentage of callus formation in 0.2 mg/L BA added medium (5 %), this cytokinin type is found non-efficient for direct adventitious shoot proliferation as organogenic answer appears with only shoot buds and this case continues in the subcultures. Callus formation was also observed in media containing KIN. Callus formation rates were 5 % in 0.2 mg/L KIN, 2.5 % in 0.5 mg/L KIN, 4 % in 1 mg/L KIN and no callus formation was observed in the medium containing 2 mg/L KIN. In all concentrations, initiations of shoots (small leaf initiations) close to midrib and well developed shoots were observed at the end of sixth week. In the media having direct shoot regeneration, callus formation in explants on their surfaces having contact with the medium were observed but these calli became brownish in time and showed no activity. The highest number of shoots per explant (6.2 shoot per explant) was obtained from the medium containing 1 mg/L KIN. The highest average of maximum shoot length was also observed in this medium. Finally, it is possible to stress that medium containing 1 mg/L KIN is the best medium by obtaining maximum shoot length and highest number of shoots per explant for direct adventitious shoot regeneration with explants from *in vitro* germinated shoot leaves.

The shoots from axillary and adventitious shoot formation experiments were transferred to MS and ½ MS media containing 0.5, 1, 2 and 5 mg/L IAA, IBA, NAA

for rooting. There was no difference between MS and ½ MS media in rooting but it was very low and only 15 % of total shoots could rooted in medium containing 0.5 mg/L IBA. Rooted plantlets were gradually acclimated to the natural conditions.

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesi sırasında her aşamada yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Bengi ERDAĞ'a; tüm araştırma boyunca pek çok konuda bizi aydınlatan sayın Doç. Dr. Adnan ERDAĞ'a ve Öğr. Gör. Dr. Özkan EREN'e; çalışmamızı yürütmemiz için imkan oluşturan Biyoloji bölümüne; arazi çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Araş. Gör. Mesut KIRMACI'ya, laboratuvar çalışmaları sırasında bilgi ve yardımlarını aldığım Araş. Gör. Yelda EMEK'e, ayrıca Araş. Gör. M. Evrim Demir'e, Y.L. Öğr. Ömer YAMANER'e, Y.L. Öğr. Mithat ÇETİN'e ve tüm yüksek lisans sürem boyunca büyük bir özveri ile beni destekleyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

KAYNAKLAR

AGRAWAL, P.K., KARIHALLO, J.L., AHMED, S.M.M., GUPTA, P.C. 1973. Predicting germinability in maize, wheat and paddy on the basis of tetrazolium test. **Seed Res.** 1 :83-85.

ANDERSSON, L., MILBERG, P. and NORONHA, A.1997. Germination response of weed seeds to light, light of short duration and darkness after stratification in soil. **Swedish J. Agric.** 27: 113-120

ASHTON, P.S..1987. Biological considerations in *in situ* vs *ex situ* conservation.-In: Bramwell, D., Hamann, O., Heywood, V.& Syngé, H. (eds), Botanic Gardens and The World Conservation Strategy. **Academic Pres.** pp: 117-129.

ATALAY, İ..1994. Türkiye Vejetasyon Coğrafyası. **Ege Üniversitesi Basımevi.**

BABAOĞLU, M., GÜREL, E. ve ÖZCAN, S. 2002. Bitki Biyoteknolojisi (Doku Kültürü ve Uygulamaları). **Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya**, ISBN: 975-6652-04-7

BARNES, L.R..1979. *In vitro* propagation of watermelon. **Scientia Hort.** 11: 223-227.

BENVENUTI, S. and MACCHIA, M. 1997. Light environment, phytochrome and germination of *Datura stramonium* L. seeds. **Environmental and Experimental Botany.** 38:61-71

BEWLEY, D.J. and M. BLACK. 1986. Seed Physiology of Development and Germination. **Plenum Pres.** Newyork.

BEWLEY, J.D., BLACK, M. 1994. Seed development and maturation. In: *Seeds Physiology of Development and Germination*. **Plenum Pres.** NY. pp: 35–110

BOUAZIZ, A. and HICKS, D.R. 1990. Consumption of wheat seed reserves during germination and early growth as affected by soil water potential. **Plant Soil**. 128:161–165.

BOWES, B.G..1999. A colour atlas of plant propagation and conservation. **Manson Publishing Ltd.** London.

BRANDEL, M..2004. The role of temperature in the regulation of dormancy and germination of two related summer-annual mudflat species. **Aquatic Botany**.79: 15-32.

BROWN D.C.B., THORPE T.A. 1995. Crop improvement through tissue culture. **World J. Microb. Biotech.** 11: 409-415

CALLIHAN, R.H., PRATHER, T.S., NORTHAM, F.E. 1993. Longevity of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*) achenes in soil. **Weed Technology**.7:33-35.

CERABOLINI, B., ANDREIS, R., CERIANI, M., PIERCE, S., RAIMONDI, B. 2004. Seed germination and conservation of endangered species from Italian Alps: *Physoplexis comoso* and *Primula glaucescens*. **Biological Conservation**.117:351-356.

CLARKE, P.J., DAVISON, E.A., FULLOON, L. 2000. Germination and dormancy of grassy woodland and forest species: effects of smoke, heat, darkness and cold. **Australian Journal of Botany**. 48:687-700.

CUENCA, S., AMO- MARCO, J.B. and PARA, R. 1998. Micropropagation from inflorescence stems of the Spanish endemic plant *Centaurea paui* Loscos ex Wilk. (Compositae). **Plants Cell Reports**. 18: 674-679.

CUENCA, S., AMO- MARCO J.B. 2000. *In vitro* propagation of *Centaurea spachii* from inflorescence stems. **Plant Growth Regul.** 30:99-103

ÇELİK, M., ÇELİK, H. ve YANMAZ, R. 1995. Genel Bahçe Bitkileri. Bahçe Bitkilerinin Çoğaltılması. **Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Geliştirme Vakfı Yayınları**. No:4. 123-127 ss. Ankara

DAVIS, P.H..1975. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol: 5. **Edinburgh University Press**. I. Botany Turkey I.Title pp.489

DENSMORE, R.V..1997. Effect of Day length on germination of seeds collected in Alaska. **American Journal of Botany**. 84 (2): 274-278

DEVLİN, R..1975. Dormancy. **Plant Physiol.**, Third Edition. D. Van Nostrand Company. pp: 551-564.

DODD, G.L. and DONOVAN L.A. 1999. Water potential and ionic effects on germination and seedling growth of two cold desert shrubs. **Am. J. Bot.** 86: 1146–1153.

EKİM, T., KOYUNCU, M., VURAL, M., DUMAN, H., AYTAÇ, Z., ADIGÜZEL, N. 2000. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler). **Türkiye Tabiatını Koruma Derneği**, Ankara ISBN: 975-93611-0-8.

ERDAĞ, B., EMEK Y. 2005. *In vitro* micropropagation of *Anthemis xylopoda* O. Schwarz, a critically endangered species from Turkey. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. 8 (5): 691-695.

ERDAĞ, B., EMEK Y. 2005. *In vitro* adventitious shoot regeneration of *Liquidambar orientalis* Miller. **Journal of Biological Sciences**. 5(6): 805-808.

ERİK, S., TARIKAHYA, B. 2004. Türkiye Florası Üzerine. **Kebikeç**. 17: 139-163.

FAY, M.F., MUIR, H.J. 1990. The role of micropropagation in the conservation of European plants. In: Hernandez Bermejo, J. E., Clemente, M., Haywood, V. (Eds.). Conservation Techniques in Botanic Gardens. **Koeltz Scientific Books. Koenigstein**. pp: 27-32.

FAY, M..1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant** 28:1-4.

FAY, M..1994. In what situation is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? **Biodiv Conserv**. 3: 176-183

FENNER, M..1985. Seed Ecology. **Chapman and Hall**. London.

FONNESBACH, A. and FONNESBACH, M.1980. *In vitro* propagation of *Monstera deliciosa*. **Hort. Sci**. 15(6): 740-741.

FRANKLIN, C.I. and DIXON, R.A.1994. Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures. **Oxford University Pres**. Oxford. UK.

GAMBORG, O. L., MILLER, R. A., OJIMA, K. 1968. Nutrition requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exp. Cell Res.**, 50: 151-159.

GAMBORG, O.L. and PHILLIPS, G.C. 1995. Laboratory facilities, operation, and management.(in GAMBORG, O.L. and PHILLIPS, G.C. ed.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Fundamntal Methods, **Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.**

GEMİCİ, Y., SEÇMEN, Ö., EKİM, T., LEBLEBİCİ, E. 1992. Türkiye’de Endemizm ve İzmir Yöresinin Bazı Endemikleri. **Ege Coğrafya Dergisi.** 6:61-84.

GEORGE, E.F..1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Part I. The Technology, Second Edition, **Exegetics Ltd.,** England

GREUTER, W..1979. Mediterranean Conservation as Wieved by Plant Taxonomist, **Webbia**, 34 (1): 88-99. (Translated by A. Baytop).

GÜNAY, A..1992. Genel Sebze Yetiştiriciliği. Cilt 1. **Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi**, Ankara.

HAMMATT, N. and EVANS, P.K. 1985.The *in vitro* propagation of an endangered species: *Centaurea junoniana* Svent. (Compositae). **J Hort Sci.** 60: 93-97

HARPER, J.L., LOVEL, P.H., MOORE, K.G. 1970. The shapes and sizes of seeds. **Annual Review of Ecology and Systematics** 1: 327-356.

HARTMAN, H.T. and KESTLER, D.E. 1983. Techniques of propagation by seeds. Plant propagation principles and practies. **Prentice-Hall, Inc.** pp: 162-170, New Jersey.

HUETTEMAN, C.A., PREECE, J.E. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 33: 105-119.

IRIONDO J.M. and PEREZ C. 1990. Application of *in vitro* culture techniques to the conservation of Iberian endemic endangered plant species. **Bot. Gard. Microprop. News.** 1: 4-6

IRIONDO J.M. and PEREZ C. 1996. Micropropagation and *in vitro* strage of *Centaureum rigualii* Esteve (gentianaceae). **Israel J Plant Sci.** 44: 115-123

KAIRONG, C., XING G.S., LIU X.M., WANG, Y.F. 1999. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. **Plant Science.** 146: 9-16.

KAŞKA, N. ve YILMAZ, M. 1974. Bahçe Bitkileri Yetiştiriciliği Teknikleri. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Adana.

KAUFFMAN, M.R..1969. Effects of water potential of germination of lettuce, sunflower and citrus seeds. **Canadian Journal of Botany.** 49: 410-515.

KERMODE A.R..1990. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. **Crit Rev Plant Sci.** 9 :155–195.

KHAN, A.A..1977. The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination. **Elsevier/** North Holland, New York/ Amsterdam.

KHAN, M. A. and GULZAR, S. 2003. Light, salinity and temperature effects on the seed germination of perennial grasses, **American Journal of Botany.** 90: 131-134.

KROGSTRUP, P., BADURSSON, S. and NORGAARD J.V. 1992. *Ex situ* genetic conservation by use of tissue culture. **Opera Bot.** 113: 49-53

LEINONEN, K. and CAHANTAL, M. 1998. Regulation of *Picea abies* seed dormancy by red and far-red light at various moisture contents. **Scand. J. For. Res.**13: 43-49

LIN, C.C and KAO, C. H. 1995. NaCl stress in rice seedlings: starch mobilization and the influence of gibberellic acid on seedling growth. **Bot. Bull. Acad. Sin.** 36: 169–173.

LU, C.Y..1993. The use of thidiazuron in tissue culture. *In vitro* **Cell Dev. Biol.** 29: 92-96.

MADDOX, D.M., JOLEY, D.B., SUPKOFF, D.M., and MAYFIELD, A. 1996. Pollination biology of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*) in California. **Canadian Journal of Botany.**74:262-267.

MARTINEZ- GHERSA, M. A., SATORRE, E. H. and GHERSA, C.M. 2000. Effect of soil water content and temperature on dormancy breaking and germination of three weeds. **Weed Science.** 45: 791- 797.

MAUNDER, M..1992. Plant reintroduction: an overview. **Biodiver, Conserv.** 1: 51-61.

MAYER, A.M. and POLJAKOFF- MAYBER, A. 1989. The Germination of Seeds. **Pergamon Pres.**

MENGES, E.S..1986. Predicting the future of rare plant populations: Demographic monitoring and modelling. **Natural Areas Journal.** 6,13–25.

MEYER, S. E., MONSEN, S.B. 1991. Habitat correlated variation in mountain big sage brush (*Artemisia tridentata* ssp. *vaseyana*) seed germination patterns. **Ecology.**72, 739-742.

MURASHIGE, T., SKOOG S, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**. 15: 437-497.

NAVARRO, L., GUITIAN, J. 2003. Seed germination and seedling survival of two threatened endemic species of the northwest Iberian peninsula. **Biological Conservation**. 109 (2003) 313-320.

NORANHA, A., L. ANDERSSON and MILBERG, P.1997. Rate of change in dormancy level and light requirement in weed seeds during stratification. **Annals of Botany**. 80: 795-801.

ÖZEL, Ç.A..2002. *Centaurea tchihatcheffi*'nin *in vitro* Çoğaltımı. Gazi Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.Yüksek Lisans Tezi. 68 s.

PADILLA, I.M.G. and ENCINA C.L. 2002. *In vitro* germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) seeds. **Scientia Horticulturae** .97: 219-227.

PEVALEK- KOZLINA, B. 1998. *In vitro* germination of *Centaurea ragusina* L., a croatian endemic species. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**. 40:21-24

PHILIPS, C., G. and HUBSTENBENGER, J. F. 1995. Micropropagation by proliferation of axillary buds. Section 2. Chapter 4.pp.45-47 - IN: Plant Cell, tissue and Organ Culture Fundamental Methods. Gamborg, O. L., Philips, G. C. (Eds)

PLUMMER, J.A., BELL D.T. 1997. The effect of temperature, light and gibberellic acid (GA₃) on germination of Australian everlasting daisies (Asteraceae, Tribe Inuleae). **Australian Journal of Botany**. 43: 93-102.

PONS, T.L..1992. Seed responses to light. In: Fenner, M. (Ed.), Seeds: The ecology of regeneration in Plant Communities. **CAB International**. Wallingford. Uk. pp. 259-284

PRAKASH, L and PRATHAPASENAN, G. 1988. Putrescine reduces NaCl induced inhibition of germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). **Aust. J. Plant Physiol.** 15: 761–767.

RAMAGOPAL, S..1990 Inhibition of seed germination by salt and its subsequent effect on embryonic protein synthesis in barley. **J. Plant Physiol.** 136: 621–625.

RUFFONI, B. and MASSABO, F. 1991. Tissue culture in *Gerbera jamesonii* hybrida. **Acta Horti.** 289: 147-148.

SCHÜTZ, W., MILBERG, P. 1997. Seed dormancy in *Carex canescens*. Regional differences and ecological consequences. **Oikos.** 78: 420-428.

SINGH, S.K. and SYAMAL, M. M. 2001. A short pre-culture soak in thidiazuron or forchlorfenuron improves axillary shoot proliferation in rose micropropagation. **Scientia Horticulturae.** 91: 169-177.

SMITH, R..1992. Plant tissue culture techniques and experiments. pp. 1-27. **Academic Press Inc.** UK

STEBBINS, G.L..1971. Adaptive radiation of reproductive characteristics of Angiosperms II. Seeds and seedlings. **Annual Review of Ecology and Systematics** 2: 237-260.

TAKASHI., H. and DAISUKA, K. 1997. Micropropagation of *Centaurea macrocephala* Pushk. EX. Wild. By shoot axis splitting. **Hort Sci.** 32(6), 1124-1125

TOBE, K., X. M. LI and OMASA., K. 2000. Seed germination and radicle growth of a halophyte, *Klidium caspicum* (Chenopodiaceae). **Annals of Botany.** 85: (3) 391-396.

WHITE, P..1963. The cultivation of animal and plant cells. **Ronald**. New York.

WILLIS, A.J., GROVES, R. H. 1991. Temperature and light effects on the germination of seven native forbs. **Australian Journal of Botany**.39: 219-228