



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BİY- DR- 2010- 0001

Rhaponticoides mykalea (Hub.-Mor.) M. V. Agab. &
Greuter'NİN *IN VITRO* KOŞULLARDA
ÇOĞALTILMASI VE BU SÜREÇLERE ETKİ EDEN
FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI

Yelda EMEK

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Bengi ERDAĞ

AYDIN-2010

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BİY- DR- 2010- 0001

Rhaponticoides mykalea (Hub.-Mor.) M. V. Agab. &
Greuter'NİN *IN VITRO* KOŞULLARDA
ÇOĞALTILMASI VE BU SÜREÇLERE ETKİ EDEN
FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI

Yelda EMEK

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Bengi ERDAĞ

AYDIN-2010

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
İNTİHAL BEYAN SAYFASI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ.....	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1 Materyal.....	21
3.2 Yöntem.....	23
3.2.1 Bitkinin Yayılışı, Habitat Gözlemleri ve Tehdit Unsurlarının Belirlenmesi Amacı ile Gerçekleştirilen Çalışmalar.....	23
3.2.1.1 Bitkinin Yayılışı ve Habitat Gözlemleri.....	23
3.2.1.2 Kapituluların Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi.....	26
3.2.1.3 İnsektisit Uygulaması.....	27
3.2.2 <i>In vitro</i> Çoğaltım Çalışmaları.....	29
3.2.2.1 <i>In vitro</i> Çimlenme.....	29
3.2.2.1.1 Tohum Canlılık Testi.....	29
3.2.2.1.2 <i>In vitro</i> Çimlenme Denemeleri İçin Yapılan Ön Hazırlıklar.....	31
3.2.2.1.3 <i>In vitro</i> Çimlenmeyi Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesi Denemeleri.....	38
3.2.2.1.3.1 <i>In vitro</i> Ortamların Etkisi.....	38
3.2.2.1.3.2 Tohum Dormansisinin Kırılmasına Yönelik Gerçekleştirilen Çalışmalar.....	39
3.2.2.1.3.3 Işığın Etkisi.....	40
3.2.2.1.3.4 Farklı pH Değerlerinin Etkisi.....	41
3.2.2.1.3.5 Sıcaklığın Etkisi.....	41
3.2.2.2 Embriyo Kültürü Çalışmaları.....	42
3.2.2.2.1 Embriyo Kültürü İçin Kullanılan Ortamlar ve Kültür Koşulları.....	43
3.2.2.3 Somatik Embriyogenez Çalışmaları.....	45

3.2.2.4 Aksiller Sürgün Çoğaltımı Denemeleri.....	47
3.2.2.5 Adventif Sürgün Teşviki Denemeleri.....	48
3.2.3 Antioksidan Enzim Aktiviteleri Belirleme Çalışmaları.....	51
3.2.3.1 Enzim Ekstraksiyonu ve Çözülebilir Protein Miktarının Belirlenmesi.....	51
3.2.3.2 Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	52
3.2.3.3 Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	52
3.2.3.4 Katalaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	53
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	54
4.1 Bitkinin Yayılışı ve Habitat Gözlemleri.....	54
4.1.1 Kapitulularla İlgili Gözlemler.....	61
4.1.2 İnsektisit Uygulaması.....	66
4.2 <i>In Vitro</i> Çoğaltım Çalışmaları.....	68
4.2.1 <i>In Vitro</i> Çimlenme.....	68
4.2.1.1 Tohum Canlılık Testi.....	68
4.2.1.2 Tohumların Sterilizasyonu.....	69
4.2.1.3 Saksıda Gerçekleştirilen Çimlenme Denemeleri.....	71
4.2.1.4 <i>In vitro</i> Çimlenmeyi Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesi.....	72
4.2.2 Embriyo Kültürü.....	80
4.2.3 Somatik Embriyogenez.....	89
4.2.4 Aksiller Sürgün Çoğaltımı.....	95
4.2.5 Adventif Sürgün Teşviki.....	100
4.3 Antioksidan Enzim Aktiviteleri İle İlgili Sonuçlar.....	109
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	118
KAYNAKLAR.....	121
ÖZGEÇMİŞ.....	138

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Ana Bilim Dalı *Doktora* Programı öğrencisi Yelda (ÇALMAZ) EMEK tarafından hazırlanan ‘*Rhaponticoides mykalea* (Hub.-Mor.) M. V. Agab. & Greuter’nın *in vitro* koşullarda çoğaltılması ve bu süreçlere etki eden faktörlerin araştırılması’ başlıklı tez, 05.03.2010 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :	Prof. Dr. Avni GÜVEN	Ege Üniv. Fen Fakültesi
Üye :	Doç. Dr. Gonca Günver DALKILIÇ	ADU, Ziraat Fakültesi
Üye :	Yrd. Doç. Dr. Bengi ERDAĞ	ADU, FEF
Üye :	Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN	ADU, FEF
Üye :	Yrd. Doç. Dr. Lale Yıldız AKTAŞ	Ege Üniv. Fen Fakültesi

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulununsayılı kararıyla (.....) tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ

Enstitü Müdürü

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Adı Soyadı : Yelda (ÇALMAZ) EMEK

İmza :

ÖZET

Doktora Tezi

***Rhaponticoides mykalea* (Hub.-Mor.) M. V. Agab. & Greuter’NIN *IN VITRO* KOŞULLARDA ÇOĞALTILMASI VE BU SÜREÇLERE ETKİ EDEN FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI**

Yelda (ÇALMAZ) EMEK

Adnan Menderes Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Bengi ERDAĞ

Bu çalışmada, kritik tehlike altında (CR) katagorisindeki endemik bitki *Rhaponticoides mykalea* (Hub.-Mor.) türünü tehdit eden faktörler belirlenerek, *in vitro* doku kültürü teknikleri ile çoğaltımı sırasında aşılması gereken süreçler ve bu süreçleri etkileyen antioksidan enzimlerdeki değişimler araştırılmıştır.

Öncelikle bitki tohumlarının çimlenmesini etkileyen etmenler araştırılmıştır. Bu kapsamda, 8 ay bekletilen tohumların *in vitro* koşullarda, pH’ı 7.5’e ayarlanmış distile suda ve 18 °C’ta en yüksek çimlenme yüzdesine (% 30) ulaştığı saptanmıştır.

Olgun ve olgunlaşmamış zigotik embriyoların eksplant olarak kullanılmasıyla embriyo kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Olgun zigotik embriyolardan 0.01 mg/L Thidiazuron (TDZ) ilaveli Murashige ve Skoog (MS) ortamında fidecikler elde edilmiştir (% 63.33).

Olgunlaşmamış zigotik embriyoların eksplant olarak kullanılmasıyla somatik embriyogenez çalışmaları gerçekleştirilmiştir. En yüksek oranda kallus oluşumu 0.25 mg/L α -naftalen asetik asit (NAA) ve 1 mg/L ⁶N-Benzil adenin (BA) ilaveli MS ortamında elde edilmiştir (% 75). 0.1 mg/L BA ve % 6 sukroz ilaveli MS ortamında en yüksek oranda embriyo farklılaşması görülmüştür (19.25 somatik embriyo/kallus). Yüksek sukrozlu MS ortamında (% 12) farklılaşan ve gelişen embriyolar bitkiciğe dönüştürülmüşlerdir (% 15.75).

Embriyo kültürü çalışmalarından elde edilen bitkicikler aksiller sürgün çoğaltımı sağlamak için kullanılmıştır. En yüksek aksiller sürgün sayısı 0.5 mg/L BA ilaveli MS ortamında elde edilmiştir (5.8 sürgün/eksplant). 0.1 mg/L Kinetin (KIN) ilaveli MS ortamı maksimum sürgün uzunluğu için en uygun ortam olarak belirlenmiştir (7.35 cm).

Adventif sürgün çoğaltımı denemeleri için doğadan toplanan yapraklar eksplant olarak kullanılmıştır. 1.0 mg/L NAA ilaveli MS ortamında en yüksek kalluslaşma yüzdesi elde edilmiştir (%75). Kalluslardan en yüksek sürgün rejenerasyonu 0.5 mg/L NAA ve 2 mg/L BA ilaveli MS ortamında elde edilmiştir (4.2 sürgün/kallus). En uzun sürgünler 0.1 mg/L NAA ve 4 mg/L BA ilaveli MS ortamında oluşmuştur (6.3 cm).

Aksiller ve adventif sürgün çoğaltımı sonunda elde edilen sürgünler köklendirilerek kademeli bir şekilde dış ortama aktarılmıştır. Her iki denemede de optimum köklenme konsantrasyonu ½ MS+ 0.5 mg/L İndol-3-butirik asit (IBA) olarak belirlenmiştir.

Diğer yandan, organogenez ve somatik embriyogenez süreçleri boyunca süperoksitdismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve peroksidaz (PO) gibi antioksidan enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Organogenez sürecinde, yaprak eksplantlarından kallus oluşumu sırasında, SOD aktivitesi dereceli bir şekilde artmış ve kalluslardan sürgün rejenerasyonu sırasında ise bu enzim etkinliğinde kademeli bir azalma gözlenmiştir. Kültürün ilk haftasında PO aktivitesi, CAT aktivitesine göre daha yüksek bir değere sahiptir. Kallus oluşumu süreci boyunca her iki enzim aktivitesi de azalmıştır. Adventif sürgün oluşumuna bağlı olarak CAT ve PO aktiviteleri de artmıştır.

Somatik embriyogenezin erken safhası embriyogenik kallus oluşumu sırasında SOD aktivitesi dereceli bir şekilde artmıştır. Kalluslarda globular oluşumlar meydana gelince, SOD aktivitesi de dereceli bir şekilde azalmaya başlamıştır. Embriyo farklılaşma oranının artışıyla SOD aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Kültürün ilk haftasında CAT aktivitesi, PO aktivitesine göre daha yüksek bir değere sahiptir. Embriyogenik kallus oluşumu boyunca ise her iki enzim aktivitesinde de dereceli bir şekilde düşüş gözlenmiştir. Embriyogenez süreçlerinden olan globular yapıların oluşması ve somatik embriyo farklılaşması sırasında ise hem PO hemde CAT enzim aktivitelerinde artış gözlenmiştir.

2010, 140 sayfa

Anahtar Sözcükler

R. mykalea, CR endemik bitki, *in vitro*, aksiller sürgün, adventif sürgün, embriyo kültürü, somatik embriyogenez, antioksidan enzimler

ABSTRACT

Ph.D Thesis

PROPAGATION OF *Rhaponticoides mykalea* (Hub.-Mor.) M. V. Agab. & Greuter IN *IN VITRO* CONDITIONS AND INVESTIGATION OF THE FACTORS AFFECTING THESE PROCESSES

Yelda (ÇALMAZ) EMEK

Adnan Menderes University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assistant Professor Dr. Bengi ERDAĞ

In this study, the factors have been determined which threatened *Rhaponticoides mykalea* (Hub.-Mor.) species in the under critical danger (CR); processes to be exceeded during propagation with *in vitro* tissue culture techniques and changes in antioxidan enzymes which effect these processes have been investigated.

First, the factors which have effect on germination of seeds have been researched. In the experiments of *in vitro* seed germination, seeds after 8 month keeping period were cultured on distilled water medium adjusted to 7.5 pH and have been cultured in 18 °C. In this experiments maximum germination percentage (30 %) has been obtained.

Mature and immature zygotic embryos have been used as explant for embryo culture experiments. As a result, seedlings have been obtained from mature zygotic embryos on the 0.01 mg/L Thidiazuron (TDZ) added Murashige and Skoog (MS) medium (63.33 %).

Immature zygotic embryos have been used as explant for somatic embryogenesis experiments. The highest callus formation rate has been obtained in 0.25 mg/L α -naphthaleneacetic acid (NAA) and 1 mg/L ⁶N-benzyl adenine (BA) added MS medium (75 %). The highest embryo differantiation has been obtained in 0.1 mg/L BA and 6 % sucrose added MS medium (19.25 somatic embryo/callus). Somatic embryos differantiated and developed in MS medium with high sucrose (12 %) have been converted to plantlets (15.75 %).

The shoots were obtained from embryo culture experiments have been used for axillary shoot propagation experiments. The highest axillary shoot number has been obtained in 0.5 mg/L BA added MS medium (5.8 shoot/explant). 0.1 mg/L Kinetin

(KIN) added MS medium was determined as the the most suitable medium for the maximum shoot length (7.35 cm).

The leaves which were collected from nature were used as explant for adventitious shoot propagation experiments. The highest callusing percentage has been obtained in the 1.0 mg/L NAA added MS medium (75 %). The highest shoot formation from calli has been obtained in 0.5 mg/L NAA and 2 mg/L BA added medium (4.2 shoot/callus). The longest shoots were formed in 0.1 mg/L NAA and 4 mg/L BA added medium (6.3 cm).

The shoots obtained at the end of axillary and adventitious shoot multiplication were rooted and transferred to external environment step by step. The optimum rooting concentration was $\frac{1}{2}$ MS+ 0.5mg/L Indole-3-butyric acid (IBA) in each experiment.

Besides, antioxidan enzyme activities such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) have been determined during the organogenesis and somatic embryogenesis processes. During the callus formation from leaf explants in organogenesis process, SOD activity have been increased gradually, and a graded decrease has been observed during the shoot regeneration from callus. First week of culture, PO activity is higher than CAT activity. Both enzyme activities have been decreased during the callus formation process. CAT and PO activities have been increased dependent on the adventitious shoot formation.

The activities of SOD increased gradually during the embryogenic callus formation which is the early phase of somatic embryogenesis. The activities of SOD began to decline step by step when the globular structures occurred on calli. It has been observed that SOD activity has been decreased because of the embryo differentiation increase. First week of culture, CAT activity was higher than PO activity. A graded decrease of both enzyme activities has been observed during the the embryogenic callus formation. It has been observed that both PO and CAT activity have been increased during the globular structure formation which is the phase of embryogenesis process and somatic embryo differentiation.

2010, 140 pages

Key Words

R.mykalea, CR endemic plant, *in vitro*, axillary shoot, adventitious shoot, embryo culture, somatic embryogenesis, antioxidan enzymes

ÖNSÖZ

Ülkemiz florası nadir endemiklerinden biri olan ve Aydın, Isparta ve Muğla yörelerinde oldukça sınırlı sayıda birey ile temsil edilen kritik tehlike kategorisindeki *R. mykalea* güçlü bir antropojenik baskı altındadır. Bu durum zaten potansiyel olarak yok olma tehlikesi altında bulunan türün devamını iyice kısıtlamaktadır. Tür ile ilgili olarak yapılan çalışmalar sistematik düzeyde sınırlı kalmış ve türün korunmasına ve üretilmesine yönelik şimdiye kadar herhangi bir literatürde belirlenmemiştir. Çalışma, *R. mykalea* ile ilgili olarak bu anlamda gerçekleştirilen ilk çalışma niteliği taşımaktadır. Çalışmamızda *R. mykalea*'nın tohum çimlenme özelliklerinin belirlenmesi, *in vitro* çoğaltılması ve korunmasına yönelik olarak bir prosedür geliştirilmesinin yanı sıra, bu süreçleri etkileyen faktörler saptanmıştır. *In vitro* teknikler ile çok sayıda bitki elde edilmesi, büyük ölçüde yok olma riskini taşıyan bitkiler için alternatif bir üretim yöntemi olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca, türün *in vitro* teknikler kullanılarak üretilmesi çalışmaları sırasında gerçekleştirilen antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi, *in vitro* çoğaltım süreçleri sırasında gerçekleşen biyokimyasal olaylara ışık tutması açısından da önem taşımaktadır.

Çalışmanın her aşamasında bilgi birikimi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, ilgisini ve desteğini her zaman hissettiğim danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Bengi ERDAĞ'a; araştırmalarımız sırasında birçok konuda derin bilgilerinden faydalandığım hocam Sayın Prof. Dr. Adnan ERDAĞ'a; türün tanımlanmasında yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Özkan EREN'e; antioksidan enzim aktivitelerini belirleme çalışmalarımda değerli zamanını bize ayırarak bilgileriyle yardımcı olan sayın Yrd. Doç. Dr. Lale Yıldız AKTAŞ'a, tez süresi boyunca desteklerini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Avni GÜVEN'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN'e; ayrıca tezin gerçekleştirilmesi için FEF-07012 no'lu proje kapsamında finansal destekte bulunan ADÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine; olanakların tümünden etkin bir biçimde yararlanma imkanı veren Biyoloji Bölümü'ne, tüm arazi çalışmalarım sırasında beni yalnız bırakmayan ve her daim desteği ile yanımda olan eşim Faruk Akın EMEK'e; laboratuvar çalışmalarımda yardımlarından dolayı Feride ÇALMAZ'a; Gülnur TEKMEK'e ve kızım Nehir ile aileme içten teşekkürleri bir borç bilirim.

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

ANOVA	Varyans analizi
AOS	Aktif oksijen türleri
BA	⁶ N-Benzil adenin
BSA	Bovine Serum Albumin
B5	B5 besi ortamı
CAT	Katalaz
CR	Kritik tehlikede (critally endangered)
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
DAB	Diamin obenzidin tetrahidroklorit
EN	Tehlikede (endangered)
EtOH	Etil alkol
G	Gram
g/L	gram/litre
GA₃	Gibberellik asit
H₂SO₄	Sülfürik asit
IAA	İndol-3-asetik asit
IBA	İndol-3-butirik asit
ISTA	The International Seed Testing Association (Uluslararası Tohum Test Birliği)
IUCN	International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (Uluslararası Doğa Koruma Birliği)
KIN	Kinetin
KNO₃	Potasyum nitrat
L	Litre
LR	Düşük risk altında (lower risk)
µM	Mikromol
mg/L	Miligram/litre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimol
MS	Murashige and Skoog, 1962
NAA	Naftalen asetik asit
NaOCl	Sodyum Hipoklorit
NTB	Nitrotetrazolium blue
PDA	Patates Dekstroz Agar
PMSF	Phenyl methyl sulfonyl fluoride
PO	Peroksidaz
PVP	Polyclar AT
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksitdismutaz
TDZ	Thidiazuron
TTC	Trifenil tetrazolium klorür

VU	Zarar görebilir (vulnerable)
WH	White besi ortamı
WWF	Dünya Yaban Hayatı Koruma Fonu
w/v	Ağırlık/hacim

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	<i>R.mykalea</i> 'nın doğal habitatının genel bir görüntüsü.....	22
Şekil 3.2.	Yol kenarında yayılış gösteren bitkilerin görüntüsü.....	24
Şekil 3.3.	Tam ve bipinnat yapraklar ile vejetatif gelişme dönemi başlangıcında <i>R.mykalea</i> 'nın görünümü.....	24
Şekil 3.4.	Vejetatif dönemde bitkinin görünümü.....	25
Şekil 3.5.	Çiçeklenme dönemindeki henüz açmamış kapituluların görüntüsü.....	25
Şekil 3.6.	<i>R. mykalea</i> 'nın çiçeklerinin genel görüntüsü.....	26
Şekil 3.7.	Anthezis öncesi insektisit uygulanan bitki.....	28
Şekil 3.8.	Anthezisten sonra insektisit uygulanan bitki.....	28
Şekil 3.9.	<i>R. mykalea</i> 'nın kuru kapitulularının görüntüsü.....	30
Şekil 3.10.	Kuru kapituludan çıkarılan olgun bir akenin görüntüsü.....	30
Şekil 3.11.	Çimlenme için hazırlanan kağıt köprülü kavanoz.....	32
Şekil 3.12.	Çimlenme için hazırlanan bilyeli kağıt köprülü kavanoz.....	33
Şekil 3.13.	Çimlenme için hazırlanan kağıt köprülü-bilyeli dar uzun kavanoz.....	33
Şekil 4.1.	<i>R. mykalea</i> 'nın tip lokalitesi görüntüsü (2007).....	54
Şekil 4.2.	Yaylaköy lokalitesinde sulama havuzu görüntüsü.....	56
Şekil 4.3.	Su kanalı ve sulama havuzu yapma amacıyla yakılmış otlar.....	56
Şekil 4.4.	Su kanalı açmak için sürülen ve kazılan arazi.....	57
Şekil 4.5.	Dikenli telle çevrelenmiş arazi görüntüsü.....	57
Şekil 4.6.	Dikenli telle çevrilmiş alanda <i>R. mykalea</i> yoğun popülasyonunun görüntüsü...58	
Şekil 4.7.	Kapituluları hasat edilmiş bitkilerin görünümü.....	59
Şekil 4.8.	Türün yayılış gösterdiği korunmuş alanın hemen yanında inşaat yapımı.....	60
Şekil 4.9.	2009 yılında <i>R. mykalea</i> 'nın tip lokalitesinin görünümü.....	60
Şekil 4.10.	Buğday tarlası arasında yer alan bireyler.....	61
Şekil 4.11.	Böcekler tarafından tahribata uğratılmış olgun akenler.....	62
Şekil 4.12.	Bir böcek larvası tarafından zarar verilmiş akenler.....	62
Şekil 4.13.	Anthezis döneminde çiçek ve çiçek üzerindeki böceklerin görünümü.....	64
Şekil 4.14.	Anthezis döneminde bir çiçek görüntüsü.....	64
Şekil 4.15.	Henüz döllenme olmamış çiçekte korolla tüpü boyunca böcek görüntüsü.....	65
Şekil 4.16.	Tetrazolium testi sonucunda tam boyanmış bir embriyo görüntüsü.....	69
Şekil 4.17.	Toprakta çimlenmiş bitkicikler.....	71

Şekil 4.18. Farklı <i>in vitro</i> ortamlarda tohum çimlenme yüzdeleri (8 ay saklama sonrası)...	73
Şekil 4.19. Distile suda <i>in vitro</i> olarak çimlenmiş bir bitkiciğin görünümü.....	73
Şekil 4.20. <i>R.mykalea</i> tohumlarının çimlenmesi üzerine GA ₃ ve KIN'in etkisi.....	74
Şekil 4.21. <i>R.mykalea</i> tohumlarının çimlenmesi üzerine pH'ın etkisi.....	77
Şekil 4.22. <i>R. mykalea</i> tohumlarının çimlenmesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	78
Şekil 4.23. <i>R. mykalea</i> kapitulumlarının döllenmeden sonraki morfolojik değişimleri.....	80
Şekil 4.24. Kapitulumların içerdiği farklı gelişme aşamalarındaki aken tipleri.....	80
Şekil 4.25. Gelişimsel dönemine göre akenlerden izole edilen zigotik embriyoların kalluslaşma oranı.....	82
Şekil 4.26. 1 mg/L BA ilaveli MS ortamında b tipi akenlerden izole edilen embriyolardan elde edilen sarımsı yeşil-kırılgan kalluslar.....	85
Şekil 4.27. c-tipi akenlerden izole edilen embriyolardan kahverengi-kompakt yapıda kallus.....	85
Şekil 4.28. e-tipi akenlerden izole edilmiş 0.01 mg/L TDZ ilaveli MS ortamında çimlenmiş 6 haftalık bitkicik.....	87
Şekil 4.29. Kökü olmayan bir bitkicik.....	88
Şekil 4.30. Kotiledonlarında yaralanmalar oluşmuş bitkicikler.....	89
Şekil 4.31. <i>R.mykalea</i> 'nın olgunlaşmamış zigotik embriyolarından somatik embriyogenez süreçleri.....	93
Şekil 4.32. 0.5 mg/L BA ilaveli MS ortamında gelişen aksiller sürgünler.....	95
Şekil 4.33. Aksiller sürgün çoğaltımı üzerine sitokinin etkisi.....	96
Şekil 4.34. Sitokinin tipi ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişen aksiller sürgün boyları.....	97
Şekil 4.35. Aksiller sürgün çoğaltımı yolu ile elde edilen sürgünlerin köklenmesi üzerine MS ve ½ MS ortamlarına ilave edilmiş oksinlerin etkisi.....	98
Şekil 4.36. ½ MS + 0.5 mg/L IBA'da köklenmiş bitki.....	98
Şekil 4.37. Dış ortama alıştırılmış bir bitkicik.....	99
Şekil 4.38. <i>R.mykalea</i> 'nın yaprak eksplantları kenarlarında 1 mg/L NAA ilaveli MS ortamında kallus oluşumu.....	103
Şekil 4.39. 1 mg/L NAA ilaveli MS ortamında oluşan kallus görüntüsü.....	103
Şekil 4.40. <i>R. mykalea</i> 'nın yaprak kalluslarından adventif sürgün oluşumu üzerine NAA, BA ve kombinasyonlarının etkisi.....	105
Şekil 4.41. 0.5 mg/L NAA ve 2 mg/L BA ilaveli MS ortamında adventif sürgün rejenerasyonu.....	106
Şekil 4.42. Adventif sürgün uzunluğu üzerine NAA, BA ve NAA:BA	

	kombinasyonunun etkisi.....	107
Şekil 4.43.	Adventif sürgünlerin köklenmesi üzerine oksinlerin etkisi.....	107
Şekil 4.44.	½ MS + 0.5 mg/L IBA'da köklendirilmiş bitkicik.....	108
Şekil 4.45.	<i>R. mykalea</i> 'nın organogenez sürecinde SOD aktivite değişimi.....	109
Şekil 4.46.	<i>R. mykalea</i> 'nın organogenez sürecinde CAT aktivite değişimi.....	110
Şekil 4.47.	<i>R. mykalea</i> 'nın organogenez sürecinde PO aktivite değişimi.....	110
Şekil 4.48.	<i>R. mykalea</i> 'nın somatik embriyogenez sürecinde SOD aktivite değişimi.....	111
Şekil 4.49.	<i>R. mykalea</i> 'nın somatik embriyogenez sürecinde CAT aktivite değişimi.....	112
Şekil 4.50.	<i>R. mykalea</i> 'nın somatik embriyogenez sürecinde PO aktivite değişimi.....	112

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Çimlenme denemelerinde kullanılan ortamların temel elementleri ve miktarları.....	36
Çizelge 3.2.	Embriyo kültürü denemelerinde eksplantlara uygulanan sterilizasyon serileri.....	44
Çizelge 3.3.	Yaprak eksplantları sterilizasyonu için uygulanan sterilizasyon işlemleri.....	49
Çizelge 4.1.	Olgun kapitulumdan çıkarılan akenlerin değerlendirilmesi.....	63
Çizelge 4.2.	Tohumların sterilizasyonu üzerine NaOCl süresinin etkisi.....	70
Çizelge 4.3.	Tohumlara uygulanan farklı fungusid sürelerinin steril kültür üzerine etkisi.....	70
Çizelge 4.4.	Embriyo kültürü denemelerinde eksplantlara uygulanan sterilizasyon serileri ve alınan tepkiler.....	81
Çizelge 4.5.	Olgunlaşmamış zigotik embriyolardan (a ve b tipi) kallus oluşumu üzerine farklı sitokinlerin etkisi.....	83
Çizelge 4.6.	e-tipi akenlerden izole edilen embriyoların çimlenme yüzdeleri.....	87
Çizelge 4.7.	Olgunlaşmamış zigotik embriyolardan (a ve b tipi) kallus oluşumu üzerine bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi.....	89
Çizelge 4.8.	Olgunlaşmamış zigotik embriyolardan elde edilen embriyogenik kalluslarda somatik embriyo farklılaşması üzerine BA'nın etkisi.....	93
Çizelge 4.9.	0.1 mg/L BA ilaveli MS ortamında somatik embriyo farklılaşması üzerine sukrozun etkisi.....	94
Çizelge 4.10.	0.1 mg/L BA ilaveli farklı sukroz konsantrasyonlarında farklılaşan ve olgunlaşan embriyoların %3 sukroz ilaveli MS ortamlarında bitkiciğe dönüşümü.....	94
Çizelge 4.11.	Farklı sterilizasyon sürelerinin yaprak eksplantlarının sterilizasyonu üzerine etkisi.....	101
Çizelge 4.12.	Farklı tip ve miktarlarda bitki büyüme düzenleyicisi içeren MS ortamında <i>R.mykalea</i> 'nın yaprak eksplantlarından kallus oluşum miktarları.....	102

1. GİRİŞ

Biyolojik çeşitlilik, dünyada yaşayan canlıların ve yaşam şekillerinin çeşitliliği anlamına gelir ve bir bölgedeki canlı türleri, tür içindeki farklılıklar ve değişik yaşam şekilleri, o bölgenin biyolojik çeşitliliğini oluşturur (Kocataş, 2006).

Biyolojik çeşitlilik, dünyada homojen bir dağılım göstermemektedir. Gelişmiş ülkelerin bulunduğu kuzey yarıküre biyolojik zenginlik bakımından fakir, gelişmekte olan ülkelerin yer aldığı güney yarı küre ise zengindir; dolayısıyla biyolojik çeşitlilik kuzeyden güneye ve batıdan doğuya doğru artış göstermektedir. Ülkemiz, kuzey ile güney, batı ile doğu arasındaki geçiş noktası olarak üç farklı biyocoğrafik alanı birleştiren ve geçiş ormanları ile birlikte, Avrupa-Sibirya, İran-Turan ve Akdeniz olmak üzere üç biyocoğrafik alanı kapsayan bir ülkedir (Seçmen, 1998).

Türkiye'nin coğrafi yapısının farklılığı yüksek endemizm ve genetik çeşitliliği sağlar. Ayrıca, çeşitli ekolojik etmenler, makro ve mikroklimalar nedeniyle Türkiye çok sayıda cinsin gen merkezi durumundadır ve endemik taksonlar bakımından oldukça zengin bir ülkedir (Davis, 1982). Avrupa kıtasındaki tür sayısının yaklaşık 12000 ve bunların 2750 tanesinin endemik (Ekim ve ark., 2000) olduğu göz önüne alındığında, Türkiye'de tayin edilmiş 9222 adet bitki türü oldukça yüksek bir sayı olarak değerlendirilmektedir. Bu değere alt türleri ve varyeteleri de dahil ettiğimizde toplam sayı 11014'ü bulmaktadır. Bu taksonlardan 3708 tanesi endemik taksondur ve endemizm oranı % 34.5 olarak belirtilmiştir (Güner ve ark., 2000).

Endemik bitkiler ancak kendi isteklerini sağlayabilecek belirli bölgelerde yayılış gösteren, bunun dışındaki bölgelere ise uyum sağlayamayan bitkilerdir. Bu nedenle, varlıklarını sürdürdükleri doğal habitatlarındaki değişimlere karşı oldukça duyarlıdırlar.

Dünya üzerinde bulunan tüm ekosistemler insanlar tarafından tehdit edilmektedir. Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de; hızlı nüfus artışı, kentleşme, sanayileşme ve sürdürülemez üretim ve tüketim alışkanlıkları oranında doğal kaynak tahribatı

çarpıcı boyutlara ulaşmıştır. Kaynakların kirlenmesi, çölleşme, iklim değişiklikleri, habitat tahribi, erozyon, sel, taşkın, çığ, heyelan gibi insan etmeni ile de hızlandırılabilen doğal afetlerle birleşerek, insanın da bir parçası olduğu yaşamı, yani biyolojik çeşitliliği süratle yok etmektedir. Genel olarak tarımsal çalışmalar (mera alanlarının tarla açmak amacıyla sürülmesi, aşırı otlatma, anız yakılması, aşırı gübre ve tarımsal ilaç kullanımı, yüksek verimli çeşitlerin yaygınlaşması), şehirleşme, endüstrileşme, yol ve baraj yapımları, doğadan aşırı bitki toplama ve sökümü, aşırı orman kesimi ve orman yangınları ile turizm sektöründeki hızlı gelişmeler bitki türlerinin yok olmasına neden olan başlıca unsurlardır (Şehirli ve ark., 2005).

Farklı kaynak ve seviyelerdeki tehditlerle, biyolojik çeşitlilik her düzeyde etkilenmektedir. Bu nedenle, biyolojik çeşitlilik kaybının durdurulması herkes için büyük bir önem taşımaktadır. Çevrenin ve biyolojik çeşitliliğin korunmasına yönelik olarak Türkiye'nin taraf olduğu uluslararası pek çok sözleşme vardır. Ancak Dünya'daki ve Türkiye'deki tüm düzenlemelere rağmen biyolojik çeşitlilik-konumuz kapsamında bitki çeşitliliği- ciddi bir tehdit altındadır. Uluslararası Doğa Koruma Birliği (IUCN, International Union for Conservation of Nature and Naturel Resources) ve Dünya Yaban Hayatı Koruma Fonu (WWF) tarafından yapılan tahminler -eğer durum böyle giderse-, gelecek yüzyılın ortasına kadar neredeyse 60000 yüksek bitki türünün yok olacağını göstermektedir (Etkin, 1998).

Türkiye'de bulunan endemik bitkilerin tamamı ile endemik olmayıp nesli tehdit altında olan türler 1994 yılında IUCN tarafından teklif edilen "Red Data Book Kategorileri" ne göre sınıflandırılmış ve "Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı" adı altında yayımlanmıştır (Ekim ve ark., 2000). Buna göre Türkiye'de yüksek risk altındaki bitki gruplarına ait CR-critically endangered (kritik tehlikede), EN-endangered (tehlikede) ve VU-vulnerable (zarar görebilir) kategorisindeki endemik takson sayısı 1633'tür. Daha düşük risk altındaki (LR-lower risk) endemik takson sayısı ise 1586'dır. Bunlara ek olarak, yayılışları ile ilgili yeterli bilgi olmaması sebebi ile değerlendirmeye alınmayan 273 adet endemik taksonun varlığı tespit edilmiş olup, çalışmalar devam etmektedir.

Türlerin ve populasyonların korunmasında en önemli unsurun, hangi populasyonun, ne kadarının korunmaya ihtiyacı olduğunun belirlenmesi ve bu populasyonların ekolojilerinin araştırılarak etkili stratejilerle, tehditin azaltılmaya çalışılması olduğu Yıldız ve Gücel (2005) tarafından bildirilmiştir. Tüm dünyada biyolojik çeşitliliği korumanın, her biri kendine özgü yaklaşımları ve önlemleri gerektiren, iki farklı ve kabul edilmiş yolu vardır. Bunlar;

- *In-situ* (yaşama ortamında, yerinde) koruma,
- *Ex-situ* (ortamı dışında) koruma'dır.

Çeşitli tehdit kategorilerinin oluşturulması ve bu kategorilere giren taksonların belirlenmesi ve korunmasına yönelik *in situ* koruma çalışmaları bilim dünyasında yaygın olarak yerini almıştır. Geleneksel *in situ* metotlara ilave olarak endemik ya da tehdit altındaki bitkilerin koruma programlarında çeşitli *ex situ* stratejilerden de yararlanılmaktadır (Fay, 1992).

Tehdit altındaki bitki türlerinin çoğaltımı ve germplazmın korunması için, güçlü bir araç olarak sunulan *in vitro* hücre ve doku kültürü tekniklerine son yıllarda büyük bir ilgi vardır (Murch *et al.*, 2000). *In vitro* teknikler, doğal populasyona çok az etki ederek ve minimum materyalden çok sayıda bitki elde etmek sureti ile pek çok tehdit altındaki türün hızlı bir şekilde üretilmesine olanak sağlamaktadır (Cuenca *et al.*, 1999).

Bitki doku kültürü teknikleri; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (sekonder metabolitler gibi) üretilmesi işlemidir (Babaoğlu ve ark., 2002). Soyu tehdit altındaki türlerin korunması ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır. Bu doğrultuda bitki kısımları sterilizasyon işlemine tabi tutulduktan sonra yapay besi ortamlarına alınmakta ve sıcaklık, ışık ve nem kontrollü odacıklarda kültüre edilmektedir (Babaoğlu ve ark., 2002).

İlk kez 1902 yılında izole hücre kültürlerinin elde edilmesi ile başlayan bu süreç, hızlı bir şekilde gelişerek embriyo kültürü, haploid bitki üretimi, *in vitro* seleksiyon, *in vitro* döllenme, *in vitro* germplazm muhafazası, gen transferi, protoplast füzyonu, hastaliksız bitki elde edilmesi, mikroçoğaltım, somatik embriyogenez ve sentetik tohum üretimi ile sekonder metabolit üretimi gibi tekniklerde günümüze dek oldukça geniş açılımlar sergilemiştir.

Mikroçoğaltım, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip (=totipotent) bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre ya da mikrospor) yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesi olarak tanımlanmakta (Babaoğlu ve ark., 2002) ve klonal üretim (Chawla, 2002) veya *in vitro*'da vejetatif üretim (Pierik, 1987) olarak da anılmaktadır. Mikroçoğaltım tekniği kullanılan eksplanta (embriyo, meristem, anter, hücre ve protoplast kültürü) göre adlandırılmasına rağmen, çoğunlukla kullanılan teknikler, tek boğum yöntemi, aksiller dallanma, adventif sürgün ya da tomurcukların rejenerasyonu, kallus, hücre ve protoplastlardan bitki rejenasyonudur. Eğer bitkilerin uygun besin maddesi ihtiyaçları, bitki büyüme düzenleyicileri ve kültür istekleri yeterince biliniyorsa, mikroçoğaltım tekniği kullanılarak tüm bitki türlerinin üretilmesinin mümkün olduğu bildirilmiştir (Hartman ve Kester, 1975; Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

Debergh ve Read (1993)'a göre başarılı bir mikroçoğaltım; hazırlık, kültür başlangıcı, sürgün çoğaltımı, sürgün gelişimi ve köklendirilmesi ile bitkilerin dış ortam koşullarına alıştırılması gibi beş aşamada gerçekleştirilmektedir.

Mikroçoğaltım tekniklerinden biri olan aksiller sürgün çoğaltımı, *in vitro* bitki çoğaltımının en basit tipidir ve aksiller tomurcuk gelişiminin uyartılması ile gerçekleşir. 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 da kullanılmaktadır. Aksiller tomurcuk çoğaltımı tipik olarak aylık kültür

pasajları başına sürgün sayısında 10 kat artışla sonuçlanır. Bu teknik ile 6 aylık bir sürede, tek bir bitkiden başlayarak 1.000.000 kadar propagül ya da bitki elde etmek olasıdır (Philips ve Hubstenbenger, 1995).

Yaprak koltuk altı ya da sürgün tepelerinin dışında herhangi bir yerde oluşan tomurcuklar “adventif tomurcuk” olarak adlandırılmaktadır. Kalluslardan sürgün farklılaşması da adventif tomurcuk olarak ele alınmasına rağmen, bu tomurcuklar kallus evresine gerek kalmadan doğrudan bir organ ya da organ parçasından da oluşabilmektedir (Babaoğlu ve ark., 2002). Adventif sürgün çoğaltımı, mikroçoğaltım sistemlerinde en sıklıkla kullanılan çoğaltım tekniğidir (Chu, 1992).

Embriyo kültürü “yüksek bitkilerin tohumlarından ve tohum taslaklarından embriyoların izole edilerek belli ortamlarda kültüre alınması” olarak tanımlanmaktadır (Bürün ve Gürel, 2002). Embriyo kültürü, bitki doku kültürünün iyi gelişmiş dallarından biridir (Hu ve Wang, 1986). Embriyo kültürünün esası genel olarak, döllenme olayı gerçekleşikten sonra tohum içinde bulunan ve belirli bir gelişme safhasındaki embriyoların (daha çok iğ şeklindeki genç embriyolar) aseptik şartlar altında tohumdan izole edilerek, uygun bir besi ortamında kültüre alınmasıyla tam bir bitki geliştirilmesidir (Marks, 1973; Smith, 1944; Yeung, 1981). İki tip embriyo kültüründen söz edilmektedir (Raghavan, 1980);

1. Olgun tohum embriyolarının kültürü: Bu kültür oldukça kolaydır ve basit bir kültür ortamı ile başarılı sonuçlar alınabilmektedir. Böylece embriyogenik büyümeyi incelemek ve büyüme dönemlerini ortaya koymak, dormansi ve çimlenmenin metabolik ve biyokimyasal ayrıntılarını analiz etmek mümkün hale gelmektedir.
2. Olgunlaşmamış erken bölünme fazındaki proembriyoların kültürü: Erken bölünme fazındaki proembriyoların eksplant olarak kullanılmasıyla besin ihtiyaçlarının belirlenmesi ve farklılaşmasını sağlamaktadır. Embriyo izolasyonu oldukça zor bir iş olduğundan güç bir kültür yöntemidir.

Zigotik embriyo kültürünün en yararlı ve en güncel uygulama alanı, istenen özellikleri taşıyan nadir bitkilerin yetiştirilebilmesidir (Bürün ve Gürel, 2002). Bu yönüyle embriyo kültürü; temel biyolojik çalışmalarda, tohumların çimlendirilememesi durumunda, yaşamayan embriyoların kurtarılmasında, ıslah süresini kısaltmada, haploit bitkilerin üretilmesinde, tohum canlılıklarının hızlı test edilmesinde ve ender bitkilerin çoğaltılması gibi, çok çeşitli amaçlarla kullanılan uygulama alanlarına sahiptir (Monnier, 1990a, b; Hu ve Zanetini, 1995; Bhojwani ve Razdan, 1996).

Bitki hücrelerinden embriyo elde edilmesi döllenmiş yumurta hücresiyle sınırlı değildir. *In vitro* kültür şartlarını ve özellikle de bitki büyüme düzenleyicilerini ayarlayarak bir bitkinin herhangi bir somatik hücre, doku veya organından embriyo elde edilebilmektedir. Vejetatif hücrelerden gelişen bu embriyolar somatik embriyo, bu sürece de somatik embriyogenez adı verilmektedir (Özcan ve ark., 2001). Genel olarak somatik embriyogenez çalışmalarında değişik bitki kısımları başlangıç eksplantı olarak kullanılmasına rağmen, bu süreçte olgunlaşmamış zigotik embriyolar en uygun eksplant kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Bunun nedeni, zigotik embriyoların embriyogenik gelişme için gerekli olan genleri aktif hale getirmeleridir (De Jong *et al.*, 1993; Parrott *et al.*, 1993).

Somatik embriyoların gelişimleri sonucunda olgun bitkilerin geliştiği düşünülürse somatik embriyogenezin en hızlı mikroçoğaltım yöntemi olduğu anlaşılmaktadır (Merkle *et al.*, 1990). Somatik embriyogenez yöntemi klonal çoğaltımın yanı sıra, sentetik tohum üretimi ve gen aktarımı çalışmalarında da kullanılmaktadır.

Yukarıda sözü edilen çeşitli amaçların yanı sıra, hücre ve dokuların *in vitro* kültürü erken bitki gelişimi sırasında yer alan morfolojik, biyokimyasal ve moleküler olayların araştırılması için yararlı bir model sistem oluşturmaktadır (De Klerk, 1996).

Ayrıca somatik hücre farklılaşmasının iyi bilinmesinin, bitki gelişiminin anlaşılması için en gerekli fenomenlerden biri olduğu Tang ve Newton (2005) tarafından da bildirilmiştir. Organogenez, gen ekspresyonu ve protein sentezi ile ilişkili, biyolojik

olarak kompleks bir gelişim ve farklılaşma sürecidir (Tang ve Newton, 2005). Bu süreç üç ana evreyi içermektedir. Birinci olarak, eksplant hücreleri hormonal sinyallere cevap verme yeteneği kazanırlar. İkinci olarak, yetenekli hücreler dışsal hormonal sinyallerin etkisi altında özel organ oluşumuna kararlı hale gelirler. Son olarak, morfogenez eksojen olarak uygulanmış büyüme düzenleyicilerinden bağımsız olarak tamamlanır (Christianson ve Warnik, 1983; Christianson ve Warnik, 1985).

In vitro koşullarda bitki hücrelerinin farklılaşması, büyüme ve gelişmesinin pek çok faktöre bağlı olduğu çok sayıda araştırma ile rapor edilmiştir. Bitkilerin çoğundaki diferansiyasyon ya da de-diferansiyasyon olaylarının *in vitro* süreçlerinin araştırılması, eksplant kaynağının fizyolojik evresi ve donör bitki genotipi üzerine odaklanmıştır (Almeida *et al.*, 2003; Rout *et al.*, 2000). Konu ile ilgili olarak bitki büyüme düzenleyicilerinin fonksiyonel öneme sahip olduğu da pek çok çalışma ile bildirilmiştir (Valdés *et al.*, 2001; Zambre *et al.*, 2002).

Son yıllarda bitki hücrelerinin büyüme, gelişme ve farklılaşmasında reaktif oksijen türlerinin (ROS) fonksiyonel önemine yönelik giderek artan bir ilgi vardır (Gidrol *et al.*, 1994; Ogawa ve Iwabuchi, 2001). Bitkilerde, aktif oksijen türleri (AOS) olarak da bilinen reaktif oksijen türleri, savunma ya da adaptasyonu başlatan sinyal molekülleri, oksidatif hasar ürünleri ya da primer'ler gibi stresle ilişkili normal fizyolojik süreçlerle ilgili cevaplardır. Reaktif oksijen türleri, normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil (HO^{\cdot}) radikalleridir. Reaktif oksijen türleri ve onların süpürücü enzimleri çevresel streslere karşı bitki savunması sırasında çok önemli mekanizmalar olarak düşünülmektedir (Prasad *et al.*, 1994; Hernandez *et al.*, 2001). Reaktif oksijen türlerinin çeşidi ve düzeyi strese karşı oluşturulacak cevap tipi için belirleyici faktörlerdir. Optimum büyüme koşullarında hücreler, enzim ve metabolitler sayesinde, reaktif oksijen türlerinin vereceği zararlardan korunurlar. Bu türlerin oluşumu ve elimine edilmesi reaksiyonları normalde denge halindedir (Halliwell, 1982; Foyer ve Mullineaux, 1994). Hücrede reaktif oksijen türlerinin yüksek üretimi oksidatif stres olarak tanımlanmakta olup kuraklık, yüksek ışık şiddeti veya *in vitro* kültür gibi stresli çevresel koşullara bitki cevabı ile ilgili yaygın

bir olgu olarak nitelendirilmektedir (Price *et al.*, 1989; Scandalios, 1990; Cassells ve Curry, 2001).

Normal aerobik metabolizma sonucu, mitokondri ve kloroplastlardaki elektron taşınım zincirinden sızan elektronlar, O₂ ile etkileşime girerek süperoksit (O₂ + e⁻ → O₂⁻), hidrojen peroksit (2O₂⁻ + 2H⁺ → H₂O₂ + O₂), ve hidroksil radikali (O₂⁻ + H₂O₂ → HO⁻ + HO⁻ + O₂) gibi aktif oksijen türlerini oluştururlar (Halliwell ve Gutteridge, 1985). Ayrıca temel formdaki oksijen, enerjitik aktivasyon sonucu tek değerlikli oksijene (¹O₂) dönüşebilir (Elstner, 1987). Bu sitotoksik aktif oksijen türleri, lipidlere (Fridovic, 1986; Wise ve Naylor, 1987), proteinlere (Halliwell ve Gutteridge, 1985; Davies, 1987) ve nükleik asitlere (Fridovic, 1986; Imlay ve Linn, 1988) oksidatif zarar vererek normal metabolizmayı etkiler.

Reaktif oksijen türlerinin bitkilerdeki fizyolojik rollerini açıklayıcı araştırmalar bulunmaktadır. Potikha *et al.* (1999)'nın yaptığı bir çalışmada, hidrojen peroksitin pamuk liflerinde sekonder çeperlerin farklılaşmasında gelişim sinyal molekülü olarak bir fonksiyonu olabileceği tartışılmıştır. Yüksek reaktif oksijen türleri üretimi mısır yapraklarının uzama bölgesinde gözlenmiş ve belli konsantrasyonlardaki hidrojen peroksitin yaprak uzaması için gerekli olduğu sonucuna varılmıştır (Rodriguez *et al.*, 2002). Ayrıca hidrojen peroksitin karakteristik özelliklerine bakıldığında, normal hücrelerde doğal olarak oluşturulabilen hidrojen peroksitin göreceli olarak stabil ve hücre membranları arasında dağılık olduğu (Del Ry'o *et al.*, 1998; Foyer *et al.*, 1997) ve hücre fonksiyonunda bir sinyal molekülü olarak davrandığı öne sürülmektedir. ROS'un seviyesini ayarlamak için bitki hücreleri spesifik aktivite ve spesifik subsellular lokasyonu olan süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1), katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) ve peroksidaz (PO; EC1.11.1.7)'i içeren kompleks bir antioksidan enzim sistemi geliştirmişlerdir (Inze' ve van Montagu 1995; Noctor ve Foyer, 1997; Scandalios *et al.*, 1997; Hiraga *et al.*, 2001; Alscher *et al.*, 2002).

Reaktif oksijen türleri ve onların süpürücü enzimlerinin *in vitro* süreçler sırasındaki rolü tam olarak bilinmemektedir. Tian *et al.* (2003) çilek kalluslarının organogenezini sırasında antioksidan enzim aktivitelerini ve hidrojen peroksit ve peroksit

radikallerinin salınımını araştırmışlar ve kallusların farklılaşma ve gelişimleri sırasında erken rejenerasyon kültüründe superoksit dismutaz aktivitesinin arttığını ve daha sonra azaldığını, katalaz aktivitesinin ise, kültürün ilk 5 günü boyunca peroksidaz aktivitesinin artmasına karşın devamlı olarak azaldığını ve kalluslardan sürgün tomurcuklarının gelişimi ve farklılaşmasından sonra dereceli olarak arttığını gözlemişlerdir. Yüksek peroksit radikal düzeyi, düşük hidrojen peroksit düzeyi ve neredeyse yok denecek kadar az süperoksit dismutaz aktivitesi, düşük organogenez kapasitesi gösteren kalluslarda belirlenmiştir. Çilek kalluslarının morfojenetik süreçleri ile ilişkili hidrojen peroksinin, sürgün primordiyum oluşum sürecinde bir mesajcı olarak görev yapabileceği sonucuna varılmıştır. Tang ve Newton (2005)'un *Pinus strobus*'un zigotik embriyolarını kullanarak direkt adventif sürgünleri elde ettiği çalışmada ise, kültür periyodunun 0-6 haftasında peroksidaz aktivitesinin azaldığı, kültürün 7 ve 8. haftalarında (geç sürgün tomurcuk oluşum evresi) dereceli olarak arttığı gözlenmiştir. Katalaz aktivitesi ise, devamlı olarak tüm kültür boyunca azalmıştır. Peroksidaz ve katalaz aktivitesi azalmasının TDZ uyarımlı direkt adventif sürgün oluşumu ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Kairong *et al.* (1999)'nın yaptığı bir çalışmada embriyogenik hücrelerin farklılaşmasının hidrojen peroksit tarafından etkilendiği görülmüştür. Çalışmada, yüksek düzeylerde hidrojen peroksinin somatik embriyogenezi teşvik ettiği ve hücre farklılaşması ve gelişmesi ile reaktif oksijen türleri metabolizması arasındaki ilişki ortaya konmuştur.

Farklı *in vitro* teknikler kullanarak çoğaltmak ve bu süreçlere etki eden faktörleri araştırmak amacı ile gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada, materyalimiz olan *Rhaponticoides mykalea* (Hub.-Mor.) M. V. Agab. & Greuter, *Asteraceae* familyasına ait bir türdür.

Daha önceleri, sistemde *Centaurea* cinsi altında *Centaurea mykalea* Hub.-Mor. olarak sınıflandırılan *Rhaponticoides mykalea* (Hub.-Mor.) M. V. Agab. & Greuter, günümüzde *Centaurea* seksiyonundan ayrılmış bulunmaktadır (Hellwig, 2004).

Rhaponticoides cinsi batıda Portekiz ve Monako, doğuda Moğolistan'a kadar uzanan 32 tür içermektedir (Hellwig, 2004). Bu cinse ait türlerin çoğu ya nadir endemiktir,

ya da sıçramalı yayılış gösterir (Wagenitz, 1986). Sadece çok az sayıda tür (örneğin *Rhaponticoides ruthenica*) geniş yayılış göstermektedir. Ülkemizde *Rhaponticoides* cinsi 6 tür ile temsil edilmektedir. Bunlar,

1. *Rhaponticoides mykalea* (Hub.-Mor.) M. V. Agab. & Greuter,
2. *Rhaponticoides iconiensis* (Hub.-Mor.) M. V. Agab. & Greuter,
3. *Rhaponticoides amplifolia* (Boiss. & Heldr.) M. V. Agab. & Greuter,
4. *Rhaponticoides phytia* (Azn. & Bornmüller) M. V. Agab. & Greuter,
5. *Rhaponticoides amasiensis* (Wagenitz) M. V. Agab. & Greuter,
6. *Rhaponticoides hierroi* Ö. Eren *sp. nova* 'dir (Eren, 2007).

R. iconiensis, *R. amasiensis*, *R. mykalea* ve *R. hierroi* Türkiye için endemiktirler. *R. iconiensis* ve *R. mykalea* CR (Critically Endangered- Çok Tehlikede) kategorisinde yer almaktadırlar. Türkiye’de tüm bu cinse ait türler ‘peygamber çiçeği’ olarak adlandırılmaktadır (Wagenitz, 1975; Davis *et al.*, 1988; Güner ve ark., 2000; Ekim ve ark., 2000). *R. mykalea* türü köylüler arasında “deli enginar” olarak da adlandırılmaktadır (Kuşadası’nda gerçekleştirilen arazi çalışmaları sırasında köylülerle yapılan kişisel görüşmeler sonucunda elde edilen bilgiye göre).

Çalışma materyalimiz *Rhaponticoides mykalea* (Hub.-Mor.) M. V. Agab. & Greuter türü, Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabına göre CR (Critically Endangered- Çok Tehlikede) kategorisinde bulunmaktadır. CR kategorisi aşağıdaki kıstaslar dikkate alınarak değerlendirilmektedir:

A) Populasyon aşağıdaki tehditler sonucu azalıyor ve aşağıda belirtilen koşullara göre 10 yıl içinde populasyonda %80 kaybolma olasılığı varsa:

- a. Habitat özelliğinin değişimi ve türün kaplama derecesinin azalması;
- b. Aktüel ve potansiyel bir toplama tehditi altında olması;

c. Başka bir taksonun istila tehdidi, melezleme, hastalık, tohum bağlamama, kirlenme, rekabetçiler ve parazitlerin etkisi altında olması;

B) Bitkinin toplam yayılış alanı, 100 km² den ve tek yayılım alanı da 10 km² den az ise çok parçalanmış veya tek bir lokasyondan bilinmesi.

CR kategorisi kıstasları göz önüne alındığında *R. mykalea*, Aydın- Isparta ve Muğla yörelerindeki çok dar alanlı yayılışı nedeniyle yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kalmış durumdadır. Oldukça sınırlı sayıda bireye sahip olan tür, turizm sektöründeki hızlı gelişmeler sayesinde devam eden şehirleşmenin giderek artması, tarla açma amacıyla doğal habitatın tahribatı, aşırı otlatma ve bitkilerin kapitulumlarının yerel halk tarafından toplanıp yiyecek olarak kullanılması gibi faktörlerin etkisinde güçlü bir antropojenik baskı altındadır. Bu durum zaten potansiyel olarak yok olma tehlikesi altında bulunan türün devamını iyice kısıtlamaktadır.

Yaptığımız literatür araştırması dahilinde *R. mykalea* bitkisinin korunmasına ve üretilmesine yönelik şimdiye kadar hiçbir çalışma belirlenmemiştir. Bu çalışma *in vitro* teknikler kullanılarak *Rhaponticoides mykalea*'nın tohum çimlenme özelliklerinin belirlenmesi, *in vitro* çoğaltılması ve korunmasına yönelik alternatif bir prosedür geliştirilmesinin yanı sıra, bu süreçleri etkileyen faktörlerin saptanması amacını taşımaktadır. Ayrıca, reaktif oksijen türleri ve antioksidan enzimler ile eksojen olarak ilave edilmiş bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi altında gerçekleşebilecek somatik hücre farklılaşması arasındaki ilişkinin belirlenmesi ile bitki gelişimi ve farklılaşması olayları sırasında meydana gelen morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal olaylara ışık tutması hedeflenmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Yaptığımız literatür araştırması dahilinde *R.mykalea*'nın korunması ve çoğaltılması yönünde *ex situ* veya *in situ* olarak gerçekleştirilmiş herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu türün *Asteraceae* familyasının endemik bir türü olması ve *Centaurea* cinsiyle yakın akraba olması nedeniyle, tüm çalışmalarda bu familya ve cins dikkate alınarak denemeler oluşturulmuştur. Bunun yanısıra benzer nitelikteki araştırmalar da özenle irdelenmiştir.

Diğer yandan, *Rhaponticoides* cinsinin *in vitro* çoğaltılmasına ilişkin olarak da yayınlanmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle *Asteraceae* familyasına ve *Centaurea* cinsine ait bazı türlerin mikroçoğaltım protokolleri referans olarak kullanılmıştır.

Çimlenme denemeleri için aşağıda yer alan çalışmalar referans olarak kullanılmıştır.

Padilla ve Encina (2002), *Annona cherimola* (*Asteraceae*) tohumlarını kullanarak gerçekleştirdikleri bir çalışmada 8.67 μM (2.87 mg/L) gibberellik asit içeren vitamin destekli distile su ortamında, 30°C'ta ve karanlıkta %80 değerinde çimlenme elde etmişlerdir.

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

Erdağ ve Emek (2005), CR kategorisinde endemik bir bitki *Anthemis xylopoda* O. Schwarz'nın *in vitro* çoğaltılmasına yönelik olarak gerçekleştirdikleri bir çalışmada, türün tohumlarınının 1 mg/L GA₃ (Giberellik asit) ilaveli MS (Murashige and Skoog, 1962) ortamında % 65 oranında çimlendiğini bildirmişlerdir.

Çakırlar ve ark. (2005), *Centaurea tchihatcheffii* tohumlarının 9 ay'lık bir dormansi periyodu içinde olduklarını ve tohumların çimlenmesi için en uygun pH değerinin 7.5 olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar aynı denemede çimlenme için en uygun sıcaklığın 25 ± 2 °C olduğunu rapor etmişlerdir.

Çelik ve Yücel (2008)'in CR kategorisinde bulunan *Centaurea hausknetchii*'nin tohumlarının çimlenmesi üzerine gerçekleştirdikleri bir araştırmada 16/8, 8/16 fotoperiyod ile karanlık koşullarda farklı oranlarda (sırasıyla % 69.2, % 58.5 ve % 42) çimlenme elde etmişler ve araştırmacılar ışığın çimlenme üzerine teşvik edici bir etkisi olduğunu belirtmişlerdir.

Kurt ve Erdağ (2009), *Centaurea zeybekii* Wageintz tohumlarını GA₃ ilaveli ve herhangi bir bitki büyüme maddesi içermeyen MS, B5 (Gamborg *et al.*, 1968), White (White, 1963) ve Distile su ortamlarında *in vitro* kültüre almışlardır. Sıcaklığın çimlenme üzerine etkili bir faktör olduğunu belirten araştırmacılar 1 mg/L GA₃ ilaveli distile su ortamında aktardıkları tohumları 25 °C'ta kültüre almışlar ve en yüksek çimlenme oranını (% 80) elde etmişlerdir. Aynı araştırmacılar tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine ışık ve karanlık etkisini araştırmış ve ışık-karanlık uygulamaları arasında önemli bir farklılık olmadığını belirtmişlerdir.

Çimlenme denemelerinin yanı sıra *Asteraceae* familyası üyelerinin *in vitro* üretimi üzerine çeşitli yöntemler denenmiş ve konu ile ilgili çok sayıda araştırma literatürde yerini almıştır.

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 sayısını 5 mg/L BA (⁶N-Benzil adenin) ve 0.2 mg/L NAA (α -naftalen asetik asit) içeren MS ortamında, en iyi köklenme yüzdesini ise 0.01 mg/L IBA (İndol-3-butirik asit) içeren MS ortamında elde etmişlerdir.

Takashi ve Daisuke (1997), *Centaurea macrocephala* bitkisinin koltuk altı meristemlerini kullanarak mikroçoğaltım çalışmaları yapmışlar ve elde ettikleri sürgünlerin %70'ini 25 µM IBA (5 mg/L) içeren Hypnex ortamında köklendirmişlerdir.

Pevalek ve Kozlina (1998), tehdit altındaki endemik bitki *Centaurea ragusina*'nın tohumlarını *in vitro* çimlendirmiş ve elde ettikleri 20 günlük fideleri aksiller sürgün çoğaltımı için başlangıç materyali olarak kullanmışlardır. En iyi sürgün gelişimini 1.0 µM BA (0.22 mg/L) ve 2.9 µM GA₃ (1 mg/L) ilaveli ½ MS ortamında elde etmişlerdir. Sürgünleri 2.5 µM IBA (0.5 mg/L) ilaveli ½ MS ortamında köklendirmiş ve dış ortama alıştırmışlardır.

Wildi *et al.* (1998), *Petasites hybridus*'un (Asteraceae) yaprak, petiyol ve infloresens tomurcuklarını kullanarak *in vitro* çoğaltımını gerçekleştirmişlerdir. Denemelerde 17.6 µM BA (2 mg/L) ve 0.54 µM NAA (0.1 mg/L) ilaveli MS ortamında sürgün teşviki sağlanmıştır. Kültürden beş hafta sonra petiyollerin % 40'ı, yaprakların % 27'si ve infloresens tomurcuklarının ise % 76'sı sürgün oluşturmuştur. 8.8 µM kinetin (1.9 mg/L) ve 0.54 µM NAA (0.1 mg/L) içeren MS ortamlarında en iyi sürgün çoğaltımı elde etmişlerdir.

Cuenca *et al.* (1999), 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 (kinetin) içeren MS ortamında olduğunu, bunun yanı sıra en uzun sürgün boyunun bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamında elde ettiklerini belirtmişlerdir. En uygun köklenmenin 2 mg/L IAA (İndol-3-asetik asit) ve 2 mg/L IBA destekli MS ortamında elde etmişler 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 1 mg/L BA içeren MS besin ortamında yüksek oranda sürgün oluşumu elde etmişlerdir. Çalışmada elde edilen sürgünlerin boylarının kısa

ve artan sürgün sayısı ile sürgün boyu arasında negatif bir korelasyonun varlığından söz etmişlerdir. Köklendirme denemelerinde tek çeşit oksin kullanımı ile köklenme oranının düşük olduğunu; iki çeşit oksin kombinasyonunun kullanımında ise en iyi sonucun 2 mg/L IAA ve 2 mg/L IBA içeren MS besin ortamında elde edilebileceğini (%60) bildirmişlerdir. Köklendirdikleri bitkilerin %80'nin canlılığını koruduğunu rapor etmişlerdir.

Joshi ve Dhar (2003), endemik ve tehlike altında tıbbi bir bitki olan *Saussurea obvallata* epikotillerini eksplant olarak kullandıkları çalışmada, 1.0 µM KIN (0.2 mg/L) ve 0.25 µM NAA (0.05 mg/L) ilaveli MS ortamda bir eksplant başına 5 sürgün olacak biçimde çoklu sürgünler elde etmişler, 2.5µM IBA (0.5 mg/L) ilaveli ½ MS ortamlarında sürgünlerin % 100'ünü köklendirmişlerdir. Dış ortama aktarılan bitkiciklerin % 66.7'sinin uyum sağladığını belirtmişlerdir.

Evenor ve Reuveni (2004), Asteraceae familyasına ait endemik *Achillea filipendulina* cv. 'Parker' lateral tomurcuklarını eksplant olarak kullandıkları bir çalışmada, 0.5 mg/L NAA ve 1 mg/L BA içeren MS ortamında tomurcuk başına 9.1 adet sürgün elde etmişlerdir. Elde ettikleri sürgünleri 1 mg/L IAA ilaveli MS (%2 sukroz ilaveli) ortamında % 83 oranında köklendirmişler ve köklenmeden sonra seraya aktarılan bitkilerin %90'nin canlılığını koruduğunu rapor etmişlerdir.

Erdağ ve Emek (2005), CR kategorisinde endemik bir bitki *Anthemis xylopoda*'nın *in vitro* çoğaltılmasına yönelik olarak gerçekleştirdikleri bir çalışmada, *in vitro* olarak çimlendikleri tohumlardan elde ettikleri fideleri köklerinden ayırarak aksiller sürgün çoğaltımı için farklı konsantrasyonlarda BA, KIN veya TDZ (Thidiazuron) içeren MS ortamlarına aktarmışlardır. 0.005 mg/L TDZ ilaveli MS ortamında eksplant başına 7.83 adet sürgün elde etmişlerdir. Elde ettikleri sürgünleri 0.5 mg/L IBA ilaveli MS ortamında % 60 oranında köklendirmişler ve IBA'nın IAA'dan daha etkili bir oksin olduğunu belirtmişlerdir. Dış ortama aktarılan bitkiciklerin % 70'inin uyum sağladığını belirtmişlerdir.

Dhar ve Joshi (2005), tehlike altında olan *Saussurea obvallata* (Asteraceae) ile ilgili olarak yaptıkları bir çalışmada eksplant yaşının rejenerasyon potansiyeli üzerine etkisini belirlemek için tohumları çimlendirdikten sonra bitkiciklerin 5, 10, 15 ve 20. gününde kök, gövde ve kotiledonlarını kültüre almışlardır. Yaprak eksplantları ise *in vitro* geliştirilmiş 4 aylık fidelerden alınarak denemeler kurulmuştur. 10 günlükten 15. günlüğe kadar olan sürgünlerden alınan eksplantlarda maksimum kallus oluşumu gözlemişlerdir. BA ve NAA içeren MS ortamlarında tüm eksplant tiplerinden kallus oluşmuştur. Kültüre en iyi cevap yaprak eksplantlarında elde edilmiştir: 2.5 µM BA (0.56 mg/L) ve 1.0 µM NAA (0.22 mg/L) ilaveli MS ortamlarında % 100 kalluslaşma, 5.0 µM BA (1.12 mg/L) ve 1.0 µM NAA (0.18 mg/L) ilaveli MS ortamında ise eksplant başına 12 sürgün olacak biçimde % 100 sürgün farklılaşması elde etmişlerdir. 2.5 µM IBA (0.5 mg/L) ilaveli ½ MS ortamlarında sürgünlerin % 100'ünü köklendirmişlerdir.

Sreedhar *et al.* (2008), *Stevia rebaudiana* 'nın yapraklarını eksplant olarak kullandığı bir çalışmada, 8.88 µM BA (2 mg/L) ve 4.65 µM KIN (1 mg/L) ilaveli MS ortamında eksplant başına 4.33 sürgün elden etmişlerdir. En uzun sürgün ise 8.88 µM BA (2 mg/L) ve 2.33 µM KIN (0.5 mg/L) ilaveli MS ortamında elde edilmiştir (5.73 cm). Sürgünlerin daha çok uzaması için IAA ve IBA ilaveli MS ortamlarına alınmış ve 4.92 veya 7.38 µM IBA (1.5 mg/L) ilaveli ortamlarda sırasıyla 6.19 veya 5.27 cm sürgünler elde edilmiş, aynı zamanda bu ortamlarda kök oluşumu da gerçekleşmiştir.

Kurt ve Erdağ (2009), *Centaurea zeybekii* tohumlarından *in vitro* çimlendirme sonucu elde ettikleri bitkicikleri geliştirmiş ve fideleri aksiller sürgün çoğaltımı denemelerinde eksplant olarak kullanmışlardır. En yüksek sürgün sayısı 1 mg/L BA ilaveli MS ortamında (14.85 sürgün/eksplant), en uzun sürgün boyu ise bitki büyüme düzenleyisi içermeyen MS ortamında elde etmişlerdir (4.27 cm). Elde ettikleri sürgünleri 0.5 mg/L IBA içeren MS ortamında % 15 oranında köklendirmişler ve kademeli olarak dış ortama aktarmışlardır.

Erdağ ve Emek (2009), endemik kritik tehlike altında *Anthemis xylopoda*'nın *in vitro* çimlendirme sonucu elde ettikleri fideleri aksiller olarak çoğaltmışlardır. Elde ettikleri aksiller sürgünlerin yapraklarını 2'ye bölerek adventif sürgün rejenerasyonu çalışmalarında eksplant olarak kullanmışlardır. 0.5 mg/L BA ilaveli MS ortamında eksplant başına en yüksek oranda adventif sürgün (6.7 adet sürgün/eksplant) ve 0.2 mg/L BA ilaveli MS ortamında maksimum sürgün boyu (4.30 cm) elde etmişlerdir. 0.5 mg/L IBA içeren ½ MS ortamında ise % 80 oranında sürgüleri köklendirmişlerdir.

Embriyo kültürü ve somatik embriyogenez denemeleri için aşağıda özetlenen çalışmalar referans olarak değerlendirilmiştir.

Finer (1987)'in *Helianthus annuus*'un olgun ve olgunlaşmamış zigotik embriyolarını eksplant olarak kullandığı bir çalışmada, olgunlaşmamış zigotik embriyoları dicamba (3.3, 10 ve 33 mg/L) veya 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 0.33, 1 ve 3.3 mg/L)'nin farklı konsantrasyonlarını içeren farklı sukroz konsantrasyonu ilaveli (% 3, 6 ve 12) MS ortamlarında kültüre almıştır. Araştırmacı, farklı konsantrasyonda oksin ve % 3 sukroz içeren MS ortamlarının hiçbirinde direkt somatik embriyo oluşmadığını, % 6 ve % 12 sukroz ilaveli ortamlarda farklı oranlarda somatik embriyo oluştuğunu belirtmiş ve en yüksek oranda somatik embriyo oluşumunun 1 mg/L 2,4-D ve % 12 sukroz ilaveli MS ortamında elde etmiştir (31.2 adet/zigotik embriyo). Araştırmacı, tohumdan izole ettiği olgun zigotik embriyoları ise % 2 sukroz ilaveli MS ortamında kültüre almıştır. Olgun zigotik embriyoların çimlenmesi sonucu elde ettiği bitkiciklerin kısımlarını ve olgun zigotik embriyoları 1 mg/L 2,4-D ve % 12 sukroz ilaveli MS ortamında kültüre almış, fakat bu eksplantlardan somatik embriyo farklılaşmadığını belirtmiştir.

Bronner *et al.* (1994)'nin *Helianthus annuus* L.'un olgunlaşmamış zigotik embriyolarını eksplant olarak kullandıkları bir çalışmada, sürgün veya somatik embriyo teşviki için BA'nın ortamda bulunmasının kesinlikle gerekli olduğu, fakat morfogenetik cevap tipinin ortamda bulunan sukroz miktarına bağlı olduğunu bildirmiştir. Düşük sukroz konsantrasyonunda (%3) organogenez teşvik edilirken,

yüksek sukroz konsantrasyonunda (%12) somatik embriyogenez teşvik edilebileceğini belirtmişlerdir.

Özel ve ark. (2006)'nın endemik *Centaurea tchihatcheffi*'nin olgunlaşmamış zigotik embriyolarını eksplant olarak kullandıkları bir çalışmada, antezisten sonra gelişimsel dönemi dikkate alarak olgunlaşmamış zigotik embriyoları, BA:NAA ve KIN:NAA kombinasyonlarını içeren MS ortamlarına kültürea almışlardır. Araştırmacılar, antezisten sonraki 1-8 gün içinde kapitulumlardan alınan olgunlaşmamış zigotik embriyoların büyüme için yeterli olmadığı, antezisten sonraki 8-12 gün içinde kapitulumlardan alınan olgunlaşmamış zigotik embriyoların ise adventif sürgün oluşturma açısından en uygun eksplant kaynağını oluşturduğunu belirtilmiştir. Aynı zamanda, antezisin 12. gününden sonraki günlerde olgunlaşmamış zigotik embriyoların rejeneratif olmadığını ve dormant hale geçtiklerini belirtmişlerdir.

Rai *et al.* (2007), *Psidium guajava* L.cv. Banarasi'nin olgunlaşmamış zigotik embriyolarını kullanarak bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar, zigotik embriyoların somatik embriyogeneze teşviki üzerine zigotik embriyoların fizyolojik yaşının etkisini belirlemek amacıyla, 7-14 hafta arasında bulunan meyvelerden izole ettikleri olgunlaşmamış zigotik embriyoları 2.26 µM 2,4-D (0.5 mg/L) ilaveli ve % 3 sukroz içeren MS ortamında kültürea etmişlerdir. 10. haftada izole ettikleri olgunlaşmamış zigotik embriyolardan en yüksek oranda (% 50) başarı elde etmişler ve zigotik embriyoların fizyolojik yaşının *in vitro* somatik embriyogenez sürecinde etkili bir faktör olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada araştırmacılar, somatik embriyogenez teşviki için 2,4-D ile sukrozun interaktif etkisini belirlemek amacıyla, antezisten sonra 10. haftada bulunan meyvelerden izole ettikleri olgunlaşmamış zigotik embriyoları farklı oranlarda 2,4-D (0-9.05 µM =0-2 mg/L) ve sukroz (%0-20) içeren MS ortamlarına kültürea etmişlerdir. Bu denemelerin sonucunda kontrol ortamında ve % 1 sukroz ilaveli tüm 2,4-D içeren ortamlarda somatik embriyogenez teşviki gerçekleşmezken, 4.52 µM 2,4-D (1 mg/L) ilaveli ve % 5 sukroz içeren MS ortamının somatik embriyogenez teşviki için en iyi ortam olduğunu belirtmişlerdir. Somatik embriyoların gelişmesi ve olgunlaşması içinde % 5 sukroz ilaveli MS ortamı en iyi ortam olarak belirlenmiş ve % 3 sukroz ilaveli ½ MS ortamında en yüksek

oranda (% 98.3) somatik embriyoların bitkiciğe dönüştüğünü belirtmişlerdir. Somatik embriyoların çimlendirilmesi ile elde edilen bitkicikleri toprağa aktarmışlar ve bitkiciklerin % 90-100 oranında uyum sağladıklarını belirtmişlerdir.

In vitro koşullarda somatik embriyogenez ve organogenez süreci boyunca SOD, CAT ve PO aktivite değişimlerini belirlemek amacıyla aşağıdaki çalışmalar referans olarak değerlendirilmiştir.

Kairong *et al.* (1999)'nın *Lycium barbarum* ile gerçekleştirdikleri bir çalışmada SOD aktivitesinin en yüksek değerinin somatik embriyolar oluşurken gözlemişler ve daha sonraki aşamalarda ise SOD aktivitesinde düşüş olduğunu belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar kallus fazında CAT ve PO aktivitelerinin yüksek olduğu ve embriyo farklılaşması sırasında ise aktivitede düşüş olduğunu belirtmişlerdir.

Tian *et al.* (2003), çilek kalluslarından sürgün organogenezi sırasında antioksidan enzimlerin bulunduğunu belirtmişler ve organogenez sırasında SOD aktivitesinde artış, PO aktivitesinde ise düşüş gözlemişlerdir.

Tang *et al.* (2005)'in *Pinus strobus*'un zigotik embriyolarını kullanarak direkt adventif sürgünleri elde ettikleri bir çalışmada kültür periyodunun ilk 6 haftasında peroksidaz aktivitesinin azaldığını, kültürün 7 ve 8. haftalarında (geç sürgün tomurcuk oluşum evresi) dereceli olarak arttığını belirtmişlerdir. Katalaz aktivitesinin ise, tüm kültür boyunca devamlı olarak azalma gösterdiğini saptamışlardır.

Gupta ve Datta (2003)'nin *Gladiolus hybridus* ile yaptığı bir çalışmada yaprak kalluslarından sürgün farklılaşması sırasında CAT ve PO aktivitelerinde artış, yaprak kalluslarından somatik embriyo oluşumu sürecinde SOD aktivitesinde artış ve somatik embriyo proliferasyonu sırasında ise düşüş gözlemişlerdir. Aynı araştırmacılar somatik embriyo gelişimi ve farklılaşması sırasında CAT ve PO aktivitelerinde de düşüş gözlemişlerdir.

Meratan *et al.* (2009)'ın *Acanthophyllum sordidum* ile gerçekleştirdiği bir çalışmada kallustan sürgün rejenerasyonu sırasında SOD ve CAT aktivitesinde artış ve PO etkinliğinde ise düşüş gözlemişlerdir. Aynı araştışıcılar kallustan kök oluşumu sırasında SOD ve PO aktivitelerinde artışa karşılık, CAT aktivitesinde düşüş olduğunu belirlemişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. MATERYAL

Çalışma materyalimiz *Asteraceae* familyasına ait *Rhaponticoides mykalea* (Hub.-Mor.) M. V. Agab. & Greuter türüdür (Şekil 3.1).

Rhaponticoides mykalea (Hub.-Mor.) M. V. Agab. & Greuter'nın sistematikteki yeri ve özellikleri:

Classis : Magnoliopsida

Subclassis : Asteridae

Ordo : Asterales

Familia : Asteraceae

Rhaponticoides mykalea (Hub.-Mor.) M. V. Agab. & Greuter

Türün Türkiye florasında (Davis *et al.*, 1988) yer alan tanımı aşağıdaki gibidir:

CENTAUREA L. [5:465]

C. mykalea Hub.-Mor. in Bauhinia 6(3):370 (1979). (Sect. *Centaurea*)

Perennial. Gövde dik, c. 1 m, boyuna striat, subangular, üstte tek başlı az sayıda dala ayrılır. Yapraklar sert, skabrid, glabroz kenarların dışında kısa tüylü. Bazal yapraklar bipinnatisekt, petiolat, petiol dahil 40 x 12 cm yaklaşık 5 segment parçalı; lateral segmentler linear lanseolat, 6-10 x 1-3 cm, pinnatifid, gevşekçe serrulat-dentat; terminal segment lanseolat 10 x 3-4 cm, pinnatisekt veya pinnat loblu; alt ve orta gövde yaprakları benzer fakat daha küçük, bipinnatisekt, üsttekiler pinnatisekt veya pinnat loblu, lanseolat veya linear. İnvolukrum glabroz, genişçe ovat 4 x 3 cm, tabanda hafifçe umbilikat. Fillariler mültiseriat, subkoriaseus, paral yeşil, belirgince boyuna siyahımsı yeşil çizgili, dış fillariler genişçe ovat, içtekiler oblong veya linear, 5 x 35- 5-10 mm, obtuz, kenarları düz, dar skarioz (1-1.5 mm). Çiçekler altın sarısı c. 5 cm, kıyıdağıklar seyrekçe radiant, steril, ligüller filiform; anter tübü parlak sülfür renginde, hafifçe çıkık. Akenler silindirik, glabroz 7-8 x 2-5 mm. Pappus çift, dış papus multiseriat, 17 mm ye kadar, içteki 1.5 mm. Çiçeklenme 6-7, yol kenarları, c 30 m.

Tip: Türkiye C1 Aydın: Selçuk- Davutlar, 7 km Davutlara, Strassrand, 30 m, 4 vii 1978, M. Nydegger 13015 (holo. Hb. Nydegger, Basel), Endemik, Doğu Akdeniz Elementi

Türün diğer bir alt popülasyonu kesintili bir şekilde Isparta, Uluborlu Barajı çevresindeki ağaçlandırma alanından bulunmuştur (Kaynak ve Tarımcılar, 2001). Ayrıca, Açık ve ark. (2009) türün genetik çeşitliliği ile ilgili olarak gerçekleştirdikleri bir araştırmada Muğla (Yatağan) ilinden bitki tohumlarını topladıklarını da belirtmişlerdir.



Şekil 3.1: *R.mykalea* 'nın doğal habitatının genel bir görüntüsü

3.2. YÖNTEM

R. mykalea bitkisinin vejetatif kısımları ve kapitulumları denemelerde başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Bitki kısımları, farklı gelişimsel dönemlerde bitkinin doğal yayılış gösterdiği Aydın ilinden (C1 karesi, Aydın-Kuşadası- Davutlar) 2006, 2007, 2008 ve 2009 yıllarının Mart - Eylül ayları arasında toplanmıştır.

Tür ile ilgili çalışmalar üç aşamada planlanmıştır. Bunlar:

1. Bitkinin yayılış gösterdiği Aydın lokalitesinde, doğal habitatu ve bitki ile ilgili gözlemler yaparak türün potansiyel tehdit unsurlarının belirlenmesi ile ilgili gözlemler.
2. Bitkinin *in vitro* çoğaltılmasına yönelik süreçlerin araştırılması.
3. *In vitro* süreçlerde süperoksit dismutaz, peroksidaz ve katalaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi.

3.2.1. Bitkinin Yayılışı, Habitat Gözlemleri ve Tehdit Unsurlarının Belirlenmesi Amacı ile Gerçekleştirilen Çalışmalar

Bu çalışmalar 2006, 2007, 2008 ve 2009 yıllarının Mart-Eylül ayları arasında belirli aralıklarla yapılan arazi çalışmalarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1. Bitkinin Yayılışı ve Habitat Gözlemleri

Bu çalışmalar sırasında bitkinin tip lokalitesi olan Kuşadası'nda yayılış gösteren popülasyonlarına ait gözlemler (Şekil 3.2-3.6) ve tehdit unsurları belirlenmiştir.



Şekil 3.2: Yol kenarında yayılış gösteren bitkilerin görüntüsü



Şekil 3.3: Tam ve bipinnat yapraklar ile vejetatif gelişme dönemi başlangıcında *R. mykalea*'nın görünümü



Şekil 3.4: Vejetatif dönemde bitkinin görünümü



Şekil 3.5: Çiçeklenme dönemindeki henüz açmamış kapitulümlerin görüntüsü



Şekil 3.6: *R. mykalea*'nın çiçeklerinin genel görüntüsü

3.2.1.2. Kapituluların Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi

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.

Tohum eldesi amacıyla Ağustos ve Eylül aylarında kuru kapitulular toplanarak laboratuara getirilmiştir. Arazide yapılan gözlemler sırasında kapitulular içerisinde çok fazla sayıda böceğe rastlanmıştır. Bu nedenle laboratuara getirilen kapituluların 20 tanesi olgun tohum sayısı, böcekler tarafından yenmiş tohum sayısı, olgunlaşmamış tohum sayısı ve boş tohum sayısı göz önüne alınarak değerlendirilmiştir.

3.2.1.3. İnektisit Uygulaması

Kapituluların değerlendirilmesinden sonra, böcekler tarafından gerçekleştirilen büyük ölçekli tahribatın önüne geçebilecek alternatif bir yöntem olabileceği düşünülen inektisit uygulaması çalışmaları yapılmıştır. Bu uygulama, türün doğal yayılış gösterdiği habitatta daha önceden belirlediğimiz dikenli telle çevrili bir alanda gerçekleştirilmiştir. Bu alan, deneysel materyallerimizin otlatılan hayvanlar tarafından yenmesinin engellenmesi, yapılan inektisit uygulamasının diğer canlılara zarar vermesinin önüne geçilmesi ve bitkilerin insanlar tarafından toplanılmasına engel olunması amacı ile seçilmiştir.

Doğada yaptığımız gözlemler sonucunda bitkide ve korolla tüpü içinde böceklere rastladığımızdan, bu konu ile ilgili denemeler *R. mykalea* 'nın döllemesinin böcekler aracılığı ile gerçekleşme olasılığı düşünülerek planlanmıştır. 2008 yılının Haziran ayında reproduktif evreye geçen bitkiler arazide seçilerek, inektisit (Merit 75 WP, 0.035 g/L) uygulaması yapılmıştır. Bu uygulamalar 3 farklı şekilde gerçekleştirilmiştir:

1. Uygulama: Henüz açılmamış (pre-anthesis) 15 kapitulum seçilerek, inektisit (püskürtme yoluyla) uygulamasından sonra kapitulular tülbent beziyle sarılarak bağlanmıştır (Şekil 3.7).
2. Uygulama: Açık kapitululardan (post-anthesis) 15 tanesi seçilerek inektisit uygulaması yapılmış (püskürtme yoluyla) ve uygulama yapılan kapitulular, üzerlerine bir parça ip bağlanarak işaretlenmiştir (Şekil 3.8).
3. Uygulama: Farklı 3 bölge seçilerek, birbirine yakın bitkilerin bulunduğu toprak üzerine sulama yoluyla inektisit uygulaması yapılmıştır.

3 hafta sonra bu uygulamalar tekrar edilmiştir. Temmuz ayı sonunda inektisit uygulanmış bitkiler araziden toplanarak laboratuara getirilmiş ve kapitulular değerlendirmeye alınmıştır.



Şekil 3.7: Antezis öncesi insektisit uygulanan bitki



Şekil 3.8: Antezisten sonra insektisit uygulanan bitki

3.2.2. *In vitro* Çoğaltım Çalışmaları

3.2.2.1. *In vitro* Çimlenme

Çimlenme denemelerinde *R. mykalea* bitkisine ait kapitulumlardan (Şekil 3.9) çıkarılan olgun tohumlar (akenler) (Şekil 3.10) başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Bu denemelerde açık kapitulumlara püskürtme yolu ile insektisit uygulanmış akenler kullanılmıştır. Püskürtme yolu ile insektisit uygulaması böcekler tarafından tahrip edilmemiş olgun tohum sayısında ciddi oranda artış sağladığı için denemelerde çok sayıda materyal sağlanabilmiştir.

3.2.2.1.1. Tohum Canlılık Testi

Tohum canlılığı, tohumun çimlenebilme ve normal bir fide oluşturma yeteneğidir (Dornbos, 1995). Tohumun çimlenme yeteneğinde olabilmesi için canlı olması gerekmektedir. Tohum canlılığını belirlemek amacıyla, Ağustos ve Eylül aylarında doğal ortamından toplanan tohumlara Tetrazolium testi (ISTA, 1966) uygulanmıştır. Bu testte canlılık, tohumlara 2,3,5 trifenil tetrazolium klorür (TTC) çözeltisi uygulaması sonucu kırmızı renk alıp almamaları ile belirlenmektedir. Bu amaç doğrultusunda % 0.1'lik TTC çözeltisi hazırlanmıştır. Tohum kabuklarının sert olması nedeniyle, tohumlar sıcak su ile muamele edildikten sonra, tohumların bir yarısı jilet yardımıyla uzaklaştırılmış ve geriye kalan yarıları bir petriye alınmıştır. Kesik tohumların üzerine önceden hazırlanmış TTC çözeltisi dökülmüş ve en az iki saat süre ile beklemeye bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda kırmızı renk alan tohum "canlı" olarak değerlendirilmiş ve canlı tohum sayısı yüzde olarak belirlenmiştir. Ayrıca sterilizasyon süresinin embriyoya zarar verip vermediğinin belirlenmesi için sterilize edilmiş tohumlara da tohum canlılık testi uygulanmıştır.

Zamana bağlı olarak değişen tohum canlılığının belirlenmesi için iki yıl boyunca 6 aylık aralıklarla tohumlara tetrazolium testi uygulanmış ve canlılıkta süreye bağlı bir azalma olup olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 3.9: *R. mykalea*'nın kuru kapitulularının görüntüsü



Şekil 3.10: Kuru kapitulumdan çıkarılan olgun bir akenin görüntüsü

3.2.2.1.2. *In vitro* Çimlenme Denemeleri İçin Yapılan Ön Hazırlıklar

Çalışmanın bu aşamasında *in vitro* çimlenme denemeleri için bazı ön hazırlıklar gerçekleştirilmiştir. *In vitro* çimlenme denemeleri için yapılan ön hazırlıklar kapsamında; saksıda gerçekleştirilen çimlenme çalışmaları, tohumların çimlendirileceği kavanozların ve besi ortamlarının hazırlanması, besi ortamlarının ve denemelerde kullanılan alet ve ekipmanların sterilizasyonu ile tohumların hazırlanması ve sterilizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Saksıda Gerçekleştirilen Çimlenme Denemeleri

Tohumlar, toplandıktan hemen sonra ve laboratuvar koşullarında saklama sonrası bir aylık periyotlarla toprağa ekilerek, bitkinin saksı koşullarında çimlenme denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu denemeler ile tohumların çimlenme fizyolojilerine ilişkin fikir verebilecek sonuçlara ulaşmak amaçlanmıştır.

Tohumların Çimlendirileceği Kavanozların ve Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Çalışmalarımızda tohumları kültüre almak için 190 veya 210 cc'lik geniş ağızlı ve 100 cc'lik dar uzun cam kavanozlar kullanılmıştır. Kavanozlar kağıt köprülü ve bilyeli kağıt köprülü olmak üzere 2 şekilde hazırlanmıştır. Kağıt köprülü kavanozlar için, ağızları kapalı boş kavanozlar, 105 kPa basınç altında 121°C'ta 25 dakika boyunca otoklavda steril edildikten sonra % 70'lik EtOH (etil alkol) ile silinerek (önceden 1 saat boyunca UV lamba çalıştırılmış) laminar hava akımlı steril çalışma kabini içerisine alınmışlardır. Kavanozların içerisine yerleştirilecek olan filtre kağıtları alüminyum folyo ile sarılarak 170 °C'ta ayarlanmış pastör fırınında 1 saat tutularak sterilize edilmiştir.

Filtre kağıtları kabin içerisinde steril eldiven kullanılarak katlandıktan sonra üzerlerinde tohumları taşıyabilmeleri için fiziksel destek sağlayacak köprüler oluşturacak şekilde kavanozlara yerleştirilmiştir. Daha sonra kavanozların ağızları

kapatılarak yeniden otoklavda 105 kPa basınç altında 121 °C'ta 25 dakika boyunca sterilize edilmişler ve kullanılacak ortamları dökmek üzere hazır hale getirilmişlerdir (Şekil 3.11). Ayrıca kağıt köprülerin katlanması sırasında kaynaklanabilecek kontaminasyondan kaçınmak için bilyeli kağıt köprülü kavanozlar hazırlanmıştır. 190 cc'lik kavanozların içerisine bant şeklinde filtre kağıdı konduktan sonra, kağıdın üzerine bilyeler yerleştirilmiş ve bant şeklindeki filtre kağıdı bilyelerin üzerine doğru katlanmıştır. Bu işlemi takiben yuvarlak halde kesilmiş filtre kağıtları bilyeler üzerine yerleştirilmiştir. Daha sonra kavanozların ağızları kapatılarak 121 °C'ta 25 dakika boyunca sterilize edilmişler ve kullanılacak ortamları dökmek üzere hazır hale getirilmişlerdir (Şekil 3.12).

Daha sonraki çalışmalarda ise olası kontaminasyondan diğer tohumların etkilenmemesi amacıyla tek tohum ekimi yapılabilecek kağıt köprülü-bilyeli dar kavanozlar kullanılmıştır. Bu kavanozlarda aynı şekilde hazırlanıp steril edilmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.11: Çimlenme için hazırlanan kağıt köprülü kavanoz.



Şekil 3.12: Çimlenme için hazırlanan bilyeli kağıt köprülü kavanoz



Şekil 3.13: Çimlenme için hazırlanan kağıt köprülü-bilyeli dar uzun kavanoz

Çimlenme denemelerinde tohumları kültüre etmek için MS (Murashige and Skoog, 1962) ve White (White, 1963) ortamları sıvı olarak hazırlanmış (Çizelge 3.1), distile su ortamı ise kontrol olarak kullanılmıştır. Doku kültüründe sıvı ortamın kullanımı genellikle mikroçoğaltımda maliyetin azaltılması olarak tanımlanır (Alvard *et al.*, 1993). Bu durumda *in vitro* çalışmalar için kullanılan eksplant plastik köpük, cam yünü, kaya yünü, filtre kağıdı köprüsü ve cam boncuklar ile desteklenebilmektedir (Chawla, 2002). Çimlenme denemelerinde kullanılan ortamlar aşağıda anlatıldığı 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 tartılarak 1000 mL'lik erlen içerisinde bir miktar distile su ile çözündürülmüştür.

Mikro besin elementleri, vitaminler ve aminoasitler için ise stok çözeltiler hazırlanmıştır. Stok çözeltiler, 5 mL içerisinde bir litre ortam içinde gerekli miktar bulunacak biçimde, 100 mL'lik stoklar halinde hazırlanarak koyu renkli şişelerde +4 °C'ta buzdolabında karanlıkta muhafaza edilmiştir.

In vitro çimlenme denemelerinde kullanılmak üzere, bitki büyüme düzenleyicileri için de stok çözeltiler hazırlanmıştır. KIN (Kinetin) NaOH'de, GA₃ (Giberellik asit) distile suda çözündürülmüştür. Bitki büyüme düzenleyicilerinin stok çözeltileri 5 mL'sinde 1 veya 0.1 mg/L madde olacak biçimde 20-30 mL'lik hacimde hazırlanmış ve çözeltilerin pH'sı 5.0'e ayarlanarak koyu renkli şişelerde +4 °C'ta buzdolabında karanlıkta muhafaza edilerek, amacına uygun kültür ortamlarında kullanılmıştır (Smith, 1992; Franklin ve Dixon, 1994; Gamborg ve Phillips, 1995; George, 1993). Kullanılacak bitki büyüme düzenleyicilerinden gereksinim duyulan miktar, pipet veya mikropipet kullanılarak ortamlara ilave edilmiştir.

Makro ve mikro besin elementleri, vitaminler, aminoasitler ve bitki büyüme düzenleyicileri tamamlanan besi ortamlarına ilave olarak sakkaroz eklenmiş ve tüm maddelerin çözülmesi sağlandıktan sonra solüsyonun hacmi distile su ilavesiyle son

hacme yakın bir yere kadar tamamlanmıştır. Besi ortamlarının pH'sı, 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl çözeltileri ile (Barnes, 1979; Fonnesbach ve Fonnesbach, 1980) distile su ve MS için 5.8'e, White ortamı için 5.5'e ayarlanmıştır.

Ortamlar 121°C'ta 15 dakika süreyle otoklavda steril edildikten sonra daha önceden steril edilen kavanozların her birine 40-50 mL olacak şekilde steril kabinde dağıtılmış ve kapların üzerine besi ortamının adı, hazırlanış tarihi, kullanılan bitki büyüme düzenleyicisi tipi ve miktarının yazılı olduğu etiketler yapıştırılmıştır. Hazırlanan tüm ortamlar soğuduktan sonra, kullanılıncaya kadar karanlık koşullar altında dolaplarda saklanmıştır.

GA₃ sıcaklıkla bozulan bir bitki büyüme düzenleyicisi olduğu için GA₃ ilave edilecek çimlenme ortamlarının pH'sı ayarlandıktan sonra son hacminin biraz altına kadar distile su ilave edilmiş ve ortamlar steril edilmiştir. Diğer taraftan GA₃'ün de stok solüsyonları gerekli miktarda hazırlandıktan ve pH'ı da ortamın pH'ına uygun olacak biçimde ayarlandıktan sonra laminar hava akımlı steril kabin içerisine alınmış 0.22 µm'lik filtre kullanarak steril edilmiştir. Hazırlanan stok GA₃, steril kabin içinde daha önceden steril edilmiş ortamlara, hesaplanan miktarlarda ilave edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicisi ve bileşenleri tamamlanan ortamlar steril şartlarda önceden hazırlanmış kavanozlara aktarılmıştır.

Tüm *in vitro* çalışmalar laminar akımlı steril çalışma kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya başlamadan yaklaşık bir saat önce kabinin iç ve dış kısmı % 70'lik EtOH ile silinmiştir. Daha sonra kabinin içinde bulunan UV lamba bir saat süre ile çalıştırılarak olası kontaminasyon önlenmeye çalışılmıştır.

Çizelge 3.1: Çimlenme denemelerinde kullanılan ortamların temel elementleri ve miktarları

	MS	White	Distile su
	(mg/L)	(mg/L)	
Makro elementler			
KNO ₃	1900	80.0	-
NH ₄ NO ₃	1650	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	720	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	-	-
KH ₂ PO ₄	170	68.0	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	300	-
KCl	-	65.0	-
Na ₂ SO ₄	-	200	-
NaH ₂ PO ₄	-	16.5	-
Mikro Elementler			
KI	0.83	0.75	-
H ₃ BO ₃	6.20	1.50	-
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	7.00	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60	3.00	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	-	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	-	-
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	-	-
Na ₂ EDTA	37.30	-	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80	-	-
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	2.5	-
Vitaminler ve Organikler			
Myo-inositol	100	-	-
Nicotinic acid	0.50	-	-
Pyridoxine-HCl	0.50	-	-
Thiamin-HCl	0.10	-	-
Glycine	2.00	-	-
Sukroz	30 g	20 g	-
pH	5.8	5.5	5.8

Alet ve Ekipmanların Sterilizasyonu

Ekim sırasında kullanılacak tüm alet ve ekipmanlar steril edilmiştir. Pens, bistüri, makas, erlen, kavanoz, beher, mikropipet uçları, cam petri v.b. malzemeler alüminyum folyo ile sarılarak veya ağızları kapatılarak, 121 °C'ta 20 dakika süreyle otoklavlanarak sterilizasyonları sağlanmıştır. Steril edilen malzemeler otoklavdan otoklav sepetiyle beraber hızlıca önceden ön uygulama yapılmış laminar hava akımlı çalışma kabinine alınmıştır.

Çalışma sırasında kullanılacak besi ortamlarını içeren kavanoz veya erlenler, olası kontaminasyonu önleyebilmek için, kabine alınmadan önce % 70'lik EtOH ile iyice silinmiştir.

Kabinde çalışmaya başlamadan önce eller ve kolların bir kısmı sabunla iyice yıkandıktan sonra zefiran veya EtOH (%70) kullanılarak dezenfekte edilmiştir. Tüm çalışmalar sırasında kabin içerisinde bulunan bek kullanılmıştır, kullanılan aletler ve özellikle de pens alkole batırıldıktan sonra ateşten geçirilerek olası kontaminasyonun engellenmesine çalışılmıştır.

Tohumların Sterilizasyonu

İçerisinde tohumları taşıyan akenler kapitulumdan çıkarıldıktan sonra bir takım morfolojik kriterler göz önüne alınarak seçilmiştir. Çimlenme denemeleri için, çizgili, dolgun, aynı morfolojik özelliğe ve büyüklüğe sahip olgun akenler kullanılmıştır.

Kapitulumlardan çıkarılan tohumların sterilizasyonlarının sağlanması için farklı sterilizasyon süreleri denenmiştir. Bunun için, akenler bir saat boyunca çeşme suyu altında yıkandıktan sonra bir beher içerisinde steril kabin içerisine alınıp 15 dakika boyunca % 70 lik EtOH ile muamele edilmiş ve daha sonra 3-4 damla tween 20 ilave edilmiş % 4.5'lik sodyum hipokloritte (NaOCl) farklı sürelerde (15, 20 ve 25 dakika) tutulmuştur. Daha sonra sterilizasyon ajanının etkisini gidermek için akenler 3 kez steril distile su ile durulanmıştır.

In vitro çimlenme denemelerinde bitki tohumlarının büyük oranda kontamine olması, steril başlangıç materyalinin elde edilmesini sınırlandırıcı bir faktör olarak karşımıza çıkmıştır. Bu nedenle daha önceden uygulanan sterilizasyon serilerine bir fungusit olan potasyum sorbat eklenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar potasyum sorbat'ın doku kültürü çalışmalarında etkili bir fungus inhibitörü olarak kullanıldığını göstermektedir (Guri ve Patel, 1998). Bu nedenle kontaminasyonu önlemek için, tohumlar akan çeşme suyu altında 1 saat boyunca tutulduktan sonra potasyum sorbat çözeltilerinde (%1, % 5 ve %10'luk) 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra tohumlar 15 dakika boyunca % 70 lik EtOH ile muamele edilmiş ve bu işlemi takiben 3-4 damla tween 20 ilave edilmiş % 4.5'lik NaOCl'de 25 dakika tutulmuştur. Bu işlemi takiben tohumlar, 3 kez steril distile su ile durulanmıştır. Ayrıca bir tohumdan kaynaklanabilecek olası kontaminasyonun diğer tohumları etkilememesi için denemeler dar uzun kavanozlarda, her kavanoza birer tohum olacak şekilde planlanmıştır.

3.2.2.1.3. *In vitro* Çimlenmeyi Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesi Denemeleri

Bu denemelerde *R. mykalea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine farklı *in vitro* ortamların, tohum dormansisinin kırılmasına yönelik olarak GA₃ ve KIN gibi bitki büyüme düzenleyicilerinin, soğuk uygulamasının, potasyum nitratın, testanın çizilmesi ve asitle muamelenin, pH'ın, ışık-karanlık uygulamalarının ve farklı sıcaklık değerlerinin etkisi araştırılmıştır. Çimlenme kriteri olarak radikula çıkışı esas alınmıştır. Çimlenme denemeleri her kavanoza 1'er tohum olacak şekilde 20 tekrarlı olarak yapılmıştır ve tüm denemeler 2 kez tekrar edilmiştir. Sonuçlar 6 hafta sonunda % olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.1.3.1. *In vitro* Ortamların Etkisi

Bu denemeler tohumlar toplandıktan hemen sonra ve -saksıda gerçekleştirilen çimlenme denemelerinden elde edilen veriler göz önünde bulundurularak- tohum toplanmasından 8 ay sonra olmak üzere iki farklı zamanda oluşturulmuştur. Steril edilen tohumlar öncelikle bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen sıvı MS, White ve

distile su ortamlarına kültüre edilmiştir. Kùltürler 24 ± 2 °C'ta 16/8 saat fotoperiyotta tutulmuştur.

3.2.2.1.3.2. Tohum Dormansisinin Kırılmasına Yönelik Gerçekleştirilen Çalışmalar

Dormansi tohumların çimlenmesini engelleyici bir faktördür ve çeşitli yöntemlerle tohumlarda bulunan dormansi kırılabilir. Dormansinin kırılmasına yönelik olarak gerçekleştirilen çalışmalarda saksı denemeleri göz önüne alınarak dormansi periyodunda olduğu düşünölen tohumlar kullanılmıştır.

Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Etkisi

Tohumlarda bulunan dormansiyi kırıcı metotlardan biri tohumların bitki büyüme düzenleyicileri uygulaması ile gerçekleşmekte olup, KIN ve GA₃ bu amaçla en çok kullanılan bitki büyüme düzenleyicileridir (Kocaçalışkan, 2008).

Bu denemelerde bir önceki denemenin en iyi sonucu olan distile su ortamı temel ortam olarak kullanılmıştır. Distile su ortamına bitki büyüme düzenleyicilerden KIN veya GA₃ tek başına (1, 2, 3 ve 4 mg/L) veya KIN:GA₃ kombinasyonları (KIN: GA₃; 1:1, 1:2, 1:3, 1:4; 2:1, 2:2, 2:3, 2:4; 3:1, 3:2, 3:3, 3:4; 4:1, 4:2, 4:3 ve 4:4 mg/L) halinde ilave edilmiştir. Ortam pH'ı 5.8'e ayarlanmıştır. Kùltürler 24 ± 2 °C'ta 16/8 fotoperiyot altında tutulmuştur.

Soğuk Uygulamasının (Stratifikasyon) Etkisi

Dormansi kırıcı metotlardan biri de tohumlara soğuk uygulamasıdır (Kocaçalışkan, 2008). Tohumlar + 4 °C'de 1 ve 2 ay boyunca tutulduktan sonra sterilize edilerek *in vitro* çimlenme denemeleri oluşturulmuştur. Sterilizasyon işlemi uygulanan tohumlar pH'ı 5.8'e ayarlanmış Distile su içeren kavanozlara aktarılmıştır. Kùltürler 24 ± 2 °C'ta 16/8 fotoperiyot altında tutulmuştur.

Potasyum Nitratın Etkisi

Potasyum nitrat (KNO_3) gibi nitrojen bileşikler çimlenmeyi teşvik etmektedir (Vardar, 1982; Schmidt, 2000). Çimlenmeyi teşvik etmek amacıyla %0.5, %1, %5 ve %10'luk potasyum nitrat çözeltileri hazırlanarak daha önceden hazırlanmış kavanozlara dökülmüş ve kavanozlar steril edilmiştir. Sterilizasyon işlemi uygulanmış tohumlar KNO_3 içeren kavanozlara aktarılmış ve kültürler 24 ± 2 °C'ta 16/8 fotoperiyod koşullarında kültüre edilmiştir.

Testanın Çizilmesi (Skarifikasyon) ve Asitle Muamele

Meyve veya tohum kabuğunun suya geçirimsiz olması tohumlarda iç dormansi faktörüdür. Tohumlarda var olan bu dormansi faktörünü ortadan kaldırmak amacıyla çeşitli yöntemler uygulandığı bilinmektedir (Özer ve ark. 1998).

Testanın çizilmesi veya asitle muamele, testası sert ve geçirimsiz tohumlarda kullanılan çimlenmeyi teşvik edici (dormansiyi kırıcı) yöntemlerden biridir (Kocaçalışkan, 2008). Tohumların sert bir testaya sahip olması ve *in vitro* şartlarda düşük oranda çimlenme elde edilmesi nedeniyle sterilizasyon sonrası tohumların bir kısmı jilet yardımıyla çizilmiş, diğer bir kısmı ise 30 sn süre ile konsantre sülfürik asit (H_2SO_4) ile muamelesi yapılmıştır. Daha sonra tohumlar pH'ı 5.8'e ayarlanmış distile su içeren kavanozlara aktarılmıştır. Kültürler 24 ± 2 °C'ta ve 16/8 fotoperiyot altında tutulmuştur.

3.2.2.1.3.3. Işığın Etkisi

Bu denemeler, saksıda gerçekleştirilen çimlenme denemelerinden elde edilen veriler göz önünde bulundurularak, tohum toplanmasından 8 ay sonra oluşturulmuştur. Çimlenme üzerine ışığın etkisini araştırmak için pH'ı 5.8 olarak ayarlanmış distile su ortamlarına aktarılan tohumları içeren kavanozların bir kısmı, 24 ± 2 °C'ta karanlıkta ve bir kısmı ise 16/8 saat fotoperiyota maruz bırakılmıştır.

3.2.2.1.3.4. Farklı pH Değerlerinin Etkisi

Özer ve ark. (1998) toprak asiditesinin çimlenme üzerine etkisinin az olduğunu belirtmişlerdir. Ancak tohum çimlenmesinde pH isteği, diğer çevre faktörlerinde olduğu gibi türler arasında farklılık göstermektedir. ISTA (The International Seed Testing Association = Uluslararası Tohum Test Birliği) tarafından tohum çimlenmesi için toprak ve su sisteminde pH'ın 6.0-7.5 olması gerektiği ifade edilmiştir (Baskin ve Baskin, 2001).

Bu denemeler de, tohum toplanmasından 8 ay sonra oluşturulmuştur. *R. mykalea* tohumlarının çimlenmesi üzerine pH'ın etkisini araştırmak için laboratuvar koşullarında en az 8 ay bekletilen tohumlar steril edildikten sonra pH'ı 5.8, 7.5 ve 8.5'e ayarlanmış distile su içeren bilyeli kağıt köprülü kavanozlara aktarılmıştır. Kültürler 24±2 °C'ta 16/8 fotoperiyot altında tutulmuştur.

3.2.2.1.3.5. Sıcaklığın Etkisi

Bitkilerde çimlenme ve gelişme sıcaklığı, tür özelliğine ve ekolojik şartlara bağlı olarak değişmektedir. Sıcaklığın optimum dereceye kadar artması ile genellikle çimlenmede bir artış görülür. Çimlenmenin sabit bir sıcaklıkta mı yoksa değişen sıcaklıklarda mı en yüksek olduğu konusunda farklı çalışmalar olmasına karşın, tohumların doğal ortamlarında değişken sıcaklıklara maruz kaldığı bilinmektedir (Baskin ve Baskin, 2001).

Tohum çimlenmesi üzerine sıcaklığın etkisini araştırmak için laboratuvar koşullarında en az 8 ay bekletilen tohumlar steril edildikten sonra pH'ı 7.5' e ayarlanmış distile su ortamı içeren bilyeli kağıt köprülü kavanozlara aktarılmıştır. Kültürler farklı sıcaklıklarda (15, 18, 25 ve 35 °C) ve karanlıkta tutulmuşlardır.

3.2.2.2. Embriyo Kültürü Çalışmaları

Bu denemelerde Haziran ve Temmuz aylarında (2006, 2007 ve 2008 yıllarında) bitkinin doğal habitatından toplanan yeşil kapitulumlarının akenleri içinde yer alan olgunlaşmış ve olgunlaşmamış zigotik embriyolar başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Bu özellikteki kapitulumlar böcekler tarafından tahrip edilmediği için denemelerde az sayıda kapitulumdan çok sayıda materyal elde edilebilmiştir.

Gelişim Dönemine Göre Kapitulumların ve Akenlerin Sınıflandırılması

Doğada ve laboratuarda yapılan gözlemler sonucunda kapitulumların farklı morfolojik evrelerde olduğu görülmüştür. Bu nedenle bitkinin reproduktif evresinde toplanılarak laboratuvar koşullarına getirilen kapitulumlar morfolojik görünümleri baz alınarak, akenler ise gelişim dönemlerine (a, b, c, d ve e-tipi aken) göre sınıflandırılmıştır.

Aken Sterilizasyonu

Denemelere başlamadan önce kapitulumlar içerisinden alınan akenler için farklı sterilizasyon süreleri uygulanmıştır. Akenler sterilizasyona tabi tutulmadan önce yarım saat boyunca akan çeşme suyu altında yıkanmıştır. Eksplantlar için uygun sterilizasyon süresini belirlemek amacı ile % 70'lik EtOH ve % 4.5'lik NaOCl kullanılmış ve eksplantlar çizelge 3.2'de gösterilen sürelerde bu çözeltilerde muamele edilmiştir. Her denemede sodyum hipoklorit çözeltisine 2 damla Tween-80 ilave edilmiştir. Akenler 3 kez steril distile suyla durulandıktan sonra içlerinde yer alan embriyolar ince uçlu pens ve bistüri yardımıyla izole edilerek kontaminasyonun erken tespitine yönelik olarak Patates Dekstroz Agar (PDA, Sigma) ortamlarına aktarılmıştır. Bu ortam hazırlanırken 39 g PDA tartılarak 1000 ml hacimli bir kaba konduktan sonra üzerine eklenen bir miktar distile su ile çözünmesi sağlanmış ve daha sonra çözelti üzerine distile su ilave edilerek son hacme kadar tamamlanmıştır. Çözelti manyetik karıştırıcıda homojen hale getirildikten sonra 40-50 mL ortam, etiketli 190 veya 210 cc'lik cam kavanozlara dökülmüş ve ağzı kapatılan kavanozlar, otoklavda 121 °C'ta 105 kPa basınç altında 15 dakika süreyle steril edilmiştir. Sterilizasyon

sonrası kavanozlar otoklavdan çıkarılarak düz bir zeminde soğumaya bırakılmış ve kullanılana dek karanlık bir dolapta muhafaza edilmiştir.

PDA'ya aktarılan eksplantlar 24 °C'ta, 3 gün boyunca bekletilmiş, bu sürenin sonunda uygun sterilizasyon süresini belirlemek amacı ile gözlemler yapılmıştır. Her sterilizasyon serisi için her kavanoza 5 eksplant gelecek biçimde toplam 20 eksplant kültüre edilmiştir.

3.2.2.2.1. Embriyo Kültürü İçin Kullanılan Ortamlar ve Kültür Koşulları

Embriyo kültürü denemelerinde Murashige & Skoog (1962) (MS) besi ortamı temel ortam olarak kullanılmıştır (Çizelge 3.1). MS besi ortamı BA, KIN ve TDZ'nin farklı konsantrasyonları (BA: 0.1, 0.2, 0.5 ve 1 mg/L; KIN: 0.1, 0.2, 0.5 ve 1 mg/L ve TDZ: 0.001, 0.005, 0.01 ve 0.05 mg/L) ile desteklenmiştir. Herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamı ise kontrol olarak kullanılmıştır. Besi ortamlarına %3 sukroz ve % 0.8 (w/v) agar-agar (Sigma) ilave edilmiştir. Denemelerde alt kültürlemeler 4 haftalık aralıklarla gerçekleştirilmiştir. Her deneme bir kavanoza 5 eksplant gelecek biçimde 4 tekrarludur ve tüm denemeler 3 kez tekrar edilmiştir. Kültürler 16/8 fotoperiyot 24±2°C'ta tutulmuş, 4 haftalık aralıklarla alt kültür edilmiştir. Değerlendirmeler kültürün başlamasından 4 hafta sonra % kallus oluşumu ve % çimlenme şeklinde yapılmıştır. Tüm verilerin ortalamaları ve standart hatalar SPSS 9 programı kullanılarak hesaplanmıştır. Farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiş 0.05 önem düzeyinde Duncan Çoklu Oran Testi ile karşılaştırılmıştır.

Çizelge 3.2: Embriyo kültürü denemelerinde eksplantlara uygulanan sterilizasyon serileri

Sterilizasyon işlemi uygulanan eksplant sayısı	Uygulama süresi (dakika)	
	% 70'lik EtOH	% 4.5'lik NaOCl + 2 damla Tween-80
20	3	3
20	3	6
20	5	3
20	5	6
20	5	8
20	8	8
20	8	10

3.2.2.3. Somatik Embriyogenez Çalışmaları

Somatik embriyogenez çalışmaları için a ve b tipi olgunlaşmamış zigotik embriyolar eksplant olarak kullanılmıştır. Eksplantlar embriyo kültürü denemelerinde belirtildiği şekilde steril edilmiştir. Steril edilen eksplantlar embriyo kültürü denemelerinin cevapları baz alınarak (embriyo kültürü denemelerinde tek başına sitokinin uygulaması embriyogenik olmayan (sarımsı-yeşil-kırılgan) kalluslar vermiştir), oksin: sitokinin kombinasyonu içeren MS ortamlarında (NAA:BA; 0.25:1; 0.5:1; 1:1; 5:1 mg/L ve 2,4-D:BA; 0.25:1; 0.5:1; 1:1; 5:1 mg/L) kültüre alınmışlardır. Herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamı ise kontrol olarak kullanılmıştır. Besi ortamlarına %3 sukroz ve % 0.8 (w/v) agar-agar (Sigma) ilave edilmiştir. Her deneme bir kavanoza 5 eksplant gelecek biçimde 4 tekrarludur ve tüm denemeler 3 kez tekrar edilmiştir. Kültürler $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ta karanlıkta tutulmuş, 4 haftalık aralıklarla alt kültür edilmiştir.

Embriyogenik yapıdaki kalluslar, somatik embriyo farklılaşması ve gelişimi için BA (0.1, 0.5, 1 ve 2 mg/L) ilaveli ve kontrol olarak herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamlarına aktarılmışlardır. Besi ortamlarına %3 sukroz ilave edilmiş ve % 0.8 (w/v) agar-agar (Sigma) ile de katılaştırılmıştır.

Farklılaşma için belirlenen optimum BA konsantrasyonu ilaveli ortam farklı sukroz kombinasyonları (%3, % 6 ve % 12) ile desteklenerek kalluslardan somatik embriyo farklılaşması, olgunlaşması ve çimlenmesi üzerine sukroz miktarının etkisi araştırılmıştır.

Her iki denemede bir kavanoza 4 eksplant gelecek biçimde 3 tekrarludur ve tüm denemeler 2 kez tekrar edilmiştir. Kültürler 16/8 fotoperiyotta $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ta tutulmuş, 4 haftalık aralıklarla alt kültür edilmiştir.

İyi gelişmiş somatik embriyolar (kotiledon evredeki), bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen %3 sukroz ilaveli MS ortamına bitkiciğe dönüştürülmek amacıyla aktarılmıştır. Kültürler $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ta 16/8 fotoperiyotta tutulmuştur.

Tüm verilerin ortalamaları ve standart hatalar SPSS 9 programı kullanılarak hesaplanmıştır. Farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiş 0.05 önem düzeyinde Duncan Çoklu Oran Testi ile karşılaştırılmıştır.

3.2.2.4. Aksiller Sürgün Çoğaltımı Denemeleri

Aksiller sürgün çoğaltımı denemelerinde, daha önceki denemeler sırasında elde edilen, e-tipi akenlerden gelişen 4 haftalık steril fidecikler başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Primer köklerinden ayrılan fidecikler, BA veya KIN'in farklı konsantrasyonlarını (0.1, 0.5, 1 ve 2 mg/L) içeren MS besi ortamlarında kültüre alınmışlardır. Herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamı kontrol olarak kullanılmıştır.

Denemelerde elde edilen sürgünler köklenme teşviki için stok kültürlerden ayrılarak NAA, IAA ve IBA'nın farklı konsantrasyonlarını (0.1, 0.5, 1, 2 ve 5 mg/L) içeren ve kontrol olarak herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ve ½ MS ortamlarında kültüre edilmişlerdir. Köklenen bitkicikler kademeli olarak dış ortamlara aktarılmışlardır.

Tüm denemelerde alt kültürlemeler 4 haftalık aralıklarla gerçekleştirilmiştir. Her deneme bir kavonoza bir eksplant gelecek biçimde 15 tekrarludur ve tüm denemeler 3 kez tekrar edilmiştir. Kültürler 24 ± 2 °C'ta, 16/8 fotoperiyot altında tutulmuşlardır.

Aksiller sürgün çoğaltımı denemelerinin sonuçları eksplant başına sürgün sayısı ve ortalama sürgün uzunlukları göz önüne alınarak 3. alt kültür sonunda, köklenme denemelerinin sonuçları ise kültür başlangıcından 6 hafta sonra % olarak değerlendirilmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı, ortalama sürgün uzunlukları ve köklenme verilerinin ortalamaları ve standart hatalar SPSS 9 programı kullanılarak hesaplanmıştır. Köklenme oranına ait sonuçlar $x' = \arcsin \sqrt{(x/100)}$ dönüşümü yapılarak analiz edilmiştir. Farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiş 0.05 önem düzeyinde Duncan Çoklu Oran Testi ile karşılaştırılmıştır.

3.2.2.5. Adventif Sürgün Teşviki Denemeleri

Bitkinin vejetatif dönemde olduğu Mart, Nisan ve Mayıs aylarında (2006, 2007 ve 2008 yıllarında) doğal habitatından toplanan bipinnatisekt yaprakları *in vitro* adventif sürgün teşviki denemelerinde başlangıç materyali olarak kullanılmıştır.

Bu amaç doğrultusunda, yaprak eksplantlarına farklı sterilizasyon süreleri uygulanmıştır. Yapraklar sterilizasyona tabi tutulmadan önce bir saat boyunca akan çeşme suyu altında yıkanmıştır. Yaprak eksplantlarının sterilizasyonu için etil alkol (EtOH) ve sodyum hipoklorit (NaOCl) ile hazırlanan farklı sterilizasyon serileri kullanılmış ve her denemede, yaprak dokularına girişimini kolaylaştırmak ve sterilizasyon etkinliğini arttırmak için, sodyum hipoklorit çözeltisine 2 damla Tween-80 ilave edilmiştir (Çizelge 3.3).

Sterilizasyona tabi tutulan yapraklar 3 kez steril distile su ile durulandıktan sonra 1 cm'lik parçalara ayrılarak PDA ortamlarına aktarılmıştır. Kültürler 24 °C'ta, 3 gün boyunca bekletilmiş, bu sürenin sonunda kontamine olmuş eksplant yüzdesi, kararan eksplant yüzdesi ve cevap verebilir eksplant yüzdeleri belirlenmiştir.

Araziden toplanan yapraklar, PDA'ya ekim sonucunda belirlenen uygun sterilizasyon işlemlerinden sonra, yaklaşık 1'er cm'lik parçalara bölünerek BA (0.1, 0.5, 1 ve 5 mg/L), KIN (0.1, 0.5, 1 ve 5 mg/L), TDZ (0.001, 0.005, 0.01, 0.05 mg/L) NAA (0.1, 0.2, 0.5 ve 1 mg/L) ve 2,4-D'nin (0.1, 0.2, 0.5 ve 1 mg/L) farklı konsantrasyonlarını içeren MS besi ortamlarında kültüre alınmışlardır. Herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi ilave edilmemiş ortam kontrol olarak kullanılmıştır. Denemeler her kavanoza 5 eksplant gelecek biçimde 3 tekrarlıdır ve tüm denemeler 4 kez tekrar edilmiştir.

Kültürler 4 haftalık aralıklarla alt kültüre edilmiş ve değerlendirmeler kültür başlangıcından yaklaşık 4 hafta sonra % kallus oluşumu şeklinde yapılmıştır.

Çizelge 3.3: Yaprak eksplantları sterilizasyonu için uygulanan sterilizasyon işlemleri

Deneme numarası	Sterilizasyon işlemi uygulanan eksplant sayısı	Uygulama süresi (dakika)	
		% 70'lik EtOH	% 4.5'lik NaOCl + 2 damla Tween-80
1	40	2	3
2	40	2	5
3	40	2	7
4	40	3	3
5	40	3	5
6	40	3	7
7	40	5	3
8	40	5	5
9	40	5	7
		% 70'lik EtOH	%3 NaOCl+ 2 damla Tween-80
10	40	2	3
11	40	2	5
12	40	2	7
13	40	3	3
14	40	3	5
15	40	3	7
16	40	5	3
17	40	5	5
18	40	5	7

Kalluslar adventif sürgün teşviki için tek başına NAA (0.1, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/L) veya BA'nın farklı konsantrasyonlarını (1.0, 2.0 ve 4.0 mg/L) ve NAA:BA'nın farklı kombinasyonlarını (0.1:1.0; 0.1:2.0; 0.1:4.0; 0.5:1.0; 0.5:2.0; 0.5: 4.0; 1.0:1.0; 1.0:2.0; 1.0: 4.0; 2.0: 1.0; 2.0:2.0; 2.0:4.0 mg/L) içeren MS ortamlarına aktarılmışlardır. Herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen temel MS ortamı kontrol olarak kullanılmıştır. Denemeler her kavanoza 3 kallus gelecek biçimde 5 tekrarludur ve tüm denemeler 3 kez tekrar edilmiştir. Kùltürler 4 haftalık aralıklarla alt kùltür edilmiştir. Değerlendirmeler kallus başına sürgün sayısı ve ortalama sürgün uzunlukları göz önüne alınarak 2. alt kùltür sonunda yapılmıştır.

Adventif sürgün rejenerasyonu denemelerinden elde edilen sürgünler köklenme teşviki için stok kùltürlerden ayrılarak (~3 cm) köklendirilmek amacıyla, IAA, IBA ve NAA'nın farklı konsantrasyonlarını (0.5, 1.0, 2.0 ve 5.0 mg/L) içeren MS ve ½ MS ortamlarına aktarılmışlardır. Köklenen bitkicikler kademeli olarak dış ortamlara aktarılmışlardır.

Denemeler her kavanoza bir sürgün gelecek şekilde 15 tekrarludur ve tüm denemeler 2 kez tekrar edilmiştir. Köklenme denemelerinin sonuçları kùltür başlangıcından 6 hafta sonra % olarak değerlendirilmiştir.

Adventif sürgün çoğaltımı denemelerinin tüm aşamaları $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ta 16/8 fotoperiyot koşulları sağlanmış iklim odasında gerçekleştirilmiştir. Tüm verilerin ortalamaları ve standart sapmalar SPSS 9 programı kullanılarak hesaplanmıştır. Köklenme oranına ait sonuçlar $x' = \arcsin \sqrt{(x/100)}$ dönüşümü yapılarak analiz edilmiştir. Farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiş, 0.05 önem düzeyinde Duncan Çoklu Oran Testi ile karşılaştırılmıştır.

3.2.3. Antioksidan Enzim Aktiviteleri Belirleme Çalışmaları

Çalışmalarımız sırasında *in vitro* koşullarda somatik embriyogenez ve organogenez süreci boyunca farklılaşma ve gelişmeyi etkileyen biyokimyasal faktörlerin etkisi belirlenmiştir. Çözülebilir total protein miktarını ve antioksidan enzimlerdeki değişimleri belirlemek amacıyla kültürün başlangıcından itibaren her hafta 0.5 g örnek alınarak sıvı azot içerisinde dondurulmuş ve daha sonra -80°C'ta korunarak, analizler için saklanmıştır

Organogenez sürecinde antioksidan enzim düzeylerini belirlemek amacıyla adventif sürgün oluşturma denemelerinde, kallus oluşumu için belirlenen en iyi ortam olan 1 mg/L NAA ilaveli MS ortamına yaprak eksplantları kültüre edilmiştir. Dört hafta sonunda elde edilen kalluslar biyokütle artışı sağlanmadan kallustan sürgün rejenerasyonu sırasındaki antioksidan enzim aktivitesini belirlemek amacıyla 0.5 mg/L NAA ve 2 mg/L BA ilaveli MS ortamlarına aktarılmışlardır.

Somatik embriyogenez çalışmalarında antioksidan enzim düzeylerini belirlemek amacıyla olgunlaşmamış zigotik embriyolar, somatik embriyogenez denemelerinde maksimum kallus oluşumunun elde edildiği 0.25 mg/L NAA ve 1 mg/L BA ilaveli MS ortamına kültüre edilmiştir. İki alt kültür sonunda kalluslar somatik embriyogenez çalışmalarında embriyogenik kalluslardan somatik embriyo farklılaşmasının en yüksek değerinin elde edildiği 0.1 mg/L BA ve % 6 sukroz ilaveli MS ortamlarına aktarılmışlardır.

3.2.3.1. Enzim Ekstraksiyonu ve Çözülebilir Protein Miktarının Belirlenmesi

0.5 g olarak saklanan örnekler; 10 µl 0.1 M PMSF (Phenyl methyl sulfonyl fluoride), 1 mL ekstraksiyon ortamı (50 mL 0.1 M potasyum fosfat tamponu pH=7.8, 2 mM EDTA , % 10 gliserol) ve % 2 lik PVP (Polyclar AT) ile buz içerisinde porselen havan kullanarak homojenize edilmiş ve homojenantlar 12000 g'de 30 dakika boyunca 4°C'ta santrüfjlenmiştir. Elde edilen süpernatantlar enzim analizleri için kullanılmıştır.

Tüm örneklerde çözülebilir protein miktarı Bradford (1976) yöntemine göre BSA (Bovine Serum Albumin) standartları kullanılarak yapılmıştır. Örnekler 1.5 mL Bradford reaktifi ilave edildikten sonra vortekslenerek, oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiş ve 595 nm'de absorbans değerleri alınmıştır. Uygun hacimde alınan ve gerekli oranda seyreltilen kallus ekstraktlarındaki toplam suda çözünen protein miktarları, BSA standartları (0.1-0.8 mg/mL) ile oluşturulan kalibrasyon eğrisinden faydalanılarak mg g^{-1} yaş ağırlık olarak belirlenmiştir.

3.2.3.2. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Örneklerdeki süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) içeriği, Beauchamp ve Fridovich (1971) yöntemine göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bu yöntem 560 nm'de NTB'nin (Nitrotetrazolium blue) fotokimyasal indirgenmesinin, örnekte bulunan SOD enzimi tarafından inhibe edilmesine dayanır. Reaksiyon karışımı (3 mL); 0.05 M Na-fosfat tamponu (pH 7.8), Nitrotetrazolium blue (NTB, 33 μM), L-Methionine (10 mM), Na_2EDTA (0.66 mM) ve Riboflavin (0.0033 mM) içerir. Reaksiyonun gerçekleşmesi için örnekler 10 dakika oda sıcaklığında ışık altında bekletilmiş ve bu süre sonunda örneklerin 560 nm'deki absorbans değerleri alınmıştır. Enzim aktivitesi, NTB'nin % 50 inhibisyonu için gerekli SOD miktarı bir enzim ünitesi olarak hesaplanmış ve spesifik enzim aktivitesi, enzim ünitesi $\text{mg protein}^{-1}\text{g}$ yaş ağırlık⁻¹ olarak belirlenmiştir.

3.2.3.3. Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Peroksidaz enzim aktivitesi (PO; EC 1.11.1.7) Herzog ve Fahimi (1973) metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Peroksidaz, H_2O_2 'i elektron alıcısı olarak kullanarak substratların oksidasyonunu katalizler. Bu yöntemde, substrat olarak 3,3'-diamino benzidin tetrahidroklorit (DAB) kullanılmakta ve 465 nm'de bu substratın oksidasyonu sonucu kahve-kırmızı oksidasyon ürününün oluşması sağlanarak, oksidize-DAB oluşum oranı da enzim aktivitesi olarak belirlenmektedir.

Reaksiyon karışımı (3 mL); DAB çözeltisi (0.4 mM DAB; 0.009 g DAB + 25 mL %50 w/v jelatin + 25 mL 0.15 M Na-fosfat-sitrat tamponu), H₂O₂ (3 mM; % 0.6) ve enzim ekstraktından oluşmakta, körde hidrojen peroksit yerine ise H₂O kullanılmaktadır. Bir enzim ünitesi, dakikada 1 µmol H₂O₂'i parçalayan enzim miktarı olarak hesaplanmıştır. Spesifik enzim aktivitesi, enzim ünitesi mg protein⁻¹g yaş ağırlık⁻¹ olarak belirlenmiştir.

3.2.3.4. Katalaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz aktivitesi (CAT; EC 1.11.1.6) Beers ve Sizer (1952) metoduna göre 240 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Katalaz aktivitesi, 0.05 M potasyum fosfat tamponu (pH 7) içinde 0.059 M H₂O₂ içeren ortamda belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı (3 mL), 1.9 mL H₂O, 1.0 mL H₂O₂ ve 0.1 mL enzim ekstraktından oluşmaktadır. Özel koşullar altında (25 °C, pH 7) 1 µmol H₂O₂'in parçalanması için gerekli enzim miktarı bir ünite olarak değerlendirilmektedir. Spesifik enzim aktivitesi, enzim ünitesi mg protein⁻¹g yaş ağırlık⁻¹ olarak belirlenmiştir.

Çözülebilir protein miktarı ve antioksidan enzim belirleme denemelerinde denemeler en az iki tekrarludur ve tüm denemeler 2 kez tekrar edilmiştir. Veriler tüm tekrarların ortalaması şeklinde gösterilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Bitkinin Yayılışı ve Habitat Gözlemleri

Bitkinin boyu Flora of Turkey (Davis *et al.*, 1988) deki deskripsiyonunda yaklaşık 1 metre olarak belirtilmesine rağmen, bizim gözlemlerimiz bitki boyunun 2.5 metreye kadar ulaşabildiğini göstermektedir.

2006 yılının Haziran ayında Kuşadası'nda gerçekleştirilen arazi çalışmalarında, bitkinin tip lokalitesinin bulunduğu alanda (N 37 47.39; E 027 16.58) (I. alan) şehirleşmenin yoğun bir şekilde devam ettiği, yazlık bir sitenin (Şimdiki adı ile Meltem sitesi) yapılmaya başlandığı ve çok az sayıda bireyin bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1). Türün sıçramalı yayılış gösterdiğinin bilinmesi nedeni ile bitkinin yayılış gösterdiği yeni alanların bulunmasını hedefleyen arazi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sırasında, Yaylaköy bitiminde zeytinlikler arasında bitkinin yayılış gösterdiği yeni bir alan belirlenmiştir (N 37 47.01; E 027 19.16) (II. Alan)



Şekil 4.1: *R. mykalea*'nın tip lokalitesi görüntüsü (2007)

2007 yılında yine aynı alanlara yapılan arazi çalışmalarında daha önceden sözü edilen I. alanda inşaat çalışmalarının devam ettiği ve Yaylaköy bitiminde bitkinin yayılış gösterdiği II. alanda ise bir sulama havuzunun yapılmış olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2). Bu çalışmalar sırasında II alanda daha önceki gözlemlerimize göre bireylerin yoğun yayılış gösterdiği bölgede, otların yakılması (Şekil 4.3) ve su kanalı açmak için toprağın kazılması (Şekil 4.4) gibi nedenlerle büyük bir tahribat yapılmıştır. Bu nedenle bölgeye yakın tüm yerler dolaşarak yeni yayılış alanları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu alanın 500-600 m yukarısında yaklaşık 300 m² lik bir alanda toplam 36 birey sayılmıştır. Daha yüksek bölgeler de dolaşmış, ancak bireye rastlanmamıştır. II. alanın karşısına denk gelen bölgede (N 37 46 54; E 027 19 18) ise yaklaşık 1 km²'lik alanda toplam 19 birey sayılmıştır.

Arazi çalışmalarının devam ettiği sırada dikenli telle çevrelenmiş bir alanda (kişiye özel bir arazi) *R. mykalea* bitkisine ait çok sayıda bireye rastlanmıştır (N 37 46 58; E 027 19 24) (III. alan) (Şekil 4.5 ve 4.6). Olasılıkla insan ve hayvan etkisinin olmadığı bu bölgede kalan bitkiler nispeten korunmuştur. Fakat daha sonraki arazi çalışmalarında bu bölgeye doğru bir yol açıldığı gözlenmiş ve inşaat bekçisi ile yapılan görüşmede, arazi sahibinin dikenli telle çevrili bu alana bir bina yaptırmayı hedeflediği öğrenilmiştir. Ayrıca bu telle çevrili alanın dışında da bireylere rastlanmış ancak bu alanlarda da villa tipi yapılaşmanın başladığı gözlenmiştir.

2008 yılının Temmuz ayında yapılan arazi çalışmalarında daha önceki yıllarda 8-10 birey bulunan 1. alanda hiçbir bireye rastlanmamıştır. 2. alanda 32 birey, 3. alanda ise 160 birey sayılmıştır. 3. alanda, araziye çeviren tel örgülerin yer yer söküldüğü ve alandaki bitkilerinde tahribata uğradıkları görülmüştür.



Şekil 4.2: Yaylaköy lokalitesinde sulama havuzu görüntüsü



Şekil 4.3: Su kanalı ve sulama havuzu yapma amacıyla yakılmış otlar



Şekil 4.4: Su kanalı açmak için sürülen ve kazılan arazi



Şekil 4.5: Dikenli telle çevrelenmiş arazi görüntüsü



Şekil 4.6: Dikenli telle çevrilmiş alanda *R. mykalea* yoğun popülasyonunun görüntüsü

2009 yılının Haziran ayında hem bilinen alanlarda bulunan bireylerin durumunu değerlendirmek, hem de yeni yayılış alanları bulmak amacı ile yaptığımız arazi çalışmalarında, Yaylaköy-Kuşadası yolu üzerinde yer alan telle çevrili alana gidilmiş ve bu alanda bitkilerin büyük ölçüde tahribata uğradığı gözlenmiştir (Şekil 4.7). Bir önceki yıl tellerin söküldüğü yerden arazi içerisine girilmiş ve bitki kapitulumları olasılıkla yemek yapma amacı ile hasat edildiği, bitkilerin vejetatif kısımlarına ise dokunulmadığı belirlenmiştir. Önceki yıllarda bu alanda 160 birey varlığı söz konusu iken bu yıl 38 tam birey (kapitulumlu) sayılmıştır. Bu alana yakın bölgede önceki yıl devam eden 2 villa inşaatının tamamlandığı ve bu alanın hemen yanında yeni bir inşaat çalışmasının başladığı gözlenmiştir (Şekil 4.8). Yapılan inşaatlar sonucunda yol yapımı amacı ile arazinin düzleştirildiği ve bu yol yapımı sırasında arazide yer alan bireylerin yok edildiği gözlenmiştir. 1. alanda herhangi bir birey (Şekil 4.9) bulunmamasına rağmen bu alanın hemen yakınında (N 37 47 630, E 027 16.983) 28 birey sayılmıştır. Devam eden gözlemler sonucu 2. alanda 85 birey ve 3. alanda ise 38 bireyin varlığı saptanmıştır.

Ayrıca 2009 yılında Kuşadası-Davutlar-Güzelçamlı güzergâhında yeni yayılış alanları arayışı çalışmalarına devam edilmiş ve iki yayılış alanı daha bulunmuştur.

Bu alanların birincisi buğday tarlası içinde yer almaktadır (N 37 46 720, E 027 16.441) ve bu tarlanın alt tarafında tarla açma ile şeftali yetiştiriciliği yapılmaktadır (Şekil 4.10). Bu yayılış alanı toplam 38 bireyle temsil edilmektedir. İkinci yayılış alanı (N37 46 265, E 027 16.689) ise yine bir yamaçta zeytinlik ile ekin tarlası arasında kalan, sürülmüş alanda bulunmuştur. Bu alanda toplam 12 adet birey sayılmıştır.

2008 ve 2009 yıllarında yapılan arazi gözlemleri ve birey sayımları Kuşadası ve civarında 500' den az bireyin (338-288) yaşama savaşı verdiğini göstermiştir.



Şekil 4.7: Kapitulumları hasat edilmiş bitkilerin görünümü



Şekil 4.8: Türün yayılış gösterdiği korunmuş alanın hemen yanında inşaat yapımı



Şekil 4.9: 2009 yılında *R. mykalea*'nın tip lokalitesinin görünümü



Şekil 4.10: Buğday tarlası arasında yer alan bireyler

4.1.1. Kapitulumlarla İlgili Gözlemler

2006-2009 yılları arasında belirli aralıklarla (Haziran ve Eylül ayları arasında) bitkinin olgunlaşmamış zigotik embriyolarını içeren taze kapitulumları ve olgun akenlerini içeren kuru kapitulumları üzerinde arazide ve laboratuvar koşullarında morfolojik gözlemler yapılmıştır. Olgun kapitulumlardaki akenlerin (özellikle olgun görünümlü tohumların) böcekler tarafından büyük ölçüde tahrip edildiği görülmüştür (Şekil 4.11 ve 4.12). Yeşil (taze) kapitulumlardaki böcek sayısının ise olgun kapitulumlara göre çok daha az sayıda olduğu gözlenmiştir. Post-anthesis döneminde çiçekler üzerinde çok sayıda böceğe rastlanmıştır (Şekil 4.13 ve 4.14). Ayrıca henüz döllenmenin gerçekleşmediği çiçeklerde korolla tübü boyunca siyah böceklere de rastlanmıştır (Şekil 4.15).

Bu gözlemler sonrası rastgele 20 tane kapitulum alınarak, bunların içerisinde bulunan kahverengi (açık kahve) tohumlar olgun tohum, beyaz ve cılız tohumlar olgunlaşmamış tohum, sadece pappusu ve meyva kabuğu oluşmuş tohumlar da boş tohum olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4. 1).



Şekil 4.11: Böcekler tarafından tahribata uğratılmış olgun akenler



Şekil 4.12: Bir böcek larvası tarafından zarar verilmiş akenler

Çizelge 4.1: Olgun kapitulumdan çıkarılan akenlerin değerlendirilmesi

Kapitulum Sayısı	Olgun Tohum Sayısı	Böcek Tarafından Yenmiş Tohum Sayısı	Olgunlaşmamış Tohum Sayısı	Boş Tohum Sayısı
1	2	5	7	75
2	11	-	18	83
3	-	15	1	60
4	-	3	-	72
5	-	3	2	58
6	2	-	3	42
7	3	-	26	30
8	10	-	16	95
9	8	-	16	94
10	2	7	12	93
11	-	3	5	114
12	-	2	12	66
13	-	3	-	35
14	-	3	-	36
15	3	1	5	67
16	-	69	-	22
17	-	-	1	36
18	1	-	10	-
19	-	69	-	20
20	-	-	10	43



Şekil 4.13: Antezis döneminde çiçek ve çiçek üzerindeki böceklerin görünümü



Şekil 4.14: Antezis döneminde bir çiçek görüntüsü



Şekil 4.15: Henüz döllenme olmamış çiçekte korolla tüpü boyunca böcek görüntüsü

Tüm bu gözlemler sonucunda;

1. Akenlerin hepsinin monomorfik olduğu ve pappus taşıdığı belirlenmiştir. Monomorfik ve pappuslu aken üretimi *Centaurea solstitialis* dışındaki pek çok *Centaurea* türü için yaygın bir durumdur (Callihan *et al.*,1993).
2. Aken gelişimi sentripetal şekilde gerçekleşmektedir. Benzer durum, dimorfik akene sahip olan *C. solstitialis* için (Maddox *et al.*, 1996) ve monomorfik akene sahip *C. zeybekii* için (Kurt, 2005) de belirtilmiştir.
3. Tohum kabuğu çok sert bir yapıya sahiptir.
4. Tohumların büyük ölçüde boş olduğu görülmüştür.

5. Tohumlar böcekler tarafından büyük ölçüde tahrip edilmektedir. Tohumda böceklerin ergin, pupa ve larva gibi farklı evrelerde buldukları, öncelikle endospermden beslendikleri ve bu şekilde zarar yaptıkları belirlenmiştir. Bu tahribat daha çok olgun tohumlarda gözlenmiş, olgunlaşmamış zigotik embriyoları içeren tohumlarda ise herhangi bir tahribat olmadığı görülmüştür.
6. Böceklerin tanınması için yapılan çalışmalar sonucunda *Larinus* ve *Phytoecia* cinslerine ait böcek türlerine rastlanmıştır.

4.1.2. İnsektisit Uygulaması

Kapituluların değerlendirilmesinden sonra, böcekler tarafından gerçekleştirilen büyük ölçekli tahribatın önüne geçebilecek alternatif bir yöntem olabileceği düşünülen insektisit uygulama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda insektisit uygulaması yapılan bireyler toplanarak laboratuara getirilmiş ve değerlendirmeler yapılmıştır. Gerçekleştirilen değerlendirmeler sonucunda, pre-anthesis döneminde olan kapitulum üzerlerine püskürtme ile insektisit uygulandıktan sonra üzerlerinin tülent bezi yardımıyla sarıldığı birinci uygulamada kapitulular da herhangi bir böcek yeniğine, böcek larvasına rastlanmamış, ancak döllemenin de gerçekleşmediği gözlenmiştir. Bu durum bize, bitkide döllemenin böcekler yardımıyla gerçekleştiğini göstermektedir.

Anthesis sonrası püskürtme yoluyla insektisit uygulaması yapılmış 2. uygulama'nın yapıldığı kapitulularda ise, sadece 2 kapitulumda 10 adet akenin böcekler tarafından yendiği gözlenmiş, diğer kapitulularda herhangi bir böcek veya böcek yeniğine rastlanmamış, ayrıca olgun tohum sayısının da yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum da bize, böcekler tarafından olan tahribatı engellemek için yapılacak insektisit uygulamasının, döllemenin gerçekleşmiş ve açık olan kapitulular üzerine doğrudan yapılmasının, aken tahribatını önlemede geçerli bir çözüm olabileceğini göstermektedir.

İnsektisit uygulamasının toprak üzerine sulama yoluyla yapıldığı 3. uygulamada bitkilerden alınan kapitulularda böcek yeniğine rastlanmış olmasına rağmen,

insektisit uygulanmamış bitkilerden çıkarılan akenlere nazaran daha az sayıda böcek tahribatı olduğu gözlenmiştir.

4.2. *In vitro* Çoğaltım Çalışmaları

4.2.1. *In vitro* Çimlenme

Bitkilerde, neslin devamlılığını sağlayan yapı tohumdur. Yeni oluşacak bitkinin minyatür halini (embriyo) ve gelişecek fideye besin rezervi olarak endospermi taşıyan tohum, yapısal ve fizyolojik olarak dağılmaya uygun rol üstlenmiştir (Bewley, 1997; Koornneef *et al.*, 2002). Tohum dağılımı ve çimlenme gibi farklı evreler üzerine edinilen bilgiler nadir, endemik ve tehdit altındaki türlerin nadirlik fenomeninin kapsamlı biçimde anlaşılmasına katkı sağlayabilir ve türlerin koruma idaresi kararlarına yardım edebilir (Menges, 1986). Laboratuarda kontrollü koşullarda gerçekleştirilen *in vitro* çimlenme denemeleri ile türlerin tohum çimlenme özellikleri ile ilgili çarpıcı sonuçlara ulaşılabilir. Çimlenme denemelerinde çizgili dolgun, aynı morfolojik özelliğe ve büyüklüğe sahip tohumlar kullanılmıştır.

4.2.1.1. Tohum Canlılık Testi

Tohumların çimlenebilmeleri için canlı olmaları gerekmekte ve bu canlılığının belirlenmesi için değişik testler uygulanabilmektedir. Bunlardan biri olan tetrazolium testi, tohumdaki respirasyon enzimlerinin aktivitesine bağlı 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 canlılığına, tohumdaki dokuların boyanıp - boyanmamasına göre karar verilir (ISTA, 1966).

Araziden toplanan kapitulumlardan çıkarılan akenlere uygulanan tetrazolium testi sonucunda çok az boyanan ve koyu kırmızı renk alan embriyolar (Şekil 4.16) sırasıyla % 5 ve % 80 olarak belirlenmiştir. Tohumların % 15'inde ise herhangi bir renk oluşumu gözlenmemiştir. Leveck (1962) tarafından belirlenen yöntem dikkate alınarak az boyanan embriyoların canlı olmadığı varsayılmış tohum canlılığı % 80 olarak

belirlenmiştir. Sterilizasyon süresinin embriyoya zarar verip vermediğinin belirlenmesi için uygulanan tetrazolium testi sonuçları, sterilizasyonun embriyo canlılığını etkilemediğini göstermiştir. Ayrıca iki yıl boyunca 6 aylık aralıklarla uygulanan tetrazolium testi sonuçlarına göre canlılıkta süreye bağlı bir azalma olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.16: Tetrazolium testi sonucunda tam boyanmış bir embriyo görüntüsü

4.2.1.2. Tohumların Sterilizasyonu

Tohumlara uygulanan sterilizasyon serilerinden en yüksek oranda steril kültür yüzdesi (%40) 25 dakikalık NaOCl uygulaması ile elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

In vitro çimlenme denemelerinde bitki tohumlarının büyük oranda kontamine olması, steril başlangıç materyalinin elde edilmesininin sınırlayıcı bir faktör olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle daha önceden uygulanan sterilizasyon serilerine bir fungusid olan potasyum sorbat eklenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki fungusit uygulaması kontaminasyon yüzdesini azaltmıştır (Çizelge 4.3). % 10'luk potasyum sorbat çözeltisinde 1 saat boyunca tutulan tohumların, NaOCl ile 25 dakikalık sterilizasyonu sonrası %80 oranında steril kültürler elde edilmiştir.

Doku kültürü koşullarında kontaminasyon kültürün her aşamasında meydana gelebilmektedir. Ancak bu çalışmada kontaminasyonun neredeyse tamamının tohum kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Özellikle funguslar tohum kabuğunun üzerinde oluşmaya başlamakta daha sonra yayılmaktadır. Bazı durumlarda ise çimlenmenin başlaması ile birlikte kontaminasyon oluşmakta ve steril şartlarda bitkinin gelişmesine izin vermeden bitkiciği öldürmektedir. Bu durum bize olgun tohumlarda yüzeysel sterilizasyon ile engellenemeyen içsel bir kontaminantın varlığını düşündürmüştür.

Çizelge 4.2: Tohumların sterilizasyonu üzerine NaOCl süresinin etkisi

% 4.5 NaOCl + 3-4 damla Tween 20 uygulama süresi (dakika)	Steril Kültür Yüzdesi (%)
15	20
20	36
25	40

Çizelge 4.3: Tohumlara uygulanan farklı fungusid sürelerinin steril kültür üzerine etkisi

Potasyum Sorbat Çözeltisi (%)	Steril kültür yüzdesi (%)
1	60
5	65
10	80

4.2.1.3. Saksıda Gerçekleştirilen Çimlenme Denemeleri

Ana bitkiden ayrılan tohumların hemen çimlenmedikleri ve bir dinlenme fazına girdikleri bilinmektedir (Mayer ve Poljakoff-Mayber, 1982; Taiz ve Zeiger, 1998). Primer dormansi olarak tanımlanan bu dinlenme hali, ılıman iklim kuşağında bulunan birçok bitki tohumunda görülür ve bu durumdaki tohumlar, çevresel uyarıya cevap vermez (Vegis, 1964; Schütz, 1997). Saksı denemelerinde doğal ortamından toplanan ve laboratuvar koşullarında (20-25 °C, % 50-60 nem) saklanan olgun tohumlar ancak 8. ayın sonunda dormansi periyodlarını tamamlamışlardır. Bu şekilde kendini gösteren primer dormansi *Centaurea tchihatcheffi*'de 9 ay olarak belirlenmiştir (Çakırlar ve ark., 2005). 8. ayın sonunda toprağa ekilen tohumlar % 70 oranında çimlenme göstermişlerdir (Şekil 4.17). Tohum canlılığının % 80 olduğu göz önüne alınırsa bu değer oldukça yüksek olduğu görülmektedir.



Şekil 4.17: Toprakta çimlenmiş bitkicikler

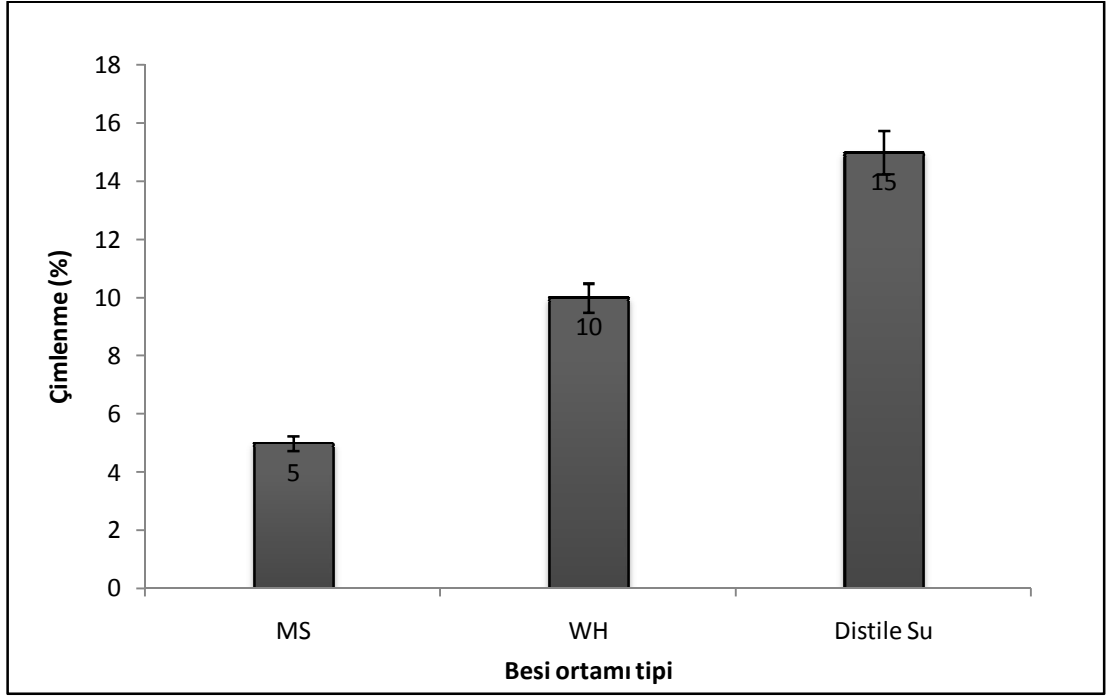
4.2.1.4 *In vitro* Çimlenmeyi Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesi

Çimlenme bitki yaşamının başlaması için ilk aşamadır. Bu aşama dinlenme halindeki kuru tohumların su alması ile başlar (imbibisyon) ve genellikle radikula gibi embriyonik eksenin belirmesi ile son bulur. Değişen çevresel şartlara adaptasyonun bir sonucu olarak her tür, çimlenme için belirli koşullara ihtiyaç duyar (Harper *et al.*, 1970; Stebbins, 1971; Fenner, 1985; Meyer ve Monsen, 1991; Schütz ve Milberg, 1997).

In vitro çimlenme denemelerinin ilkinde, *R. mykalea*'nın *in vitro* çimlenmesi için en uygun ortam araştırılmıştır. Bu deneme hem tohumlar toplandıktan hemen sonra saksı sonuçlarından elde edilen veriler göz önünde bulundurularak tohum toplanmasından 8 ay sonra olmak üzere 2 farklı zamanda oluşturulmuştur. Tohum toplanmasından hemen sonra kurulan denemelerde hiçbir ortamda çimlenme gözlenmemiştir. Bu durum tohum dormansisi savını destekler görünümündedir.

İkinci denemede ise denenen tüm ortamlarda çimlenme gözlenmiştir. En yüksek çimlenme yüzdesi distile su ortamında (% 15) elde edilmiştir ve bunu sırasıyla White (% 10) ve MS (%5) ortamları izlemiştir (Şekil 4.18 ve 4.19). MS ve White (WH) ortamları mineral besin maddeleri içerikleri bakımından birbirinden farklıdır, en yüksek mineral besin maddesi içeren ortam MS ortamıdır. Distile su ortamı ise herhangi bir mineral besin maddesi içermemektedir. Elde edilen çimlenme yüzdeleri tüm ortamlarda çok düşük olmasına rağmen, çimlenme yüzdesinin ortamların içerdiği mineral besleyicilerin miktarı ile ilişkili olduğu söylenebilir. Ortamlarda bulunan mineral besleyici içeriği artıkça çimlenme oranında azalma gözlenmiştir. Yüksek mineral besleyici içeren ortamlarda çimlenme yüzdesinin az olmasının veya hiç olmamasının nedeni mineral besleyici oranındaki artışın negatif ozmotik potansiyele neden olmasındandır (Kauffman, 1969).

Khan ve Gulzar (2003), en yüksek çimlenme yüzdesini distile su ortamında elde etmişler ve besi ortamındaki mineral besleyici oranındaki artışla çimlenme yüzdesi arasında ters bir orantının olduğunu bildirmişlerdir. Kurt ve Erdağ (2009) *Centaurea zeybekii* tohumlarını MS, B5, WH ve distile su ortamlarında *in vitro* kültüre almışlar ve en yüksek çimlenme oranını distile su ortamında elde etmişlerdir.



Şekil 4.18: Farklı *in vitro* ortamlarda tohum çimlenme yüzdeleri (8 ay saklama sonrası)

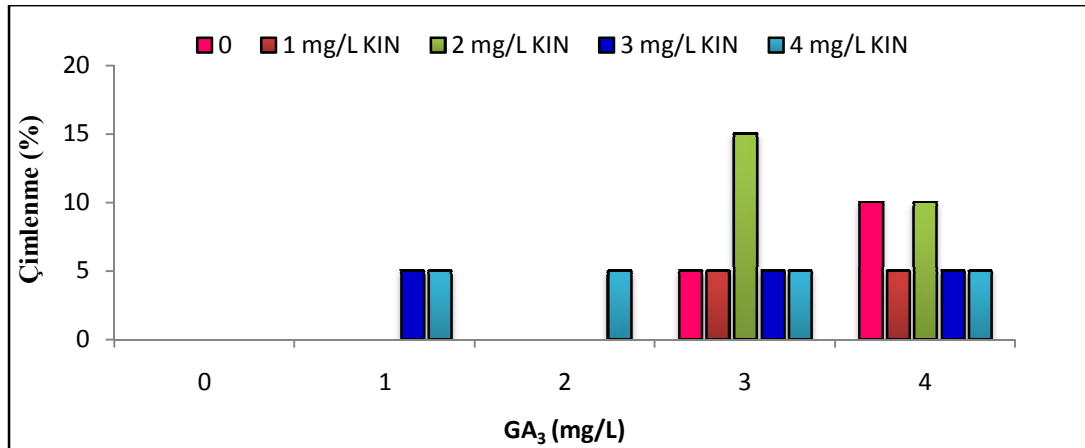


Şekil 4.19: Distile suda *in vitro* olarak çimlenmiş bir bitkiciğin görünümü

Birçok bitki tohumunda canlılık oranı yüksek olmasına rağmen çimlenen tohum miktarı oldukça düşüktür. Bunun sebebinin tohumlardaki güçlü dormansiden kaynaklandığı bilinmektedir (Baskin ve Baskin, 2001; Koger *et al.*, 2004). Tohumun çimlenme için uyarılmasında veya dormansi periyoduna girmesinde bitki büyüme düzenleyicilerin düzeylerinin etkili olduğu, çimlenmenin başlamasında gibberellik asidin önemli rol oynadığı ve dormant tohumlarda absisik asidin etkisini ortadan kaldırıp, nişasta ve depo proteinlerin hidrolizini hızlandırarak tohum çimlenmesini uyardığı bilinmektedir (Cardemil ve Rainero, 1982). Khan (1971) çimlenmede gibberellinlerin, sitokinlerin ve ABA'nın sırasıyla temel, açık ve engelleyici etkilerinin olduğuna dair bir model önermiştir. Bu modele göre, ABA varlığında çimlenme sadece hem sitokinin ve hem de gibberellin varlığında gerçekleşir, sadece gibberellin varlığında çimlenme gerçekleşebilmesi ise ABA yokluğuna bağlıdır. ABA nükleik asit (Walbot *et al.*, 1975) ve protein sentezini engelleyicidir (Fountain ve Bewley, 1976).

Ekzojen olarak uygulanmış bitki büyüme düzenleyicilerinden gibberellinler (özellikle gibberellik asit GA_3 ve GA_{4+7}) ve sitokinler (özellikle KIN ve BA) birçok tohum türünde dormansiyi kırmışlardır (Dweikat ve Lyrene, 1989; Karam Al-Salem, 2001; Mehanna *et al.*, 1985; Iglesias ve Babiano, 1997).

Bu bilgilerin ışığı altında dormansiyi kırmak amacı ile dormansi sürecinde olan tohumlar KIN ve/veya GA_3 ilaveli distile su ortamına aktarılmıştır. Bu uygulamalar sonucunda farklı oranlarda çimlenme elde edilmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: *R.mykalea* tohumlarının çimlenmesi üzerine GA_3 ve KIN'in etkisi

Tek başına KIN içeren ortamlarda çimlenme gözlemlenmemiştir. GA₃'ün düşük konsantrasyonları da tek başına çimlenmede etkili değildir, ancak 3 ve 4 mg/L GA₃ içeren ortamlarda sırası ile % 5 ve % 10 oranlarında çimlenme elde edilmiştir. En yüksek çimlenme değeri 3 mg/L GA₃ ve 2 mg/L KIN kombinasyonunu içeren distile su ortamında elde edilmiştir (% 15).

Dormansiyi kırıcı uygulamalardan biri de stratifikasyondur. Stratifikasyon sırasında tohumların hormon seviyelerinde (Taylorson ve Hendricks, 1977), metabolik yollarda (Bogatek ve Lewak, 1988) enzimatik yapı ve aktivitelerinde değişimler (Rychter ve Lewak, 1971; Podstolski *et al.*, 1974) ile solunum hızında artış (Alscher-Herman *et al.*, 1981) meydana gelmektedir. Birçok türde dormansi, nemli tohumların 0 ve 10 °C arasındaki düşük sıcaklıklarda 7-180 gün boyunca bırakılması ile kırılabilir (Bewley ve Black, 1982). Bu amaçla 1 veya 2 ay boyunca (+ 4°C'ta) soğukta muhafaza edilen (stratifikasyon) tohumlarla oluşturulan denemelerde, soğuk uygulaması tohumda bulunan primer dormansiyi kırmada etkili olmamış yani tohumlar çimlenmemiştir. Dormansinin kırılması için gerekli soğuk uygulama süresi türden türe farklılık göstermektedir. Dolayısıyla *R. mykalea* tohumlarına 2 aylık soğuk uygulaması dormansinin kırılmasına yeterli gelmemiş olabilir.

Potasyum nitrat (KNO₃) gibi kimyasalların dormansiyi kırarak çimlenmeyi teşvik ettiği de bilinmektedir (Kevseroğlu, 1993; Hartmann *et al.*, 1997). Bu amaçla kurulan denemelerimizde de dormansi periyodunda bulunduğu düşünülen tohumlar kullanılmış ancak hiçbir konsantrasyonda çimlenme elde edilememiştir. Bu deneme sonucunda potasyum nitratın *R. mykalea* tohumlarının dormansisini kırmak için etkili bir kimyasal olmadığı sonucuna varılmıştır.

Bir tohum su ve gaz alış verişi olmadan çimlenemez. Bazı tohumlarda meyve veya tohum kabuğu bu alış verişi engelleyebilmektedir. Meyve veya tohum kabuğunun suya, erimiş gazlara, özellikle oksijene ve karbondioksit'e karşı geçirimsiz olması çimlenmeyi engelleyici bir faktördür. Ayrıca, meyve veya tohum kabuğunun embriyonun büyümesine engel olacak yeterlilikte olduğu kabul edilen mekanik bir kuvvete sahip olması ve bünyelerindeki kimyasal engelleyicilerin varlığı ile çimlenmeyi engelleyebilmektedir (Vardar, 1982; Özer ve ark., 1998; Eira ve Caldas,

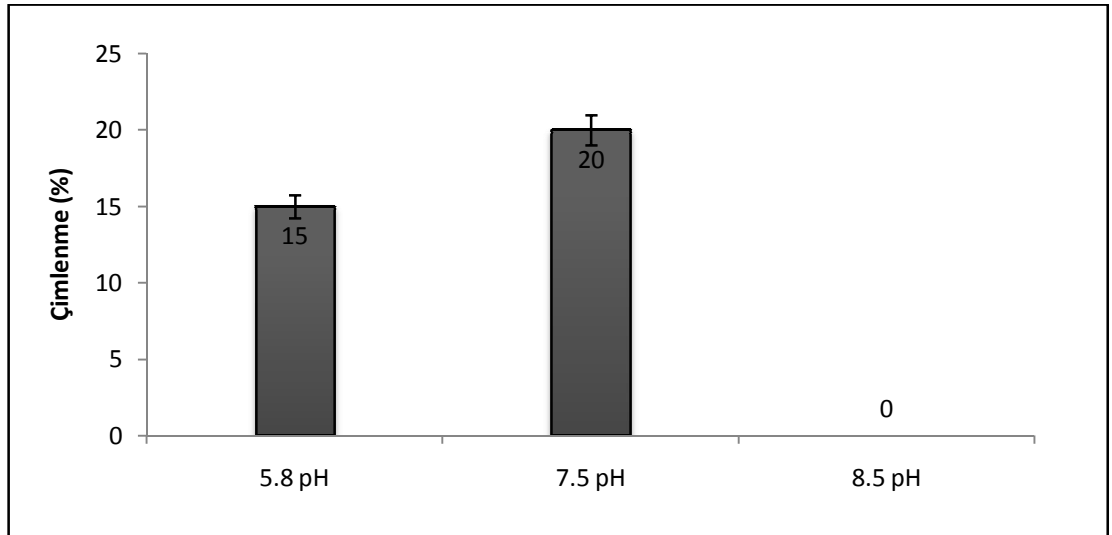
2000). Bu bilgilerin ışığı altında gerçekleştirilen testanın çizilmesi ve sülfürik asit (H_2SO_4) ile muamelesi denemelerinde çimlenme gözlenmemiştir. Toprakta ve daha sonra yapılan çimlenme denemelerinde çimlenme gözlenmiş olması, tohum kabuğunun sert olmasına rağmen suya veya oksijene karşı geçirimsiz olmadığını düşündürmektedir.

Yukarıda sözü edilen tüm uygulamalara rağmen, doğal ortamından hemen toplama sonrası kullanılan ve dormansi periyodunda olan tohumların dormansisi kırılmamıştır. Bu nedenle *R. mykalea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine ışığın-karanlığın etkisini araştırmak için gerçekleştirilen altıncı denemede, araziden toplandıktan sonra laboratuvar koşullarında 8 ay bekletilen tohumlar kullanılmıştır. Yaptığımız denemenin sonuçlarına göre *R.mykalea* tohumları karanlık koşullarda %14 çimlenme yüzdesi gösterirken, aydınlıkta bu oran %15 olarak belirlenmiş ve çimlenme yüzdeleri karşılaştırıldığında ışık ve karanlık uygulamaları arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır. Tohumların bazısı ışıkta, bazısı karanlıkta çimlenir. Bazı tohumlar ise bu anlamda nötr'dür (Yentür, 1982). Işığın şiddeti, dalga boyu ve süresi çimlenmeyi etkilemektedir (Benvenuti ve Macchia 1997; Densmore 1997; Noranha *et al.*, 1997, Leinonen ve Chantal, 1998). Bazı türlerin tohumları çimlenme için ışığa gereksinim göstermesine rağmen, bazı türlerde ışıkta bırakma çimlenmeyi engellemektedir (Devlin, 1975). *R. mykalea*'nın çimlenmesi üzerine ışığın etkisi bulunmamaktadır, yani tohumlar bu konuda nötr'dür diyebiliriz. Yapılan bir çalışmada *Centaurea zeybekii*'nin tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine ışık ve karanlık etkisi araştırılmış ve ışık- karanlık uygulamaları arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır (Kurt ve Erdağ, 2009). Çelik ve Yücel (2008)'in CR kategorisinde bulunan *Centaurea hausknetchii*'nin tohumlarının çimlenmesi üzerine gerçekleştirdikleri bir araştırmada ise 16/8, 8/16 fotoperiyod ile karanlık koşullarda farklı oranlarda (sırasıyla % 69.2, % 58.5 ve % 42) çimlenme elde etmişler ve araştırmacılar ışığın çimlenme üzerine teşvik edici bir etkisi olduğunu belirtmişlerdir.

In vitro tohum çimlenmesi üzerine pH'ın etkisini araştırmak amacıyla gerçekleştirilen denemede çimlenme üzerine pH'ın etkili olduğu ve en yüksek değer (% 20) pH'sı 7.5'e ayarlanmış distile su ortamında elde edildiği görülmüştür (Şekil 4.21). 7.5 pH değerinden daha yüksek pH'da ise çimlenme gözlenmemiştir.

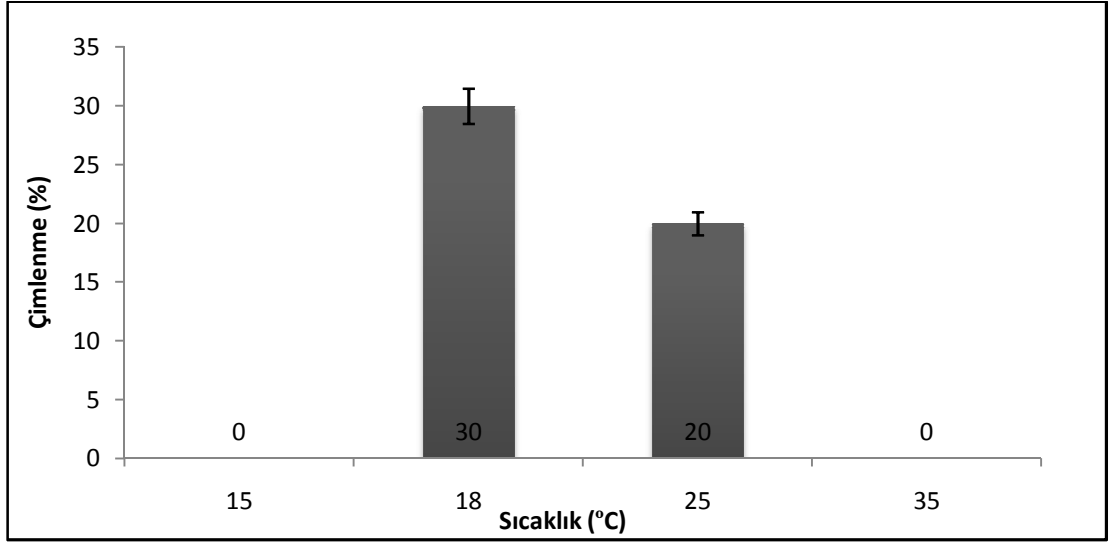
Çakırlar ve ark. (2005) *Centaurea tchihatcheffii* tohumlarının çimlenmesi üzerine pH etkisini araştırmışlar ve çimlenme için en uygun pH değerinin 7.5 olduğunu belirtmişlerdir. Bu bulgular bizim sonuçlarımızla paralellik göstermektedir. Baskin ve Baskin (2001)'a göre çimlendirme çalışmalarında laboratuvar sonuçlarıyla doğa koşulları arasında farklılık gözlenmektedir. Laboratuvar çalışmalarında tohumlara sadece tampon solüsyonlar uygulanmakta ancak, buna karşı toprakta pH'ı etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bununla birlikte bazı tohumlar geniş pH aralığında çimlenebilirken, bazı türlerin çimlenebilmesi için sabit pH değeri gereklidir.

Denemelerimizde *R. mykalea* tohumlarının çimlenmesi üzerine pH'ın oldukça önemli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.21: *R. mykalea* tohumlarının çimlenmesi üzerine pH'ın etkisi

Tohum çimlenmesi üzerine sıcaklığın etkisini araştırmak için oluşturulan denemede sterilizasyona tabii tutulan tohumlar pH'ı 7.5'e ayarlanmış distile su ortamlarına aktarılmıştır. Kùltürler farklı sıcaklıklarda ve karanlıkta tutulmuşlardır. Bu denemeler sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.22'de gösterilmektedir. Düşük sıcaklık (15 °C) ve yüksek sıcaklıkta (30 °C) çimlenme gözlenmezken, 18 ve 25 °C'de çimlenme gözlenmiş, maksimum çimlenme ise 18 °C'ta (% 30) gerçekleşmiştir. Elde edilen bulgulara göre sıcaklık çimlenme üzerinde etkili bir faktördür. Çimlenme için en uygun sıcaklık 18 °C olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.22: *R. mykalea* tohumlarının çimlenmesi üzerine sıcaklığın etkisi

Centaurea tchihatcheffii ile yapılan bir çalışmada da sıcaklık çimlenme üzerine etkili bir faktör olarak bulunmuş ve çimlenme için en uygun sıcaklığın 25 ± 2 °C olduğu belirtilmiştir (Çakırlar ve ark., 2005). Kurt ve Erdağ (2009) tarafından yapılan bir başka araştırmada *Centaurea zeybekii* tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine sıcaklık etkili bir faktör olarak bulunmuş ve maksimum çimlenme 25°C'ta % 80 olarak belirlenmiştir.

Toprak koşullarında çimlenme yüzdesi % 70 iken, *in vitro*'da en yüksek değer % 30 olarak elde edilmiştir. Doku kültüründe en uygun eksplant kaynağını daha önceden steril edilmiş tohumlardan elde edilen steril fideler oluşturmaktadır. Çünkü bu şekilde elde edilen eksplantların sterilizasyon işlemine ihtiyacı olmamakta ve yüzey sterilizasyonunun zararlı etkilerinden sakınılmaktadır. Bizim denemelerimizde tohum sterilizasyonu için kontaminasyonu engelleyebilmek amacıyla fungusit kullanımı steril kültür yüzdesine oldukça etkili olmasına karşın, radikula çıkışı sonrasında da kontaminasyonun olması ve çimlenmiş fideciklerin zamanla ölümüne neden olması içsel bir kontaminantın varlığını göstermektedir. Ayrıca sterilizasyon yapmadan saksılara ekilen tohumların yüksek çimlenme yüzdesi göstermesi mikroorganizma ya da mikroorganizmalar tarafından desteklenen bir çimlenme ilişkisini de düşündürmektedir.

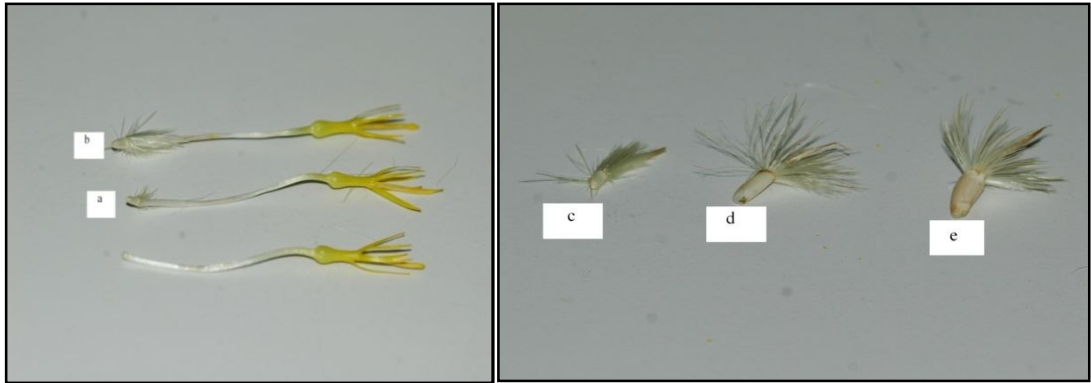
Bu nedenlerden dolayı *in vitro* çimlenme sonucunda elde edilen fidelerin ileriki çalışmalarda kullanılması pek sağlıklı olmayacağından, çimlendirilmiş tohumlardan elde edilen fideler daha sonraki *in vitro* çalışmalar için başlangıç materyali olarak kullanılmamıştır.

4.2.2. Embriyo Kültürü

Kapitulumların morfolojik değerlendirmeleri sırasında, aynı bitki üzerindeki kapitulumların farklı gelişim dönemlerine sahip olduğu (Şekil 4.23) görülmüş ve bir kapitulum içinde 2 veya 3 aken tipine rastlanmıştır. Aynı kapitulumdaki aken gelişiminin sentripetal olduğu gözlenmiştir. Sınıflandırma sürecinde a,b ve c-tipi akenlerin olgunlaşmamış zigotik embriyoları içerdiği, d-tipi akenlerin olgunlaşma evresine yaklaştığı ve e-tipi akenlerin ise olgunlaşmış zigotik embriyoları içerdiği varsayılmıştır (Şekil 4.24).



Şekil 4.23: *R. mykalea* kapitulumlarının döllenmeden sonraki morfolojik değişimleri



Şekil 4.24: Kapitulumların içerdiği farklı gelişme aşamalarındaki aken tipleri

Uygun sterilizasyon sürelerinin belirlenmesi

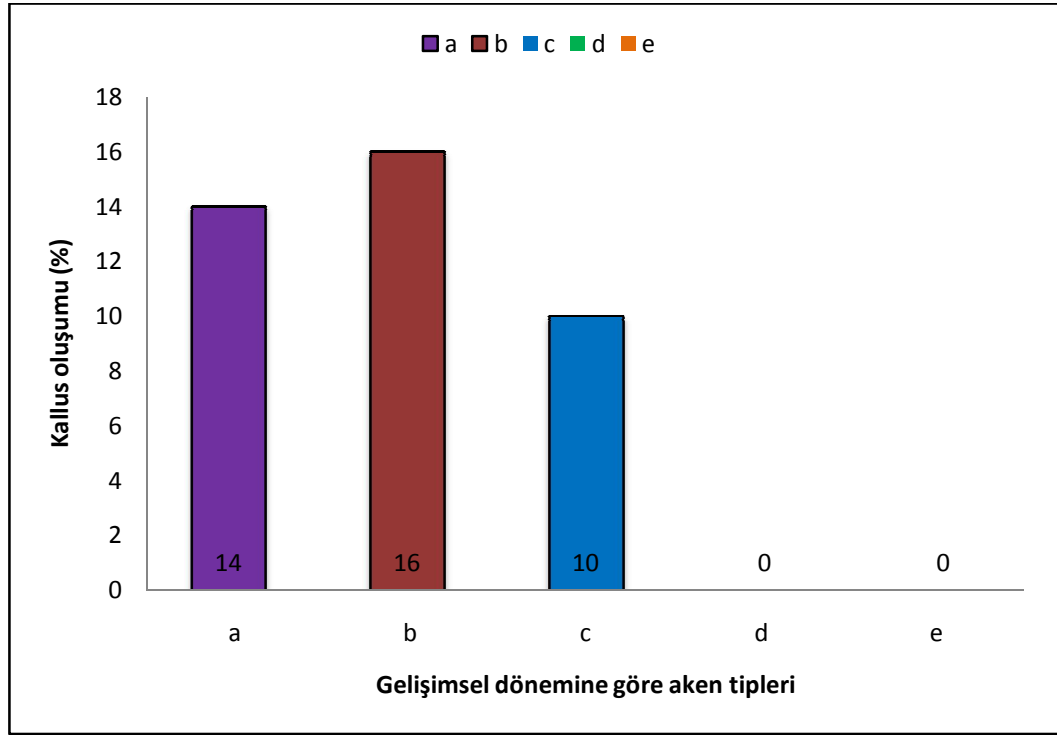
Embriyo kültürü çalışmalarına başlamadan önce uygun sterilizasyon süresinin belirlenmesi amacıyla eksplantlara farklı sterilizasyon serileri uygulanmış ve PDA ortamlarına kültüre edilmiştir. Bu sterilizasyon süreleri sonunda sterilizantın yoğunluğu ve süresine bağlı olarak eksplantlarda kararma veya kontaminasyon gözlenmiştir. Bu denemeler sonrasında elde edilen bulgular Çizelge 4.4’de olduğu şekildedir.

Çizelge 4.4: Embriyo kültürü denemelerinde eksplantlara uygulanan sterilizasyon serileri ve alınan tepkiler

Sterilizasyon işlemi uygulanan eksplant sayısı	Uygulama süresi (dakika)		Eksplant Durumu		
	%70’lik EtOH	% 4.5’lik NaOCl +2 damla Tween-80	Kararan eksplant (%)	Kontamine eksplant (%)	Cevap verebilir eksplant (%)
20	3	3	0	40	60
20	3	6	0	30	70
20	5	3	0	35	65
20	5	6	0	25	75
20	5	8	0	0	100
20	8	8	15	0	85
20	8	10	30	0	70

Embriyoların sterilizasyonu için en uygun prosedür, akan çeşme suyu altında 30 dakika yıkama sonrası % 70'lik EtOH'de 5 dakika tutma, 2 damla Tween-80 ilave edilmiş % 4.5'lik NaOCl'de 8 dakika sterilizasyon sonrası 3 kez steril distile suda durulama (5 dakika) şeklindedir.

Denemelerde, embriyolar gelişimsel dönemlerine bağlı olarak kültüre farklı tepkiler göstermiştir (Şekil 4.25). a ve b tipi akenlerden izole edilen olgunlaşmamış zigotik embriyolar farklı bitki büyüme düzenleyicilerine kallus oluşumu şeklinde cevap vermişlerdir (Çizelge 4.5). Kültüre alınan eksplantlar 4-5 gün içinde şişmeye başlamış ve daha sonra kalluslar oluşmuştur.



Şekil 4.25: Gelişimsel dönemine göre akenlerden izole edilen zigotik embriyoların kalluslaşma oranı

Çizelge 4.5: Olgunlaşmamış zigotik embriyolardan (a ve b tipi) kallus oluşumu üzerine farklı sitokininlerin etkisi

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)			%Kallus Oluşumu (% ortalama)
BA	KIN	TDZ	
Kontrol	-	-	0 e
0.1	-	-	30 c
0.2	-	-	35 bc
0.5	-	-	40 bc
1.0	-	-	60 a
-	0.1	-	0 e
-	0.2	-	0 e
-	0.5	-	0 e
-	1.0	-	0 e
-	-	0.001	40 bc
-	-	0.005	45 b
-	-	0.01	35 bc
-	-	0.05	15 d

Aynı sütun içinde benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan Çoklu Oran Testine göre $p < 0.05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.

a ve b-tipi akenlerden izole edilen olgunlaşmamış zigotik embriyoların kallus cevabı BA, KIN ve TDZ'nin farklı konsantrasyonlarında değişkenlik göstermiştir (Çizelge 4.5). Herhangi bir büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamında ise hiçbir tepki alınmamıştır. Eksplantlar KIN'nin hiçbir konsantrasyonuna tepki vermedikleri halde, TDZ ve BA'nın tüm konsantrasyonlarına kallus oluşumu şeklinde cevap vermişlerdir.

En iyi % kallus tepkisi 1 mg/L BA ilaveli MS ortamında elde edilmiştir (% 60). Kallusların sarımsı-yeşil ve kırılğan yapıda oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.26).

Embriyo veya embriyo segmentlerinin kallus oluşturması için genellikle bir oksin veya sitokinin, ya da her ikisine ihtiyaç duyulabilir. Bununla birlikte bazı bitkilerdeki dormansinin kırılması amacı dışındaki çalışmalarda kültüre alınmış olgun veya olgunlaşmamış embriyoların normal gelişimi için eksojen büyüme düzenleyicilerine

ihtiyaç duyulduğu konusunda yeterli kanıt bulunmamaktadır (Bhojwani ve Razdan, 1996).

c-tipi akenlerden gelen kalluslar kahverengi - kompakt yapıdadır ve denemenin ilerleyen dönemlerinde karararak canlılıklarını yitirmişlerdir (Şekil 4.27). Bu nedenle bu aken tipinden gelen kalluslar değerlendirilmeye alınmamıştır.

d-tipi akenlerden izole edilen embriyolar ise *in vitro* kültüre cevap vermemişlerdir. Bu embriyolar tersine-farklılaşma gösteremedikleri gibi olasılıkla embriyogenik süreçlerini tamamlayamadıkları için bitkicik haline de dönüşmemişlerdir

e-tipi akenlerden izole edilen olgunlaşmış zigotik embriyolar ise çimlenerek bitkicik dönüşümünü gerçekleştirmişlerdir (denenen tüm ortamlar bazında değerlendirildiğinde % 24). Özel *et al.* (2006)'ın *Centaurea tchihatcheffi*'nin olgunlaşmamış zigotik embriyolarını kullanarak gerçekleştirdikleri bir çalışmada, antezisten sonraki 1-8 gün içinde kapitulumlardan alınan olgunlaşmamış zigotik embriyoların büyüme için yeterli olmadığı, antezisten sonraki 8-12 gün içinde kapitulumlardan alınan olgunlaşmamış zigotik embriyoların ise en uygun eksplant kaynağını oluşturduğu belirtilmiştir. Aynı araştırmacılar antezisin 12.gününden sonraki günlerde olgunlaşmamış zigotik embriyoların rejeneratif olmadığını ve dormant hale geçtiklerini belirtmişlerdir. Yine aynı şekilde Rai *et al.* (2007)'ın *Psidium guajava* L.cv. Banarasi'nin olgunlaşmamış zigotik embriyolarını kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmalarında da antezisten sonra, 7-14 hafta arasında bulunan meyvelerden izole ettikleri olgunlaşmamış zigotik embriyolardan 10.haftada en yüksek oranda somatik embriyogenez elde etmişler ve zigotik embriyoların fizyolojik yaşının *in vitro* somatik embriyogenez sürecinde etkili bir faktör olduğunu belirtmişlerdir. Bu durum bizim çalışmalarımızla da paralellik göstermektedir. Denemelerimizde antezis sonrası günlük gözlem yapıp materyal sağlamak mümkün olmadığından aynı kapitulumlar içindeki farklı gelişim evrelerindeki akenler değerlendirilmeye çalışılmıştır. Ancak denemelerde istenilen tepkinin zigotik embriyoların fizyolojik yaşına bağlı olduğu bu gözlemler ile de kanıtlanmış bulunmaktadır.



Şekil 4.26: 1 mg/L BA ilaveli MS ortamında b tipi akenlerden izole edilen embriyolardan elde edilen sarımsı yeşil-kırılgan kalluslar



Şekil 4.27: c-tipi akenlerden izole edilen embriyolardan kahverengi-kompakt yapıda kallus

Denemelerin sonuçlarına göre olgunlaşmış zigotik embriyoların çimlenme yüzdeleri, olgun tohumların kullanılması ile gerçekleştirilen *in vitro* çimlenme denemelerinde elde ettiğimiz yüzdelerden fazladır. Bu durum olasılıkla olgunlaşmış zigotik embriyoların henüz dormansi sürecine girmeden kültüre alınmasından kaynaklanmaktadır. Bilindiği üzere tohumlar gelişimleri sırasında çeşitli fazlardan geçerler. Bu fazlar; histo-farklılaşma (başlangıç morfogenezis) olgunlaşma (tohum genişlemesi) ve kuruyarak olgunlaşma (desikasyon)'dır (Muntz, 1982; Kermodé, 1990, 1995). e-tipi akenlerden izole edilen embriyolar olasılıkla çimlenme için gerekli olgunlaşmayı göstermiş fakat dormansi fazına henüz geçmemiş oldukları için daha yüksek çimlenme yüzdesi göstermişlerdir. Bunun yanı sıra olgun tohum içinde dormansi fazı boyunca ortaya çıkan bir takım endojen kimyasallardan kaynaklanan dormansi faktörü de ortadan kalkmış olabilir. Endospermden, tohum kabuğunun geçirimsiz olmasından veya tohum içindeki çimlenmeyi engelleyen endojen kimyasallardan kaynaklanan dormansi nedeniyle çimlenemeyen embriyoların *in vitro* ortamda kolayca çimlenebildikleri pek çok araştırmacı tarafından da rapor edilmiştir (Biggs *et al.*, 1986; Ho, 1987; Sharma *et al.*, 1996).

Kontrol ortamında embriyo çimlenmesinin yanı sıra, denemelerde kullandığımız farklı sitokinlerin tip ve miktarları da embriyo çimlenmesini teşvik etmiştir (Çizelge 4.6). En yüksek embriyo çimlenmesi 0.01 mg/L TDZ ilaveli MS ortamında (% 63.33) elde edilmiştir (Şekil 4.28). Modern analitik metodlar sitokinlerin imbibisyonundan radikula çıkışı ve fidecik eldesi başlangıcına kadar çimlenmenin tüm aşamalarında oldukça aktif metabolizma gösterdiğini kanıtlamaktadır (Stirk *et al.*, 2005; Chiwocha *et al.*, 2005). TDZ'nin olgun tohumlarda çimlenmeyi teşvik ettiği Nikolic *et al.*, tarafından da (2006) rapor edilmiştir.

Embriyolarda yaş ilerledikçe tohum kabuğu şekillenmekte ve sertleşmektedir. Bu dönemde testanın sertleşmesi nedeniyle embriyoların alınmasında zorluklarla karşılaşmaktadır. Denemelerimizde de embriyoların izole edilmesi sırasında zorluklar çıkmış ve buna bağlı olarak da embriyoların radikula veya kotiledon yapraklarında yaralanmalar veya kopmalar meydana gelmiştir. Bu nedenle anormal embriyo gelişimi gözlenmiştir (Şekil 4.29 ve Şekil 4.30).

Çizelge 4.6: e-tipi akenlerden izole edilen embriyoların çimlenme yüzdeleri

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)			Çimlenme oranı (%)
BA	KIN	TDZ	
Kontrol	-	-	38.33 c
0.1	-	-	10.00 ef
0.2	-	-	13.33 de
0.5	-	-	16.67 de
1.0	-	-	01.67 f
-	0.1	-	08.33 ef
-	0.2	-	10.00 ef
-	0.5	-	11.67 ef
-	1.0	-	13.33 de
-	-	0.001	45.00 bc
-	-	0.005	50.00 b
-	-	0.01	63.33 a
-	-	0.05	23.33 d

Aynı sütun içinde benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan Çoklu Oran Testine göre $p < 0.05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.



Şekil 4.28: e-tipi akenlerden izole edilmiş 0.01 mg/L TDZ ilaveli MS ortamında çimlenmiş 6 haftalık bitkicik



Şekil 4.29: Kökü olmayan bir bitkicik



Şekil 4.30: Kotiledonlarında yaralanmalar oluşmuş bitkicikler

4.2.3. Somatik Embriyogenez

Somatik embriyogenez teşviki çalışmalarında, oksin ve sitokin kombinasyonlarını içeren tüm ortamlarda farklı oranlarda kallus oluşumu gözlenmiş, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamında ise kallus oluşmamıştır (Çizelge 4.7). *R.mykalea*'nın a ve b-tipi akenlerinden elde edilen olgunlaşmamış zigotik embriyolarından embriyonik kallus indüksiyonu için oksin:sitokin kombinasyonuna ihtiyaç vardır.

Çizelge 4.7: Olgunlaşmamış zigotik embriyolardan (a ve b tipi) kallus oluşumu üzerine bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi (kültür başlangıcından 8 hafta sonra)

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)			%Kallus Oluşumu (% ortalama)
BA	NAA	2,4-D	
Kontrol	-	-	0 f
1	0.25	-	75 a
1	0.5	-	55 b
1	1	-	35 c
1	5	-	25 d
1	-	0.25	35 c
1	-	0.5	25 d
1	-	1	15 e
1	-	5	10 f

Aynı sütun içinde benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan Çoklu Oran Testine göre $p < 0.05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.

En yüksek oranda kallus oluşumu 0.25 mg/L NAA ve 1 mg/L BA ilaveli MS ortamında elde edilmiştir (% 75). Bunu 0.5 mg/L NAA ve 1 mg/L BA ilaveli MS ortamı izlemiştir. NAA'nın daha yüksek konsantrasyonlarında (1 ve 5 mg/L) kallus indüksiyon oranında kademeli olarak bir düşüş gözlenmektedir. 2,4-D:BA kombinasyonlarında ise NAA:BA kombinasyonlarına göre daha az oranda kallus oluştuğu gözlenmektedir. Denemeler kallus oluşumu teşviki bakımından istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

Elde edilen kalluslar biyokütle artışı amacıyla 2 kez daha altkültür edilmiştir. Bu süreçte kalluslar üzerinde globular yapıların oluştuğu gözlenmiştir (açık sarı-yeşil ve kompakt yapıda proembriyogenik kallus) (Şekil 4.31a ve 4.31b).

Somatik embriyogenez çalışmalarında, uygun eksplant seçildikten sonra embriyogenezin uyarılması için, hücre bölünmesinin başlaması ve somatik hücreye yeni bir polarite kazandırılması gerekmektedir. Bu uyarı birçok durumda bitki büyüme düzenleyicileri ile sağlanabilmektedir. Somatik embriyogenez için her bitki türü, genotipi ve kullanılan eksplant tipine göre farklı konsantrasyonlarda farklı bitki büyüme düzenleyicilerine ihtiyaç duyulmaktadır (Ammirato, 1983). Oksinler totipotensiyi ortaya çıkarmak ve dedifferansiasyonu sağlamak için gereklidir (Terzi ve Loschiavo, 1990). Ayrıca oksinler somatik bitki hücrelerine embriyo üretimi için zigotik bir kapasite kazandırmaktadır. 2,4-D veya pikloram gibi sentetik oksinler genellikle somatik embriyogenez teşviki için yaygın olarak kullanılmaktadır (Merkle *et al.*, 1990). Ancak, *R.mykalea*'nın olgunlaşmamış zigotik embriyolarından kallus oluşumu teşviki üzerine NAA, 2,4-D'den daha etkili bir oksindir.

Somatik embriyo farklılaşması ve gelişimi üzerine BA'nın etkisini belirlemek amacıyla embriyogenik kalluslar, farklı konsantrasyonlarda BA içeren ve kontrol olarak herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamlarına aktarılmıştır. Globular yapıların somatik embriyoya farklılaşmasında BA etkili olmuştur (Çizelge 4.7). Kontrol ortamında embriyo farklılaşması gözlenmezken, 0.1 mg/L BA ilaveli ortamda kallus başına en yüksek oranda embriyo oluşmuştur (13.67 somatik embriyo/kallus). 0.5 mg/L BA ve 1 mg/L BA ilaveli ortamlarda artan konsantrasyona bağlı olarak oluşan embriyo sayısında düşüş gözlenmiştir (sırasıyla 8.00 ve 3.83 somatik embriyo/kallus). BA'nın en yüksek konsantrasyonunda (2 mg/L) ise somatik embriyo farklılaşması görülmemiştir. Denemeler istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

Somatik embriyogenez, proembriyogenik kültürlerin başlangıcı, somatik embriyoların oluşumu, somatik embriyolarının olgunlaşması ve bitki rejenerasyonu olmak üzere 4 farklı gelişim evresinde gerçekleşmektedir (Fowler *et al.*, 1998). Oksinler somatik bitki hücrelerine embriyo üretimi için zigotik bir kapasite

kazandırırken, sitokinler somatik embriyogenez sürecinde hücre bölünmesi ve farklılaşması aşamasında rol almaktadırlar (Monnier, 1990c). Çoğu durumda, oksinler somatik embriyogenez teşviki için gerekli olmasına rağmen, somatik embriyoların gelişimi için engelleyici olabilmektedir (Rai *et al.*, 2007). Aynı zamanda, somatik embriyogenez, mineral formülasyon ve spesifik sitokinin konsantasyonuna bağlıdır (Bhatia *et al.*, 2004).

R.mykalea'nın olgunlaşmamış zigotik embriyolarından türevli kalluslarından somatik embriyo farklılaşması için BA gereklidir. Özel *et al.* (2006) *C. tchihatcheffii*'nin olgunlaşmamış zigotik embriyolarını BA:NAA ve KIN:NAA kombinasyonlarını içeren MS ortamlarına kültüre etmişler ve kısa bir kallus fazından sonra adventif sürgünler elde etmişlerdir, bizim çalışmalarımızda ise eksplantlardan alınan cevap kallus oluşumu şeklindedir ve somatik embriyo farklılaşması için ortamdan oksinin kaldırılmasına gerek duyulmuştur. Somatik embriyoların normal gelişimi için BA'nın gerekli olduğu Endress (1994) tarafından da bildirilmiştir. Ayrıca BA'nın somatik embriyo oluşumu, gelişimi ve çimlenmesi üzerine etkili olduğuna dair birçok çalışma bulunmaktadır (Emek ve Erdağ, 2007; Erdağ *et al.*, 2009).

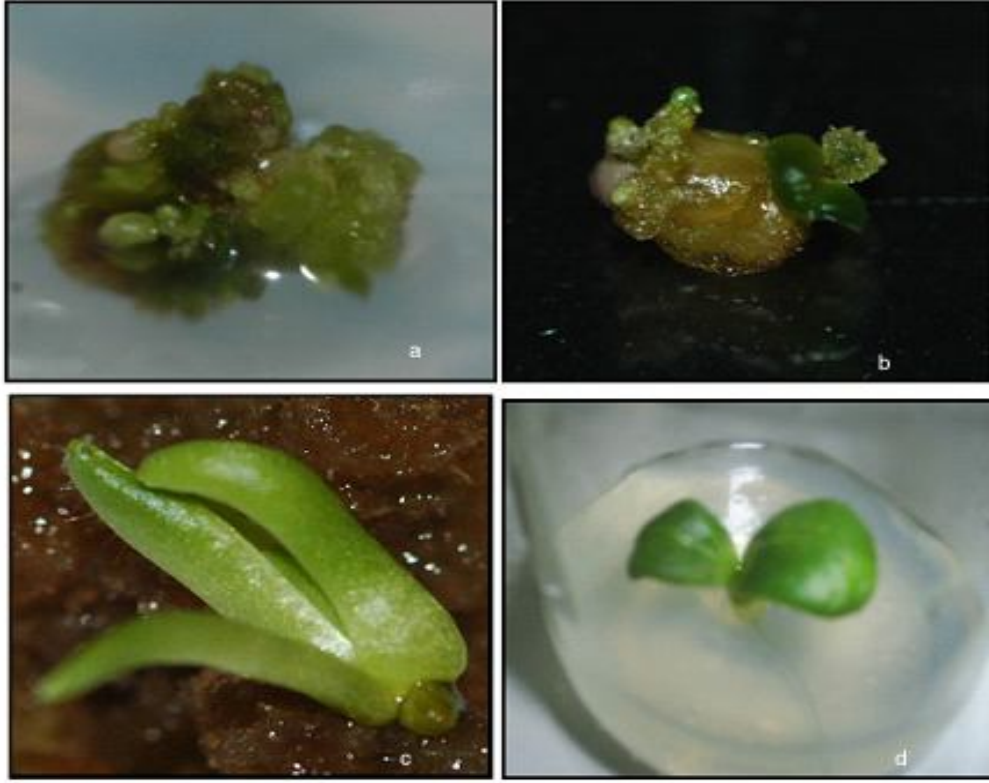
Embriyogenik kalluslar üzerinde somatik embriyo farklılaşma için en yüksek değerini elde edildiği 0.1 mg/L BA ilaveli MS ortamı, farklı sukroz kombinasyonları ile desteklenerek embriyogenik kalluslardan somatik embriyo farklılaşması, olgunlaşması ve çimlenmesi üzerine sukroz miktarının etkisi araştırılmış ve en yüksek değer % 6 sukroz ilaveli MS ortamında elde edilmiştir (19.25 somatik embriyo/kallus) (Çizelge 4.9).

Sukroz bitki doku kültüründe yaygın olarak kullanılan bir karbohidrat kaynağıdır. (Fuentes *et al.*, 2000). Yüksek şeker konsantrasyonunun somatik embriyogenezde osmotik düzenleyici olarak rol aldığı (Biahoua ve Bonneau 1999; Litze, 1986) ve sukroz konsantrasyonunun somatik embriyo oluşumunda etkili olduğu bilinmektedir (Kamada *et al.*, 1989; Gray *et al.*, 1993; Lou ve Kako, 1995; Nakagawa *et al.*, 2001; Erdağ *et al.*, 2009). Artırılmış sukroz konsantrasyonu ile somatik embriyoların indüklenmesi daha önceden de birkaç çalışmada rapor edilmiştir (Lou *et al.*, 1996; Jehan *et al.*, 1994; Erdağ *et al.*, 2009). *Helianthus annuus*'un olgunlaşmamış zigotik

embriyolarının eksplant olarak kullanıldığı bir çalışmada, sürgün veya somatik embriyo teşviki için BA'nın ortamda bulunmasının kesinlikle gerekli olduğu, fakat morfogenetik cevap tipinin ortamda bulunan sukroz miktarına bağlı olduğu bildirilmiştir. Düşük sukroz konsantrasyonunda (% 3) organogenez teşvik edilirken, yüksek sukroz konsantrasyonunda (% 12) somatik embriyogenez teşvik edilmiştir (Bronner *et al.*, 1994).

İyi gelişmiş somatik embriyolar (kotiledon safhasında) % 3 sukroz içeren MS ortamlarına aktarılarak çimlendirilmiştir (Şekil 4.31c ve 4.31d). En yüksek çimlenme %15.75 oranında 0.1 mg/L BA ilaveli %12 sukroz içeren MS ortamında farklılaşan ve gelişen embriyolarda elde edilmiştir (Çizelge 4.10). % 6 ve % 3 sukroz konsantrasyonları içeren ortamlarda farklılaşan somatik embriyolar ise sırasıyla % 10.83 ve % 3.17 oranında bitkiciğe dönüşmüşlerdir. Elde edilen bitkicikler saksıya aktarılmış ve % 80'i hayatta kalmayı başarmıştır.

Döllenmiş yumurtadan gelişen embriyoda olduğu gibi, dikotil bitkilerde de somatik embriyolar globular, kalp, torpedo ve kotiledon oluşum evrelerini geçirirler (De Jong *et al.*, 1993). Globular somatik embriyolar oluştuktan sonra gelişmeye başlar ve 7-10 gün içerisinde kalp evresinden torpedo evresine geçerek gelişmeye devam ederler. Böylece tek bir somatik hücre, bir zigotik embriyo gibi davranıp onun geçirdiği tüm gelişim evrelerini geçirerek olgun bir bitkiyi oluşturabilir. Torpedo evresine geldikten hemen sonra çimlenmeye başlarsa, depo maddesi biriktirecek zaman kısıtlı olduğundan embriyolar tam olarak olgunlaşmazlar. Bu aşamada ortama % 5-6 oranında sukroz ilave edilmesi osmotik stresi artırır, erken çimlenmeyi önler, embriyolar depo proteinleri ve karbonhidrat depolamaya başlarlar (Bewley ve Black, 1994). Bizim çalışmamızda ise %12 sukroz ilaveli ortamda farklılaşan somatik embriyoların %3 sukroz ilaveli ortamlara aktarıldıktan sonraki bitkiciğe dönüşüm oranı en yüksek değeri göstermektedir. Somatik embriyo indüksiyon ortamında bulunan sukroz ile somatik embriyoların çimlenmesi arasında da pozitif bir korelasyon söz konusudur. Benzer korelasyon Erdağ *et al.* (2009) tarafından da bildirilmiştir.



Şekil 4.31: *R. mykalea*'nın olgunlaşmamış zigotik embriolarından somatik embriyogenez süreçleri

- 0.25 mg/L NAA ve 1 mg/L BA ilaveli MS ortamında elde edilen 12 haftalık embriyogenik yapıdaki kallus
- Farklı gelişim evrelerinde somatik embriyolar
- Kotiledon evresinde somatik embriyo
- Çimlenmiş somatik embriyo

Çizelge 4.8: Olgunlaşmamış zigotik embriyolardan elde edilen embriyogenik kalluslarda somatik embriyo farklılaşması üzerine BA'nın etkisi

BA (mg/L)	Somatik Embriyo Sayısı/Kallus (ortalama \pm SE)
Kontrol	0.00 \pm 0.00 d
0.1	13.67 \pm 0.50 a
0.5	8.00 \pm 0.37 b
1	3.83 \pm 0.32 c
2	0.00 \pm 0.00 d

Aynı sütun içinde benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan Çoklu Oran Testine göre $p < 0.05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.

Çizelge 4.9: 0.1 mg/L BA ilaveli MS ortamında somatik embriyo farklılaşması üzerine sukrozun etkisi

Sukroz konsantrasyonu (%)	Somatik Embriyo Sayısı/Kallus (ortalama \pm SE)
% 3	14.00 \pm 0.56 b
% 6	19.25 \pm 0.58 a
% 12	15.41 \pm 0.39 b

Aynı sütun içinde benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan Çoklu Oran Testine göre $p < 0.05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.

Çizelge 4.10: 0.1 mg/L BA ilaveli farklı sukroz konsantrasyonlarında farklılaşan ve olgunlaşan embriyoların %3 sukroz ilaveli MS ortamlarında bitkiciğe dönüşümü

Sukroz konsantrasyonu (%)	% bitkiciğe dönüşüm (% ortalama \pm SE)
% 3	3.17 \pm 0.41 c
% 6	10.83 \pm 0.47 b
% 12	15.75 \pm 0.81 a

Aynı sütun içinde benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan Çoklu Oran Testine göre $p < 0.05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.

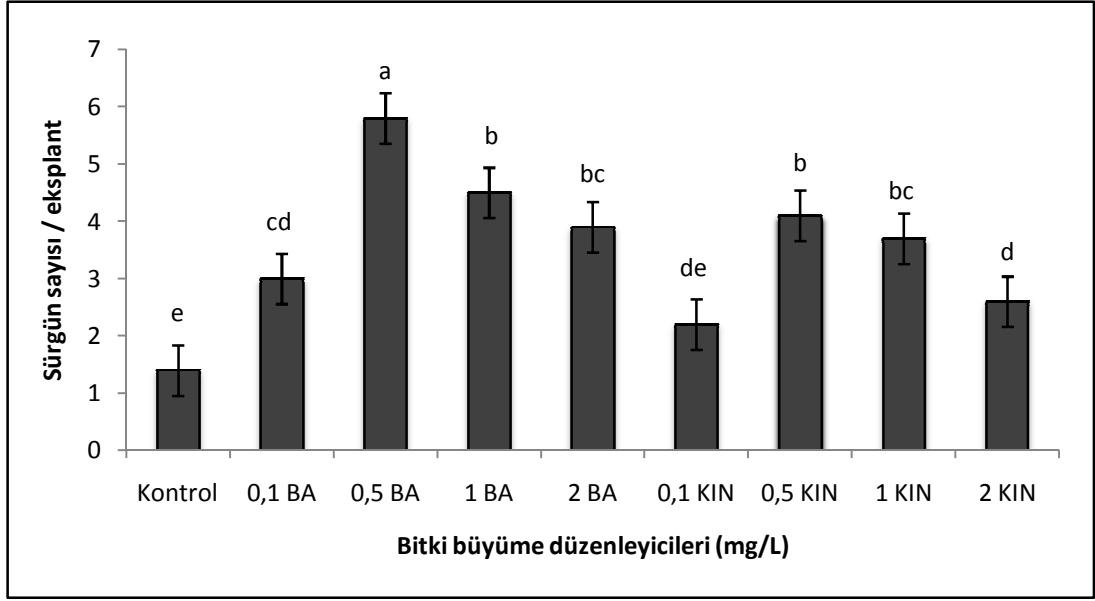
4.2.4. Aksiller Sürgün Çoğaltımı

Aksiller sürgün çoğaltımı, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamı dahil tüm ortamlarda teşvik edilmiştir. Ancak denemelerde BA'nın KIN'e göre daha etkili bir sitokinin olduğu görülmektedir. Eksplant başına maksimum sürgün sayısı 0.5 mg/L BA ilaveli MS ortamında elde edilmiştir (5.80 adet sürgün/eksplant) (Şekil 4.32 ve Şekil 4.33).

Kurt ve Erdağ (2009) endemik bir bitki olan *Centaurea zeybekii*'nin tohumlarının çimlendirilmesi sonucunda elde ettikleri fidecikleri aksiller sürgün çoğaltımı için farklı konsantrasyonlarda BA, KIN ve TDZ ilave edilmiş ortamlara aktarmışlardır. Araştırmacılar denemelerin sonunda aksiller sürgün çoğaltımı için en etkili sitokinin tipinin BA olduğunu ve en yüksek oranda sürgün çoğaltımının 1 mg/L BA ilaveli MS ortamında elde ettiklerini bildirmişlerdir. BA'nın *Asteraceae* familyasına ait türlerin aksiller sürgün çoğaltımında etkili bir sitokinin olduğu daha önce de pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir; *Centaurea junoniana* (Hammatt ve Evans, 1985), *Gerbera jamesonii* hybrida (Ruffoni ve Massabo, 1991), *Centaureum rigualii* (Iriundo ve Perez, 1996), *Syzygium alternifolium* (Sha Valli Khan *et al.*, 1997).



Şekil 4.32: 0.5 mg/L BA ilaveli MS ortamında gelişen aksiller sürgünler

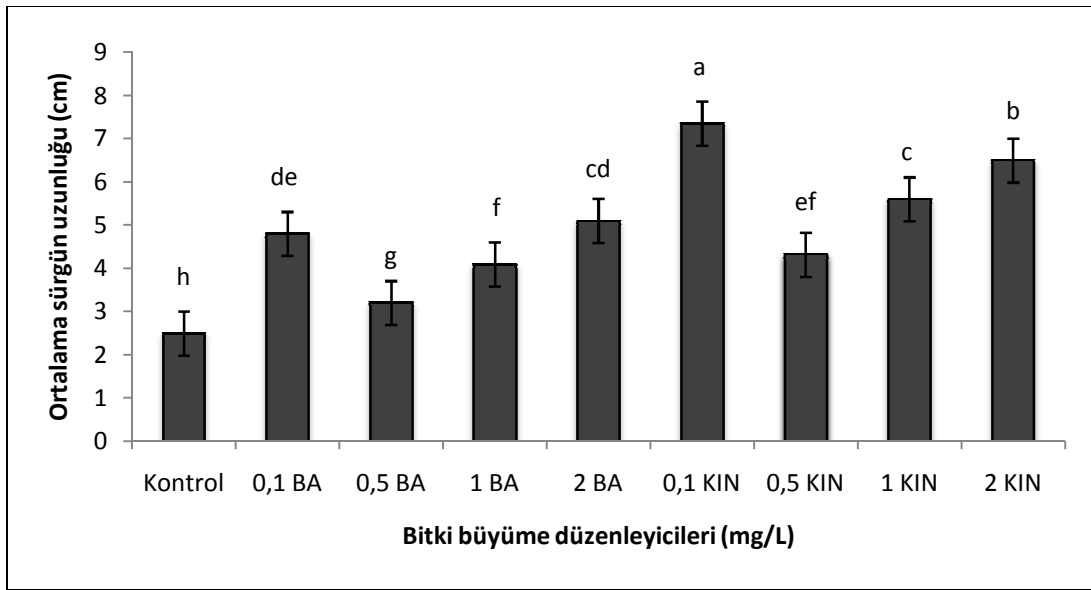


Şekil 4.33: Aksiller sürgün çoğaltımı üzerine sitokinin etkisi

Aynı grafikte benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan Çoklu Oran Testine göre $p < 0.05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.

Aksiller sürgün çoğaltımı çalışmalarında maksimum sürgün uzunluğu bakımından değerlendirilme yapıldığında en iyi sonucun 0.1 mg/L KIN ilaveli MS ortamında elde edildiği görülmektedir (7.35 cm) (Şekil 4.33). Tüm sitokinin içeren ortamlarda artan sürgün sayısına karşılık sürgün boylarında bir azalma gözlenmiştir. Sürgün sayısı ile sürgün boyu arasında negatif bir korelasyon söz konusudur. Bu tip negatif korelasyon Cuenca *et al.* (1999)'ın endemik bir bitki olan *Centaurea paui* için infloresens gövdesinin eksplant olarak kullanılması ile aksiller sürgün çoğaltımının teşvik edildiği çalışma ile Kurt ve Erdağ (2009)'ın *Centaurea zeybekii*'nin aksiller sürgün çoğaltımı çalışmasında da rapor edilmiştir.

Aksiller sürgün çoğaltımı denemeleri sonucunda elde edilen sürgünler, köklenme teşviki için birbirlerinden ayrılarak köklendirme ortamlarına aktarılmışlardır. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ve ½ MS ortamlarında kök oluşumu gerçekleşmemiştir. *R. mykalea* bitkisinin köklenmesi için oksin gereklidir. Genel olarak köklenmenin teşviki için farklı tip ve konsantrasyonlarda oksin ilaveli ½ MS ortamının MS'e göre daha etkili olduğu görülmektedir (Şekil 4.35). Köklenmede en etkin oksin IBA olarak belirlenmiş ve en yüksek köklenme yüzdesi 0.5 mg/L IBA ilaveli ½ MS ortamında elde edilmiştir (% 55)(Şekil 4.36). Elde edilen veriler istatistiksel açıdan da anlamlı bulunmuştur.

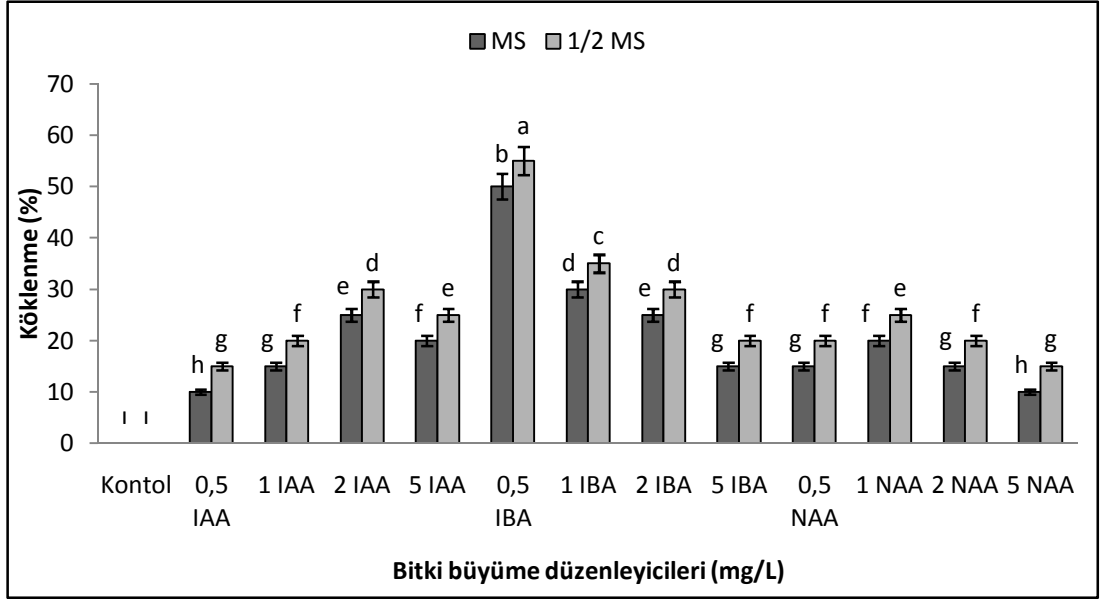


Şekil 4.34: Sitokinin tipi ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişen aksiller sürgün boyları

Aynı grafikte benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan Çoklu Oran Testine göre $p < 0.05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.

Asteraceae üyelerinde IBA'nın diğer oksinlere göre köklenmeyi daha fazla teşvik ettiğine dair pek çok çalışma bulunmaktadır (Pevalek ve Kozlina, 1998; Cuenca ve Marco, 2000; Erdağ ve Emek, 2005; Kurt, 2005; Dhar ve Joshi, 2005; Erdağ ve Emek, 2009).

Köklenen bitkicikler kademeli bir şekilde dış ortama aktarılmışlardır (Şekil 4.36). Dış ortama aktarılan bitkiciklerin % 60'ı hayatta kalmayı başarmıştır.



Şekil 4.35: Aksiller sürgün çoğaltımı yolu ile elde edilen sürgünlerin köklenmesi üzerine MS ve 1/2 MS ortamlarına ilave edilmiş oksinlerin etkisi

Sonuçlar $x' = \arcsin \sqrt{(x/100)}$ dönüşümü yapılarak varyans analizinde kullanılmıştır. Aynı grafikte benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan Çoklu Oran Testine göre $p < 0.05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.



Şekil 4.36: 1/2 MS + 0.5 mg/L IBA'da köklenmiş bitkicik



Şekil 4.37: Dış ortama alıştırmış bir bitkicik

4.2.5. Adventif Sürgün Teşviki

Kontaminasyonun erken tespitine yönelik olarak uygulanan PDA ortamında en yüksek steril kültür yüzdesini veren ve eksplant canlılığının en yüksek olduğu sterilizasyon serisi, denemenin sonraki aşamalarında optimum uygulama olarak belirlenmiş ve bu sterilizasyon serisi ile steril edilmiş eksplantlar farklı *in vitro* ortamlara aktarılmışlardır. Yaprak eksplantlarının 1 saat boyunca akan çeşme suyu altında yıkandıktan sonra, % 70'lik EtOH'de 2 dakika, %3 NaOCl + 2 damla Tween-80 çözeltisinde ise 5 dakika süreyle sterilizasyona tabii tutulması ve sonrasında 3 kez 5'er dakika steril distile su ile durulanması ile % 75 oranında kültüre cevap verebilir eksplant elde edilmiştir (Çizelge 4.11) . Yine de denemelerimiz sırasında elde edilen steril kültürler çok yüksek bir değere sahip değildir. Bunun nedeninin bitkinin rozet görünümde olması nedeniyle toprağa yakın olmasından dolayı fungal veya bakteriyel kontaminatları daha çok taşımamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Wildi *et al.* (1998) Asteraceae üyesi *Petasites hybridus*'un yaprak, petiol ve infloresans tomurcuklarını eksplant olarak kullanarak gerçekleştirecekleri bir çalışmada benzer nedenlerle sterilizasyonda % 50'den daha az oranda başarılı olduklarını belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu nedenle doğadan toplanan taze bitki materyalleri yerine *in vitro* çimlendirme sonucunda elde edilmiş bitkiciklerin çeşitli kısımlarını eksplant olarak kullanmışlardır. Denemelerimizde *in vitro* çimlenme yüzdesinin düşük olması ve az sayıda fideciğin elde edilmesi nedeni ile doğal ortamından toplanan ve steril edilen yaprak eksplantları adventif sürgün teşviki denemelerinde başlangıç materyali olarak kullanılmıştır.

Yaprak eksplantları kültüre kallus oluşumu şeklinde cevap vermişlerdir. Farklı tip ve konsantrasyonda bitki büyüme düzenleyicilerini içeren MS ortamlarında farklı tepkiler alınmıştır (Çizelge 4.12). Denemelerde kullanılan eksplantların büyük bir kısmı başlangıç aşamasında belirli bir şişme göstermiş olmasına karşın, kültürün ilerleyen zamanlarında hiçbir gelişme göstermeden canlılıklarını yitirmişlerdir. Geri kalan eksplantlarda kallus oluşumu genellikle kesik olan yüzeylerden yaprak kenarlarında oluşmaya başlamış ve daha sonra eksplantın tümü kalluslaşmıştır (Şekil 4.38 ve Şekil 4.39).

Çizelge 4.11: Farklı sterilizasyon sürelerinin yaprak eksplantlarının sterilizasyonu üzerine etkisi

Sterilizasyon işlemi uygulama numarası	Sterilizasyon işlemi uygulanan eksplant sayısı	Uygulama (süre, dk)		Eksplant Durumu		
		%70'lik EtOH	%4.5'lik NaOCl + 2 damla Tween-80	Kararan eksplant (%)	Kontami ne olan eksplant (%)	Cevap verebilir eksplant (%)
1	40	2	3	30	30	40
2	40	2	5	45	20	35
3	40	2	7	70	15	15
4	40	3	3	40	25	35
5	40	3	5	65	10	25
6	40	3	7	80	5	15
7	40	5	3	65	20	15
8	40	5	5	80	0	20
9	40	5	7	100	0	0
		% 70'lik EtOH	%3 NaOCl+ 2damla Tween-80	Kararan eksplant (%)	Kontami ne olan eksplant (%)	Cevap verebilir eksplant (%)
10	40	2	3	0	40	60
11	40	2	5	0	25	75
12	40	2	7	20	20	60
13	40	3	3	10	30	60
14	40	3	5	35	20	45
15	40	3	7	65	15	20
16	40	5	3	55	25	20
17	40	5	5	75	5	20
18	40	5	7	80	0	20

Çizelge 4.12: Farklı tip ve miktarlarda bitki büyüme düzenleyicisi içeren MS ortamında *R.mykalea* 'nın yaprak eksplantlarından kallus oluşum miktarları

	Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)					Kallus oluşum oranı (%)
	BA	KIN	TDZ	NAA	2,4-D	
1(kontrol)	-	-	-	-	-	0
2	0.1	-	-	-	-	14
3	0.5	-	-	-	-	18
4	1.0	-	-	-	-	25
5	5.0	-	-	-	-	6.0
6	-	0.1	-	-	-	5.2
7	-	0.5	-	-	-	9.5
8	-	1.0	-	-	-	7.2
9	-	5.0	-	-	-	3.5
10	-	-	0.001	-	-	9.0
11	-	-	0.005	-	-	20
12	-	-	0.01	-	-	35
13	-	-	0.05	-	-	55
14	-	-	0.1	-	-	38
15	-	-	-	0.1	-	30
16	-	-	-	0.2	-	24
17	-	-	-	1.0	-	75
18	-	-	-	5.0	-	28
19	-	-	-	-	0.1	0
20	-	-	-	-	0.2	0
21	-	-	-	-	1.0	0
22	-	-	-	-	5.0	0



Şekil 4.38: *R. mykalea*'nın yaprak eksplantları kenarlarında 1 mg/L NAA ilaveli MS ortamında kallus oluşumu



Şekil 4.39: 1 mg/L NAA ilaveli MS ortamında oluşan kallus görüntüsü

Hiçbir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamında kültüre cevap alınamamıştır. Denemelerimizde kullanılan sitokin tipleri içinde en etkili sitokininin TDZ olduğu görülmektedir. 0.05 mg/L TDZ ilaveli MS ortamına aktarılan eksplantlarda %55 kalluslaşma oranı belirlenmiştir. BA ilaveli ortamlarda ise en yüksek kalluslaşma yüzdesi 1 mg/L BA ilavesi ile % 25 olarak belirlenmiştir. En düşük kalluslaşma yüzdesine KIN ilaveli ortamlarda rastlanmıştır.

Denemelerimizde kullanılan oksin tipleri içinde 2,4-D'nin adventif sürgün teşviki üzerine etkili olmadığı görülmektedir. NAA'nın 1 mg/L'lik konsantrasyonu ise en yüksek kalluslaşma yüzdesini vermektedir (% 75). Bu konsantrasyonun artan ve azalan miktarları ise % kallus oluşumunu azaltmaktadır.

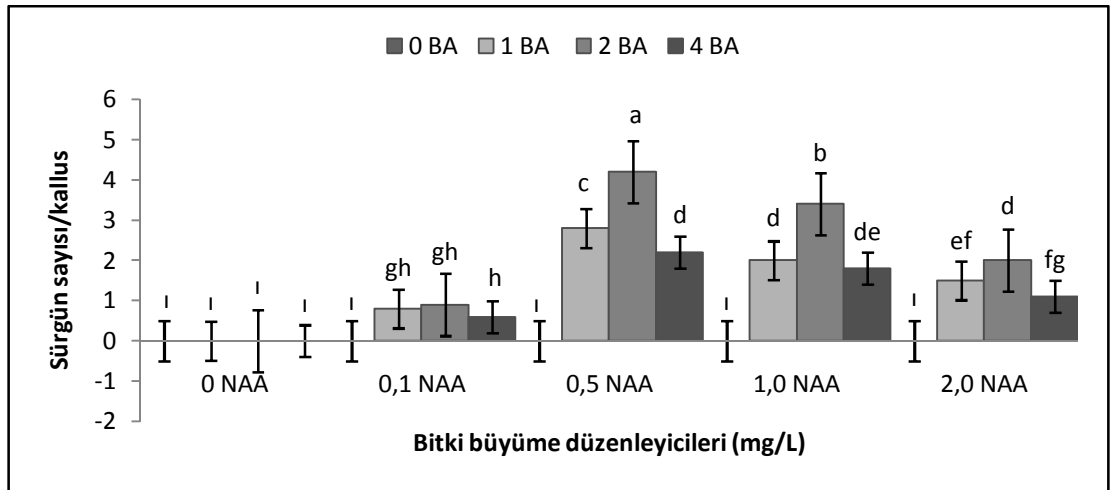
Kurt (2005) endemik *C. zeybekii*'nin yaprak eksplantlarını farklı konsantrasyonlarda BA, KIN ve TDZ ilaveli MS ortamlarında kültüre ettiği çalışma sonucunda sitokin ilaveli tüm ortamlarda kallus oluşumu elde etmiştir. Araştırmacı kalluslaşma sürecinde BA'nın KIN'den daha etkili bir sitokin olduğunu belirtmiş ancak en yüksek kalluslaşma yüzdesini TDZ ilaveli ortamlarda elde etmiştir (0.001 mg/L TDZ'de % 90). Dhar ve Joshi (2005), tehlike altında *Asteraceae* üyesi *Saussurea obvallata in vitro* geliştirilmiş fidelerinin yapraklarını eksplant olarak kullanılması ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında BA'nın düşük konsantrasyonlarının (1 ve 2.5 µM; 0.22 mg/L ve 0.56 mg/L) kallus oluşumu üzerine etkili olmazken daha yüksek konsantrasyonlarda (5 ve 10 µM BA; 1.12 mg/L ve 2.24 mg/L) sırasıyla % 21 ve % 13 oranında kalluslar elde etmişlerdir. 2.5 µM BA (0.56 mg/L) ve 1.0 µM NAA (0.18 mg/L) ilaveli MS ortamlarında % 100 oranında kallus oluşumu gözlemişlerdir.

Elde edilen kalluslar biyokütle artışı için 4 haftalık aralıklarla 2 kez daha alt kültüre alınmıştır. Biyokütle artışı sırasında tek başına sitokin veya oksin içeren ortamlarda sürgün farklılaşması gözlenmemiş, bu nedenle, kalluslar oksin ve sitokin kombinasyonlarını içeren ortamlarda alt kültür edilmişlerdir.

Kalluslardan adventif sürgün teşviki bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamında gerçekleşmemiştir. Tek başına NAA ve BA'nın da sürgün oluşumunda etkili olmadığı görülmektedir (Şekil 4.40 ve Şekil 4.41). Cuenca ve Marco (2000) *C. spachii* infloresensinin eksplant olarak kullanılmasıyla gerçekleştirdikleri bir

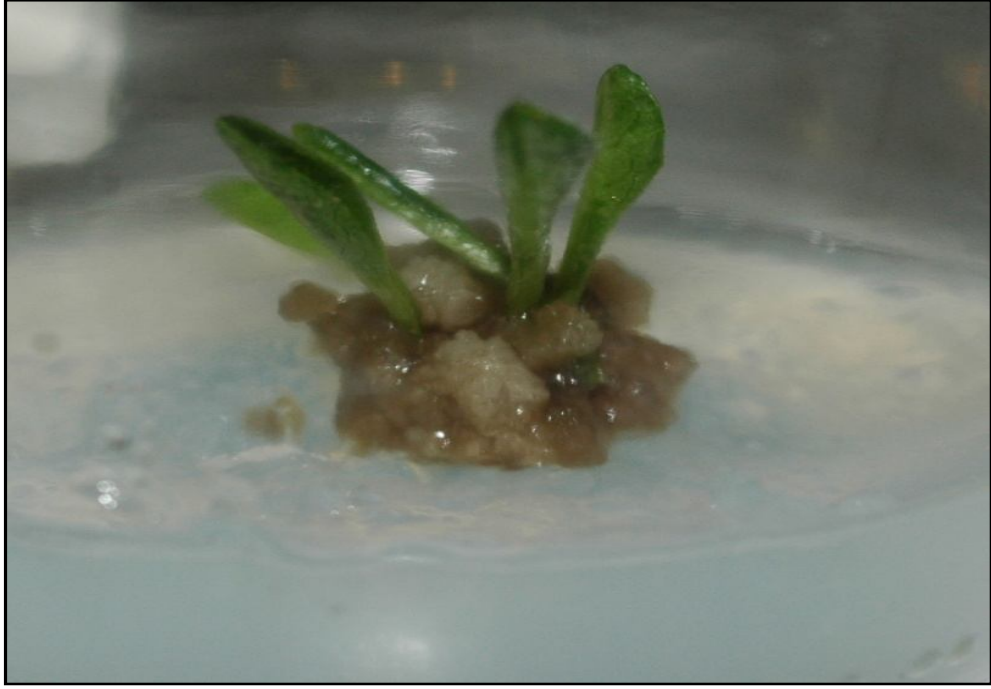
çalışmasında, tek başına BA kullanılması ile direkt sürgünler elde etmiş ve BA'nın sürgün çoğaltımı için önemli bir rol oynadığını belirtmiştir. Erdağ ve Emek (2009) endemik kritik tehlike altında *Anthemis xylopoda* O.Schwarz'ın *in vitro* elde edilmiş sürgünlerinin yapraklarını eksplant olarak kullandıkları bir çalışmada tek başına sitokinin içeren ortamlarda direkt adventif sürgünler elde etmişler ve BA'nın, KIN'den daha etkili bir sitokin olduğunu belirtmişlerdir. 0.5 mg/L BA ilaveli ortamda eksplant başına en yüksek oranda adventif sürgün elde etmişlerdir (6.7 adet sürgün/eksplant).

Dhar ve Joshi (2005), tehlike altında olan *Saussurea obvallata* ile yaptıkları bir çalışmada 2.5 µM BA (0.56 mg/L) ve 1.0 µM NAA (0.18 mg/L) kombinasyonu ile desteklenmiş MS ortamlarında % 100 kallulaşma, 5µM BA (1.12 mg/L) ve 1.0 µM NAA (0.18 mg/L) ilaveli MS ortamında ise eksplant başına 12 sürgün olacak biçimde % 100 sürgün farklılaşması elde etmişlerdir. Bizim denemelerimizde NAA ve BA kombinasyonlarını içeren ortamların hepsinde sürgün oluşmuştur. Kallus başına ortalama 4.2 sürgün sayısı ile 0.5 mg/L NAA ve 2 mg/L BA kombinasyonu sürgün oluşumu bakımından en uygun kombinasyondur.



Şekil 4.40: *R. mykalea*'nın yaprak kalluslarından adventif sürgün oluşumu üzerine NAA, BA ve kombinasyonlarının etkisi

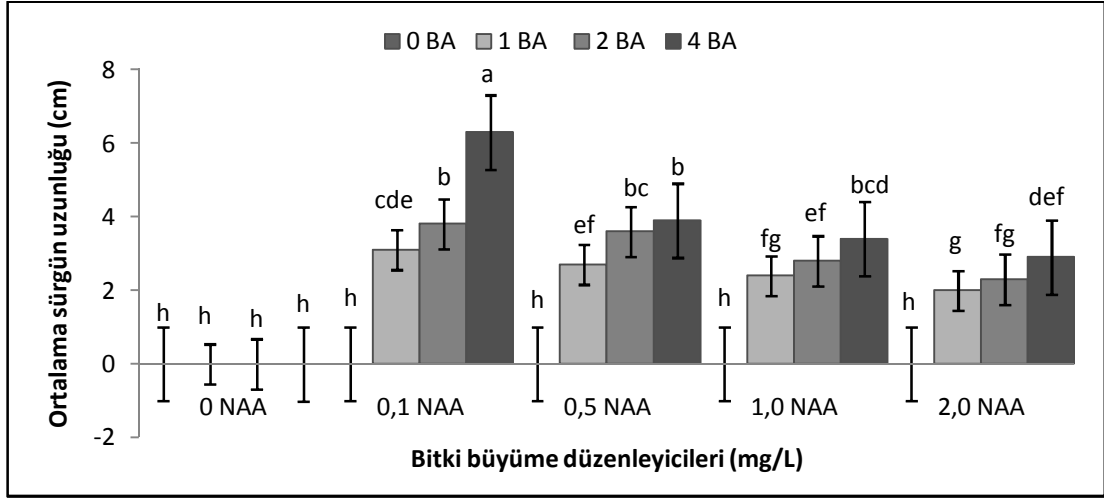
Aynı grafikte benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan Çoklu Oran Testine göre $p < 0.05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.



Şekil 4.41: 0.5 mg/L NAA ve 2 mg/L BA ilaveli MS ortamında adventif sürgün rejenerasyonu

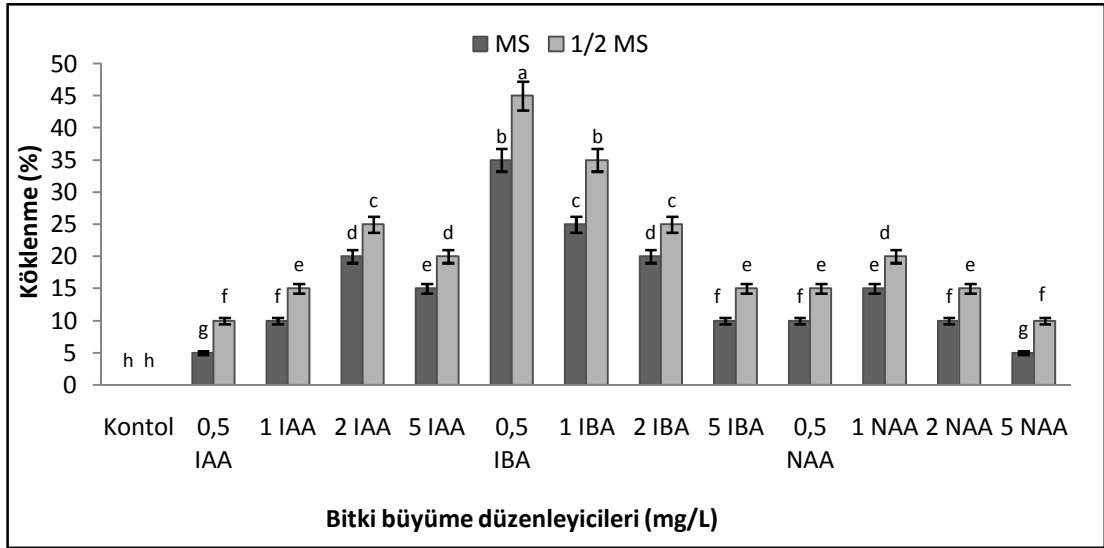
Sürgün boyu üzerine bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisini incelediğimizde, en uzun sürgünlerin 0.1 mg/L NAA ve 4 mg/L BA ilaveli MS ortamında olduğu görülmektedir. (6.3 cm) (Şekil 4.42). Sürgün boyu ile sürgün sayısı arasında ise negatif bir ilişki bulunmaktadır. Bu tip negatif korelasyon aksiler sürgün çoğaltma denemelerinden elde edilen sürgün boylarının değerlendirilmesi sırasında da karşımıza çıkmıştır ve diğer pek çok Asteraceae üyesi için daha önceden rapor edilmiştir (Cuenca *et al.*, 1999; Cuenca ve Marco, 2000).

Sürgünlerin köklendirilmesi çalışmalarında, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ve ½ MS ortamlarında kök oluşumu gerçekleşmemiştir. Oksin ilavesi ise tüm ortamlarda köklenmeyi teşvik etmiştir (Şekil 4.43 ve Şekil 4.44). Köklendirme denemeleri sonucunda elde edilen veriler istatistik açıdan anlamlı bulunmuştur. En yüksek köklenme yüzdesi 0.5 mg/L IBA ilaveli ½ MS (% 45) ortamında elde edilmiş, bunu 0.5 mg/L IBA ilaveli MS ve 1 mg/L IBA ilaveli ½ MS ortamları takip etmiştir. Dhar ve Joshi (2005), tehlike altında olan *Saussurea obvallata* ile yaptıkları bir çalışmada elde ettikleri adventif sürgünleri 2.5µM IBA (0.5 mg/L) ilaveli ½ MS ortamlarında %100 oranında köklendirmişlerdir.



Şekil 4.42: Adventif sürgün uzunluğu üzerine NAA, BA ve NAA:BA kombinasyonunun etkisi

Aynı grafikte benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan Çoklu Oran Testine göre $p < 0.05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.



Şekil 4.43: Adventif sürgünlerin köklenmesi üzerine oksinlerin etkisi

Sonuçlar $x' = \arcsin \sqrt{(x/100)}$ dönüşümü yapılarak varyans analizinde kullanılmıştır. Aynı grafikte benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan Çoklu Oran Testine göre $p < 0.05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.



Şekil 4.44: ½ MS + 0.5 mg/L IBA'da köklendirilmiş bitkicik

Erdağ ve Emek (2005)'in *Asteraceae* üyesi CR kategorisinde *Anthemis xylopoda* ile gerçekleştirdikleri bir çalışmada köklenme teşviki için IBA'nın IAA'dan daha etkili olduğunu belirtmişler ve en yüksek köklenmeyi 0.5 mg/L IBA ilaveli MS ortamında % 60 olarak elde etmişlerdir. Bizim çalışmalarımızda da köklenme teşviki için IBA, NAA ve IAA'dan daha etkili bir oksindir.

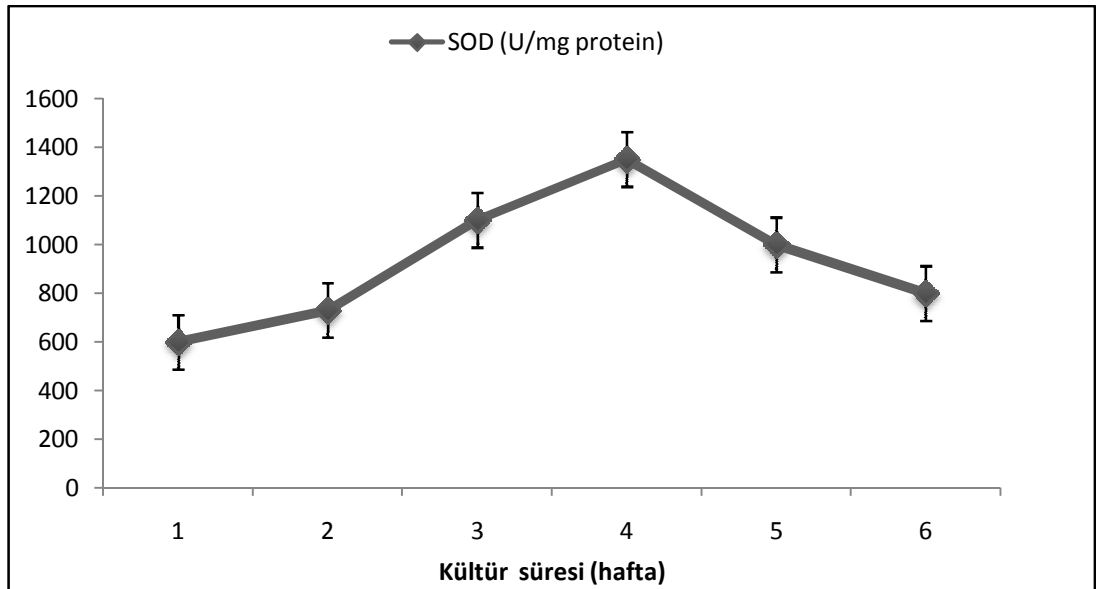
Köklendirilen bitkicikler kademeli olarak dış ortama aktarılmışlardır. Dış ortama aktarılan bitkiciklerin % 70'i hayatta kalmayı başarmıştır.

4.3. Antioksidan Enzim Aktiviteleri İle İlgili Sonuçlar

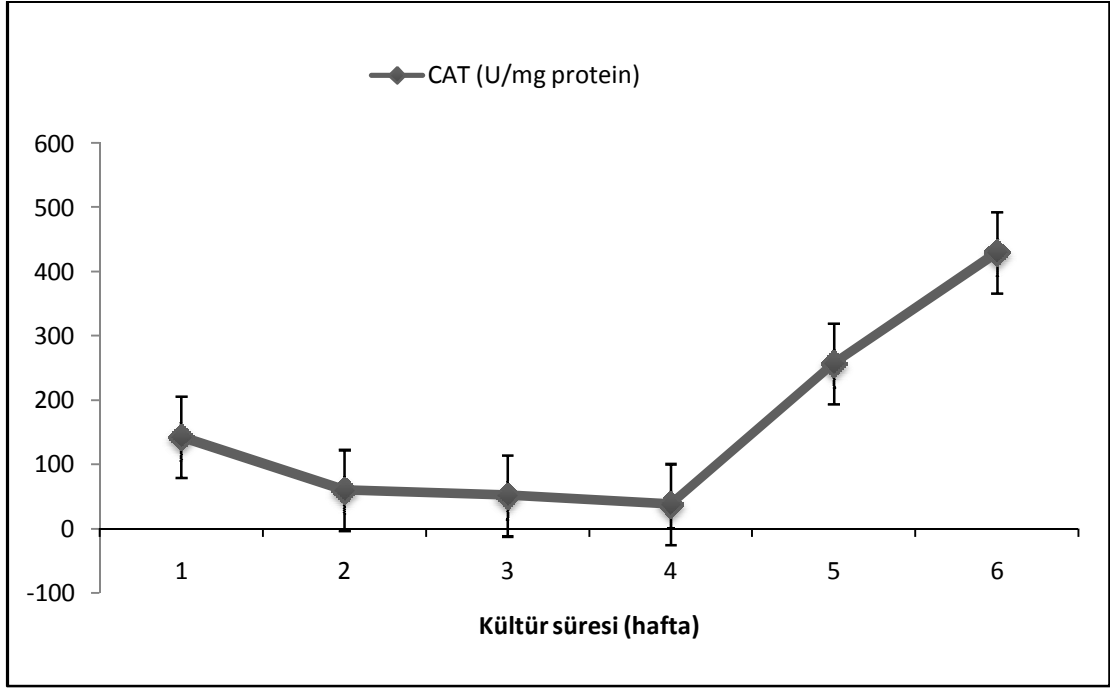
Organogenez ve somatik embriyogenez süreçleri boyunca SOD, PO ve CAT gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde değişiklikler gözlenmiştir.

Organogenez süreci boyunca antioksidan enzimlerde önemli etkinlik değişiklikleri Şekil 4.45, Şekil 4.46 ve Şekil 4.47’de gösterilmiştir. Yaprak eksplantlarından kallus oluşumu sırasında SOD aktivitesi dereceli bir şekilde artmıştır. Kültürün 4. haftasından sonra adventif sürgün oluşturma ortamına alınan kalluslar üzerinde sürgün tomurcukları belirmeye başlamıştır. Bu sırada SOD aktivitesinde de dereceli bir düşüş gözlenmiştir. Sürgün oluşumu süreciyle birlikte SOD aktivitesinde düşüş devam etmiştir.

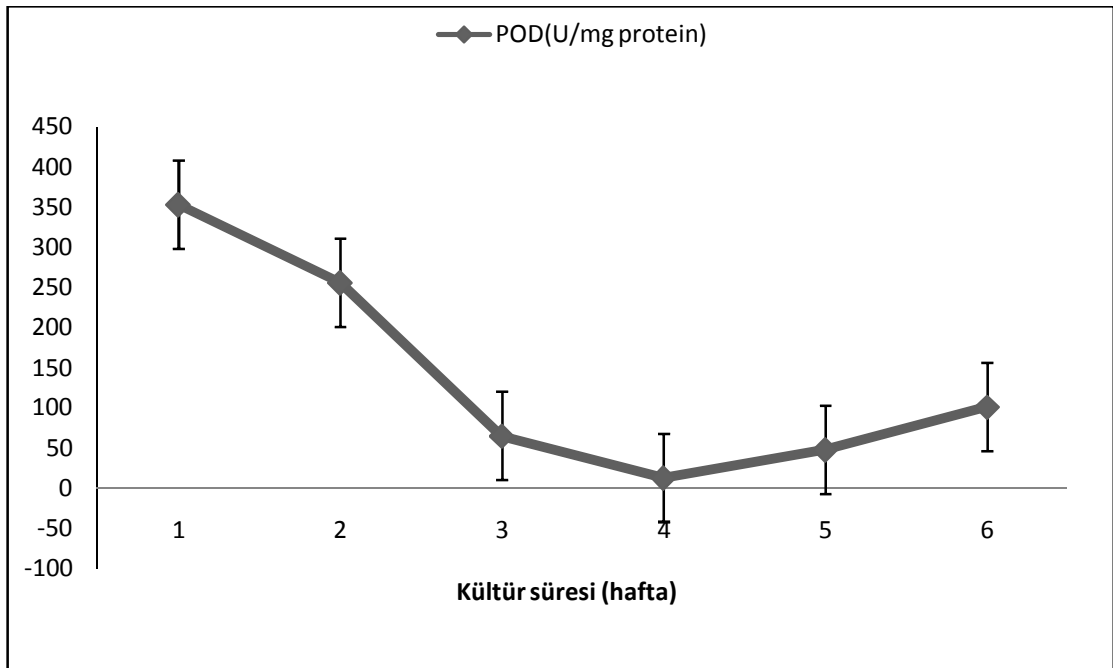
Kültürün ilk haftasında PO aktivitesi, CAT aktivitesine göre daha yüksek bir değere sahiptir. Kallus oluşumu süreci boyunca ise her iki enzim aktivitesinde de düşüş gözlenmiştir. Sürgün teşviki ortamına aktarılan kalluslarda ise adventif sürgün oluşumuna bağlı olarak CAT ve PO aktivitelerinde artış meydana gelmiştir.



Şekil 4.45: *R. mykalea*'nın organogenez sürecinde SOD aktivite değişimi



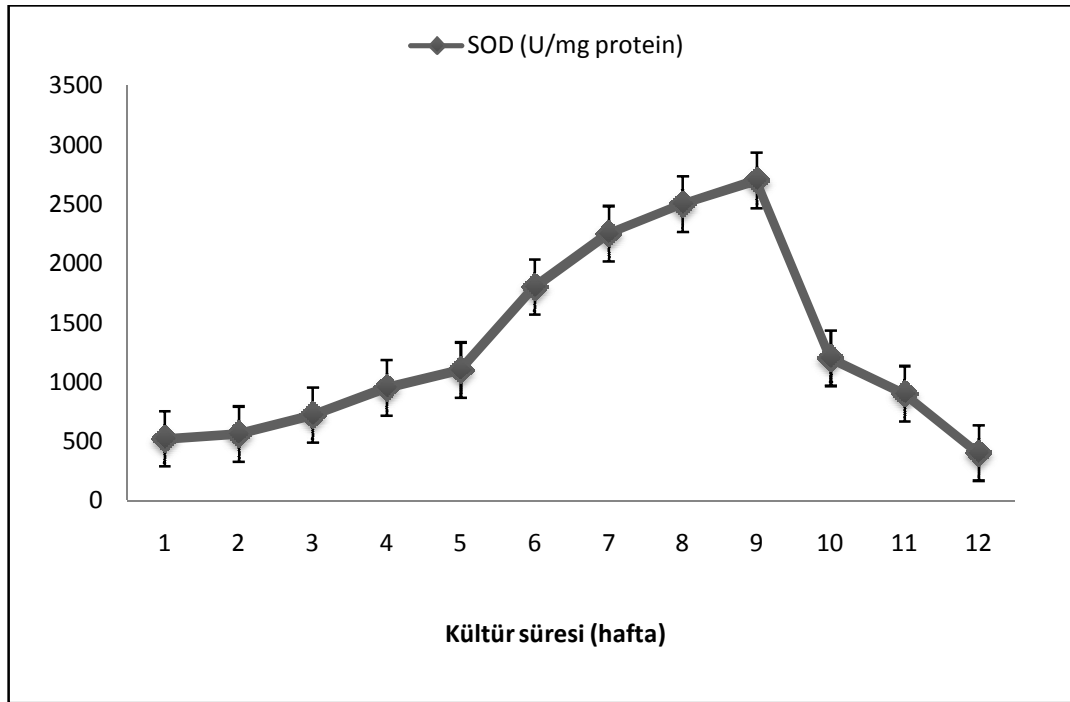
Şekil 4.46: *R. mykalea*'nın organogenez sürecinde CAT aktivite değişimi



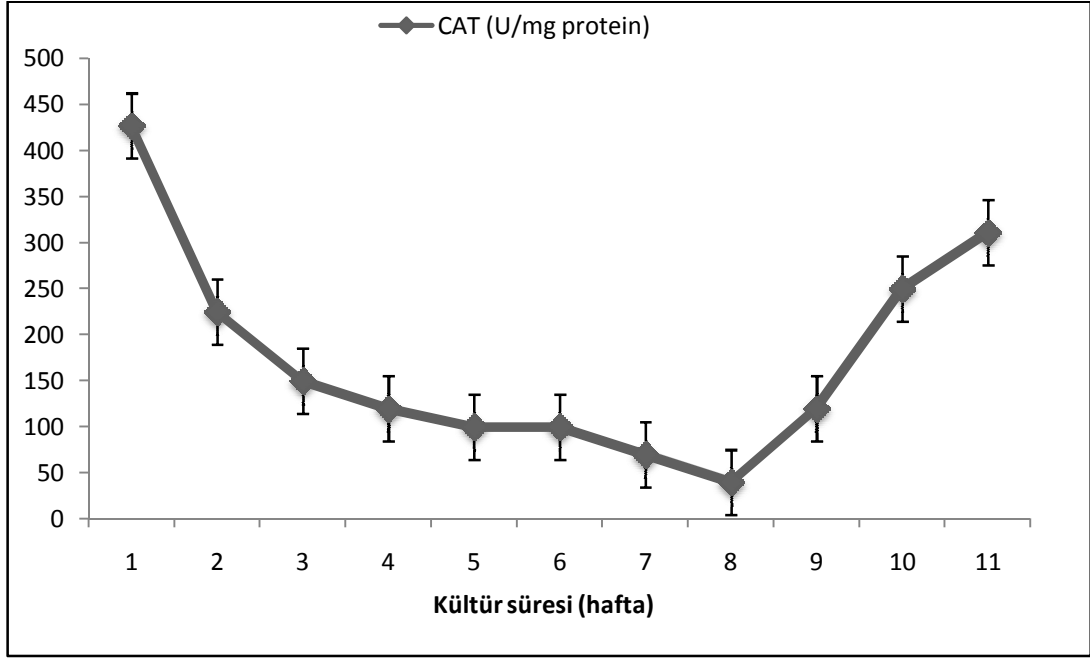
Şekil 4.47: *R. mykalea*'nın organogenez sürecinde PO aktivite değişimi

Somatik embriyogenez süreci boyunca antioksidan enzimlerde önemli etkinlik değişiklikleri Şekil 4.48, Şekil 4.49 ve Şekil 4.50’de gösterilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, SOD aktivitesi somatik embriyogenezin erken safhası olan embriyogenik kallus oluşumu sıralarında dereceli bir şekilde artmıştır. Embriyogenez süreçlerinden olan globular yapıların oluşması ve somatik embriyoların farklılaşması sırasında, SOD aktivitesi de azalmaya başlamıştır. Somatik embriyo farklılaşması artıkça SOD aktivitesinde düşüş gözlenmektedir.

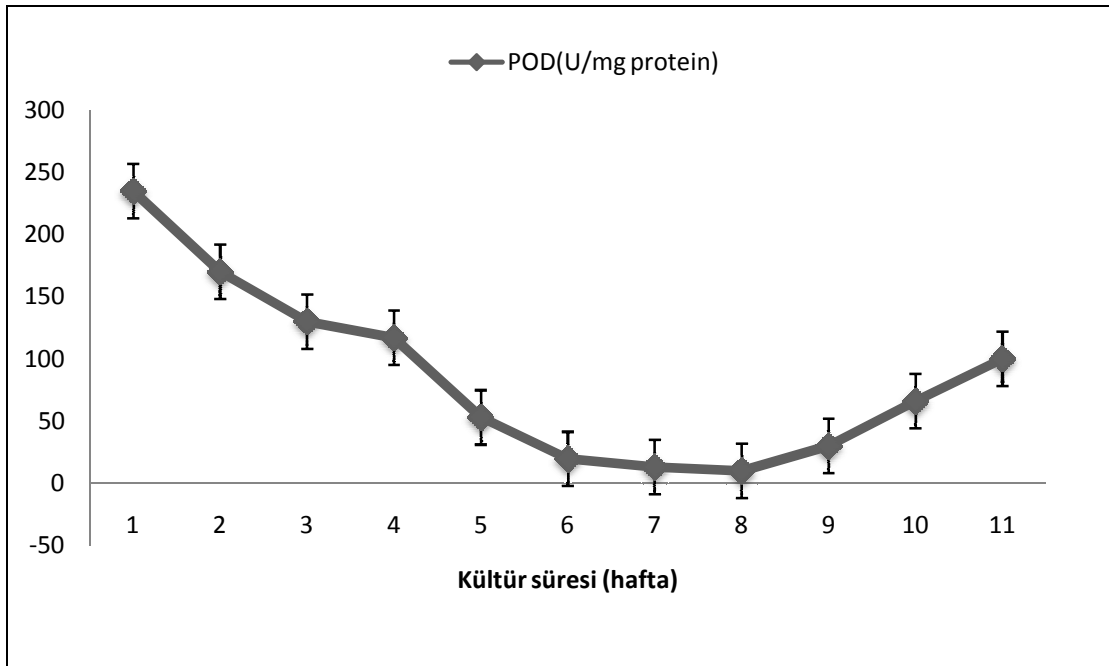
Somatik embriyogenez sürecinde kültürün ilk haftasında CAT aktivitesi PO aktivitesine göre daha yüksek bir değere sahiptir. Embriyogenik kallus oluşumu boyunca ise her iki enzim aktivitesinde de dereceli bir şekilde düşüş gözlenmiştir. Embriyogenez süreçlerinden olan globular yapıların oluşması ve somatik embriyo farklılaşması sırasında ise hem PO hemde CAT enzim aktivitelerinde artış gözlenmektedir.



Şekil 4.48: *R. mykalea*'nın somatik embriyogenez sürecinde SOD aktivite değişimi



Şekil 4.49: *R. mykale*'nin somatik embriyogenez sürecinde CAT aktivite değişimi



Şekil 4.50: *R. mykalea*'nin somatik embriyogenez sürecinde PO aktivite değişimi

Bitkilerin çoğundaki diferansiyasyon ya da de-diferansiyasyon olaylarının *in vitro* süreçlerinin araştırılması, eksplant kaynağının fizyolojik evresi ve donör bitki genotipi üzerine odaklanmıştır (Almeida *et al.*, 2003; Rout *et al.*, 2000).

Normal aerobik metabolizma sonucu, mitokondri ve kloroplastlardaki elektron taşınım zincirinden sızan elektronlar, O₂ ile etkileşime girerek süperoksit (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂), ve hidroksil radikali (HO⁻) gibi reaktif oksijen türlerini oluştururlar (Halliwell ve Gutteridge, 1985). Hücrede reaktif oksijen türlerinin yüksek üretimi oksidatif stres olarak tanımlanmakta olup kuraklık, yüksek ışık yoğunluğu veya *in vitro* kültür gibi stresli çevresel koşullara bitki cevabı ile ilgili yaygın bir olgu olarak nitelendirilmektedir (Price *et al.*, 1989; Scandalios, 1990; Cassells ve Curry, 2001). Hidroperoksil radikali (HO₂⁻), süperoksit radikali (O₂⁻), hidroksil radikali (HO⁻) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) hücrenin redoks sistemini bozar, DNA yapısı, membran özellikleri ve enzim aktivitesindeki direkt değişiklerle ana metabolik yollar etkilenir (Inzé ve van Montagu, 1995; Cassells ve Curry, 2001).

Bitkilerde reaktif oksijen türleri, savunma ya da adaptasyonu başlatan sinyal molekülleri, oksidatif hasar ürünleri ya da primer elisitörler gibi stresle ilişkili normal fizyolojik süreçlerle ilgili cevaplardır. Reaktif oksijen türlerinin çeşidi ve düzeyi strese karşı oluşturulacak cevap tipi için belirleyici faktörlerdir (Prasad *et al.*, 1994; Hernandez *et al.*, 2001). Optimum büyüme koşullarında hücreler, enzim ve metabolitler sayesinde, reaktif oksijen türlerinin vereceği zararlardan korunurlar. Buna paralel olarak, reaktif oksijen türleri aynı zamanda bitki büyüme ve gelişiminde pozitif role de sahiptirler; H₂O₂, hücre çeperlerinin tekrar oluşumuna aracılık eden peroksidazın intramoleküler eter çapraz bağların yapısına katılır (Iiyama *et al.* 1994), ve O₂⁻ ve H₂O₂ savunma sisteminin uyarılmasında sinyal molekül olarak hizmet edebilir (Jabs *et al.*, 1997; Lamb ve Dixon, 1997). Peroksidazlar çeşitli anlatım profilleri ile izoenzim olarak bulunmaktadır. Peroksidazlar, ligninifikasyon, suberizasyon, oksin metabolizması, patojen enfeksiyonlarına karşı savunma mekanizması ve yara iyileştirici olarak değişik fizyolojik süreçlerde rol almaktadır (Hiraga *et al.*, 2001). Apoplastik alanda bitki peroksidazlarının bazı aromatik bileşikten aromatik oksil radikallerini katalizlediği düşünülmektedir (Takahama ve

Yoshitama, 1998), ve peroksidaza bağı olarak böyle organik bileşiklerin üretimi çoğunlukla ROS oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Kagan *et al.*, 1990).

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve elimine edilmesi reaksiyonları normalde denge halindedir (Halliwell, 1982; Foyer ve Mullineaux, 1994). ROS'un seviyesini ayarlamak için bitki hücreleri spesifik aktivite ve spesifik hücresele lokasyonu olan süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidazı içeren kompleks bir antioksidan enzim sistemi geliştirmişlerdir (Inze' ve van Montagu 1995; Noctor ve Foyer, 1997; Scandalios *et al.*, 1997; Hiraga *et al.*, 2001; Alscher *et al.*, 2002).

Oksidatif stres çevresel stresin anahtarıdır ve SOD aktivitesi artışı oksidatif stres ile oluşan zarara karşı artan koruma ile ilişkilidir (Asada, 1999). Yaprak eksplantlarından kallus oluşumu sırasında ve olgunlaşmamış zigotik embriyolardan kallus oluşumundaki SOD aktivitesindeki artış, hücresele oksidatif zarardan korunmaya karşı O_2^- radikallerini süpürmesinden dolayıdır. O_2^- radikalleri seviyesinin SOD tarafından kontrolü, hücresele oksidatif zarara karşı önemli bir koruma mekanizmasıdır. Aksi durumda O_2^- radikali peroksinitrit veya HO gibi daha sitotoksik veya daha yüksek reaktif maddelerin oluşumunda öncü rol alır (Halliwell ve Gutteridge, 1999). Bu nedenle, SOD oksidatif zarara karşı defans sisteminde ilk adım olarak düşünülmektedir (Dewir *et al.*, 2006)

Fotosentez ve solunum sırasında mitokondri ve kloroplastlarda elektron transport zincirinden oksijene sızan elektronlar, bitkilerde hidrojen peroksiti oluşturmaktadır (Asada ve Takahashi, 1987). Bunun sonucunda meydana gelen oksidatif hasar, hidrojen peroksitin toksik seviyelere ulaşmasını sağlamaktadır. Bu nedenle, CAT aktivitesinin artışı, peroksizom ve sitozolde bulunan hidrojen peroksitin süpürülmesi için gereklidir.

Organogenez sürecinde sürgün oluşumu sırasında CAT aktivitesindeki artışın nedeni rejenere olan sürgünlerde üretilen yüksek H_2O_2 'i ortadan kaldırmak için etkili bir süpürücü mekanizmasının bulunmasıdır (Meratan *et al.*, 2009). Rejenere edilmiş sürgünlerde CAT'ın yüksek aktivitede olması sürgünlerdeki yüksek H_2O_2 içeriğinden kaynaklanmaktadır (Meratan *et al.*, 2009). Bizim çalışmalarımızda organogenez sürecinde sürgün oluşumu sırasında CAT aktivitesinin artması Gupta ve Datta

(2003)'nin *Gladiolus hybridus* Hort. ile yaptığı bir çalışmanın sonuçları ve Meratan *et al.* (2009)'nin *Acanthophyllum sordidum* gerçekleştirdiği bir çalışmanın sonuçları ile de paralellik göstermektedir. CAT ve PO'nun büyüme ve farklılaşmada rol oynadıkları bilinmektedir (Gaspar, 1995; Molassiotis *et al.*, 2004) ve onların yüksek aktivitesi sürgün veya kök indüksiyonu sırasında meydana gelen farklılaşma süreci ile ilişkilidir (Thakar ve Bhargava, 1999). Daha da ötesi, CAT ve PO'nun her ikisi de H_2O_2 'i eliminasyonunda rol alsada, H_2O_2 için yüksek reaksiyon oranı fakat düşük affiniteye bağlı olarak CAT sadece hidrojen peroksitin yüksek bir kısmını elimine ederken (Willekens *et al.*, 1997), PO hidrojen peroksitin yüksek affinitesinden dolayı düşük oranda hidrojen peroksiti elimine etmektedir. Ayrıca peroksidazlar, hücre membranının oluşturulmasında olduğu kadar oksin ve etilen metabolizmasında da yer almaktadır ve bundan dolayıda olası "morfogenez markırı" olarak düşünülmektedirler (Joersbo *et al.*, 1989; Zhou *et al.*, 1992; Kawano, 2003).

Meratan *et al.*, (2009)'ın gerçekleştirdiği çalışmada, kallustan sürgün rejenerasyonu sırasında SOD ve CAT aktivitesinde artış, PO aktivitesinde ise azalma gözlemlenmiştir. Oysa bizim denemelerimizde sürgün oluşumu sırasında SOD aktivitesinde azalma, CAT ve PO aktivitesinde ise artış gözlenmektedir. Bu durum da bize sürgün oluşumu sırasında ortamda hidrojen peroksit miktarının arttığını göstermektedir. Doğal olarak normal hücrelerde oluşan hidrojen peroksit, hücre fonksiyonunda uygun bir sinyal molekülü olarak rol alabilmektedir. Hidrojen peroksitin birikimi meristemoidlerin gelişimi ve bunu takiben sürgün primodiyumu oluşumunu sağlamaktadır (Tian *et al.*, 2003). Tian *et al.* (2003), çilek kalluslarından sürgün organogenezi sırasında antioksidan enzimlerin bulunduğunu belirtmişler ve organogenez sırasında SOD aktivitesi artarken PO aktivitesinde azalma gözlemlenmiştir. Gupta ve Datta (2003)'nin yaptığı bir çalışmada yaprak kalluslarından sürgün farklılaşması sırasında CAT ve PO aktivitelerinde artış olduğunu belirtmişlerdir. Kallustan sürgün organogenezi, gen ekspresyonu ve protein sentezi ile ilişkili oldukça karmaşık bir süreçtir (Tian *et al.*, 2003) ve H_2O_2 bu süreçte rol almaktadır (Willekens *et al.*, 1994). Endojen hidrojen peroksit gen ekspresyonu ve protein sentezine neden olabilmekte ve böylece organogenezi düzenlemektedir (Meratan *et al.*, 2009).

Doku kültüründe bitki rejenerasyonu ve ortamın osmotik özellikleri arasında olası bir bağlantı ROS'dan kaynaklanabilmektedir (Konieczny *et al.*, 2008). Somatik embriyogenez ve organogenez *in vitro* şartlar altında bitki çoğaltımını sağlayan birbirinden farklı iki süreçtir (De Klerk *et al.*, 1997). Yüksek şeker konsantrasyonunun somatik embriyogenezde osmotik düzenleyici olarak rol aldığı (Biahoua ve Bonneau 1999; Litze, 1986) ve sukroz konsantrasyonunun somatik embriyo oluşumunda etkili olduğu bilinmektedir (Kamada *et al.*, 1989; Gray *et al.*, 1993; Lou ve Kako, 1995; Jeanin *et al.*, 1995; Nakagawa *et al.*, 2001; Erdağ *et al.*, 2009).

Kairong *et al.* (1999)'nın yaptığı bir çalışmada ise SOD aktivitesinin en yüksek değerinin somatik embriyolar oluşurken gözlemlenmiştir. Daha sonraki aşamalarda ise SOD aktivitesinde düşüş olduğunu belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar kallus fazında CAT ve PO aktivitelerinin yüksek olduğu ve embriyo farklılaşması sırasında ise aktivitede düşüş olduğunu belirtmişlerdir. Oysaki, bizim bulgularımızda embriyogenik kallus oluşumu sırasında CAT ve PO aktivitelerinde düşüş, embriyo farklılaşması sırasında ise artış gözlenmektedir. CAT aktivitesi, PO aktivitesine göre daha yüksek bir değere sahiptir. Gupta ve Datta (2003)'nin yaprak kalluslarından somatik embriyo sürecinde SOD aktivitesinde artış ve somatik embriyo proliferasyonu sırasında ise düşüş gözlemlenmiştir. Aynı araştırmacılar somatik embriyo farklılaşması ve gelişimi sırasında CAT ve PO aktivitelerinde de düşüş gözlemlenmiştir. Tang ve ark. (2005)'nin *Pinus strobus*'un zigotik embriyolarını kullanarak direkt adventif sürgünleri elde ettiği çalışmada ise, kültür periyodunun 0-6 haftasında peroksidaz aktivitesinin azaldığı, kültürün 7 ve 8. haftalarında (geç sürgün tomurcuk oluşum evresi) dereceli olarak arttığı gözlenmiştir. Katalaz aktivitesi ise, devamlı olarak tüm kültür boyunca azalmıştır. Bu sonuçlar da bizim sonuçlarımızla paralellik göstermektedir.

Konieczny *et al.* (2008) *Helianthus annuus* olgunlaşmamış zigotik embriyoları kullanarak sukroz konsantrasyonuna bağlı olarak yüksek sukroz konsantrasyonunda somatik embriyogenez ve düşük sukroz konsantrasyonunda organogenez çalışmaları gerçekleştirmiş, bu süreçler boyunca da bazı antioksidan enzimler aktivitesi değişiklikleri ve içsel hidrojen peroksit seviyesini belirlemiştir. Organogenez ve

somatik embriyogenez süresinde SOD aktivitesi benzer bir şekilde değişmekte olduğunu belirtmiştir. Somatik embriyogenez sürecinde kallus fazı olmaksızın somatik embriyo farklılaşması sırasında CAT aktivitesinde düşüş gözlemlendiğini, direkt organogenez sırasında ise CAT aktivitesinde artış meydana geldiğini belirtmiştir. Peroksidaz aktivitesinin kültür başlangıcındaki eksplantlarda farklı olduğunu, fakat sürgün veya somatik embriyo farklılaşması sırasında farklılıklar gözlemlediklerini belirtmişlerdir. Organogenik kültürlerde hidrojen peroksit seviyesinde değişiklik gözlenmezken, embriyogenik kültürlerde dereceli olarak artış gösterdiğini belirtmiştir.

Somatik embriyogenez çalışmalarında ortamda bulunan hidrojen peroksitin somatik embriyo farklılaşmasında rol aldığı, ve CAT aktivitesindeki düşüş ile somatik embriyo üretiminin arttığı Kairong *et al.* (1999) ve Gupta ve Datta (2003) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda da belirtilmiştir. İlave olarak, araştırmacılar bu çalışmada CAT aktivitesindeki düşüşün somatik embriyogenez ekspresyonu için önemli olan içsel hidrojen peroksit konsantrasyonunun artması ile ilişkili olduğunu da belirtmiştir.

Bizim çalışmalarımızda kültür başlangıcında CAT aktivitesindeki azalma eksplanttaki endojen hidrojen peroksit artışı ile uyumaktadır. Kairong *et al.* (1999) ve Gupta ve Datta (2003), kültür ortamına ilave edilen H₂O₂'nin *Lycium barbarum* ve *G. hybridus* 'un somatik embriyogenez frekansını arttırdığını belirtmişlerdir. Antioksidantlar, yabani *Daucus carota* 'nın somatik embriyo oluşumunda etkili olduğu Earnshaw ve Johnson (1987) tarafından da rapor edilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Tür ile ilgili olarak yapılan arazi gözlemleri sırasında Kuşadası lokalitesindeki populasyonların durumu ve tehdit faktörleri belirlenmiştir. 2 yıllık bir ön çalışmadan elde edilen veriler, türün doğadaki yayılışının yapılaşma, tarımsal etkinlikler ve yiyecek amaçlı tüketim nedeniyle sınırlandırıldığını göstermektedir. Önümüzdeki yıllarda yapılacak ek gözlem ve sayımların türün populasyon durumu hakkında daha kapsamlı veriler sağlayacağı kuşku götürmez durumdadır, ancak bu günkü hali ile *R. mykalea* belirttiğimiz 3'lü tehdit altında ancak tarıma uygun olmayan maki adacıklarında, henüz iskana açılmamış az sayıdaki alanda ve yol kenarlarında yaşama tutunma mücadelesi veren gerçekten "kritik tehlike" altındaki bir endemik türümüz olarak değerlendirilmelidir. Ayrıca bitki kapitulumlarının çok sayıda boş tohum içermesi ve olgun tohumların böcekler tarafından büyük ölçüde tahribatı türün reproduktif üremesini sınırlayıcı bir faktör olarak değerlendirilmeli ve koruma biyolojisine yönelik çalışmalarda polen canlılığı, stigma olgunluğu ve tohum/ovul oranı vb. çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.
2. Bitkinin tohum canlılığı %80 olarak belirlenmiştir. Ancak *in vitro* çimlenme denemelerinden elde edilen sonuçlar oldukça düşüktür. Denemeler sırasında olgun tohumların çeşitli dormansi faktörlerinin etkisi altında olduğu görülmüş, ancak bu dormansi *in vitro* denemeler sırasında aşılammıştır. 8 aylık bekletme sonrası pH'ı 7.5'e ayarlanmış distile su ortamındaki tohumların 18 °C'ta karanlıkta tutulması ile maksimum çimlenme yüzdesine (% 30) ulaşılmıştır.
3. Embriyo kültürü denemelerinde olgunlaşmamış zigotik embriyolar kallus oluşumu şeklinde cevap verirken, olgunlaşmış zigotik embriyolar çimlenerek bitkicik gelişimi göstermişlerdir. En yüksek embriyo çimlenmesi 0.01 mg/L TDZ ilaveli MS ortamında (% 63.33) elde edilmiştir. Olgunlaşmış zigotik embriyoların kullanılması ile embriyo kültürü denemeleri *R. mykalea* türünün üretiminde, dormansi periyodunu kısaltarak hatta ortadan kaldırılarak kısa

sürede bitki eldesi bakımından alternatif bir yöntem olarak değerlendirilmelidir.

4. Olgunlaşmamış zigotik embriyoların eksplant olarak kullanılmasıyla somatik embriyogenez çalışmaları gerçekleştirilmiştir. En yüksek oranda kallus oluşumu 0.25 mg/L NAA ve 1 mg/L BA ilaveli MS ortamında elde edilmiştir (% 75). 0.1 mg/L BA ve % 6 sukroz ilaveli MS ortamında en yüksek oranda embriyo farklılaşması görülmüştür (19.25 somatik embriyo/kallus). Yüksek sukrozlu MS ortamında (% 12) farklılaşan ve gelişen embriyolar, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen % 3 sukroz ilaveli MS ortamında % 15.75 oranında bitkiciğe dönüşmüşlerdir. Elde edilen bitkiciklerin % 80'i başarılı bir şekilde dış ortam şartlarına uyum göstermişlerdir. Somatik embriyogenez çalışmalarında kullanılan zigotik embriyolar henüz olgunlaşmamış olduğundan tohumun gireceği ve uzun süre kalacağı dormansi periyoduna maruz kalmamış ve böceklerin tahribatına uğramamışlardır. Bunun yanında, bir olgun embriyodan bir birey elde edilebilir olması yanında bir olgunlaşmamış zigotik embriyodan daha yüksek oranda somatik embriyo ve dolayısıyla daha yüksek oranda bireyler elde edilebilmektedir. Somatik embriyolar iki kutuplu yapılar olduklarından kolayca bitkiciğe dönüşebilmekte, köklenme için ayrı bir uygulamaya gerek duyulmamaktadır. Bu nedenlerden dolayı, olgunlaşmamış zigotik embriyolardan somatik embriyogenez yoluyla bitki rejenerasyonu çok sayıda bitki elde etmek açısından alternatif üretim yöntemi olarak değerlendirilmelidir.
5. Aksiller sürgün çoğaltımı, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamı dahil tüm ortamlarda teşvik edilmiştir. Ancak denemelerde BA'nın KIN'e göre daha etkili bir sitokinin olduğu görülmektedir. Eksplant başına maksimum sürgün sayısı 0.5 mg/L BA ilaveli MS ortamında elde edilmiştir (5.8 sürgün/eksplant). Aksiller sürgün çoğaltımı çalışmalarında maksimum sürgün uzunluğu bakımından değerlendirilme yapıldığında en iyi sonucun 0.1 mg/L KIN ilaveli ortamda elde edildiği görülmektedir (7.35). Köklenmede en etkin oksin IBA olarak belirlenmiş ve en yüksek köklenme yüzdesi 0.5 mg/L IBA ilaveli ½ MS ortamında elde edilmiştir.

6. Yaprak eksplantlarının başlangıç materyali olarak kullanıldığı adventif sürgün rejenerasyonu denemelerinde eksplantlar öncelikle kallus oluşturmuştur. NAA'nın 1 mg/L'lik konsantrasyonu en yüksek kalluslaşma yüzdesini vermektedir (% 75). Bu konsantrasyonun artan ve azalan miktarları ise % kallus oluşumunu azaltmaktadır. Kallusların rejenere edilmesi ile adventif sürgünler elde edilmiştir. Kallus başına ortalama 4.2 sürgün sayısı ile 0.5 mg/L NAA ve 2 mg/L BA kombinasyonu sürgün oluşumu bakımından en uygun kombinasyondur. Adventif sürgünlerin köklendirilmesi denemelerinde en yüksek köklenme oranı $\frac{1}{2}$ MS + 0.5 mg/L IBA'da % 45 olarak elde edilmiş ve bunu % 35 oranında $\frac{1}{2}$ MS + 1 mg/L IBA ve MS+ 1.0 mg/L IBA izlemiştir.

Aksiller ve adventif sürgün rejenerasyonu gibi *in vitro* teknikler yok olma tehlikesi ile karşı karşıya olan *R. mykalea* bitkisi için kısa sürede çok sayıda bitki elde etmek açısından alternatif üretim yöntemleri olarak değerlendirilmelidir.

7. Organogenez sürecinde kallus oluşumu ile birlikte SOD aktivitesinde artış ve kalluslardan sürgün rejenerasyonu sırasında ise kademeli bir şekilde azalma gözlenmiştir. CAT ve PO aktiviteleri kallus oluşumu sırasında azalırken, sürgün tomurcukları oluşumu sırasında artmıştır. Somatik embriyogenezin erken safhası embriyogenik kallus oluşumu sırasında SOD miktarı dereceli bir şekilde artmıştır. Kalluslarda globular oluşumlar meydana gelince, SOD miktarı da dereceli bir şekilde azalmaya başlamıştır. Embriyo oluşumu artışıyla SOD aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Kültür başlangıcında CAT ve PO aktiviteleri oldukça yüksek bir değere sahipken somatik embriyogenez süreçleri sırasında dereceli olarak azalmaktadır. Sonuç olarak, antioksidan enzimdeki değişimler *R.mykalea*'nın organogenez ve somatik embriyogenez süreçlerini etkilemektedir. Bu denemeler sonucunda elde edilen bulgular, bu konuda daha ayrıntılı çalışmaların yapılması konusunda öncülük edecek nitelik taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Açık, L., Öztürk, F., Vural, M., Tugay, O. and Gürcan, I.S. 2009. Analysis of genetic variation among accessions of critically endangered *Rhaponticoides iconiensis* and *Rhaponticoides mykalea* based on RAPD and SDSPAGE markers. **Afr. J. Biotechnol.**, Vol. 8 (10); 2076-2082.
- Almeida, W.A.B., Filho, F.A.A.M., Pino, L.E., Boscariol, R.L., Rodriguez, A.P.M. and Mendes, B.M.J. 2003. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L, Osbeck. **Plant Sci.**, 164; 203-211.
- Alscher-Herman, R., Musgrave, M., Leopold, A.C. and Khan, A.A. 1981. Respiratory changes with stratification of pear seeds. **Physiol. Plant.**, 52;156-160.
- Alscher, R.G., Erturk, N. and Heath, L. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **J. Exp. Bot.**, 53; 1331-1341.
- Alvard, D., Cote, F. and Tiesson, C. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 32; 55-60.
- Ammirato, P.V. 1983. Embryogenesis. In: Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 1, Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V., Yamado, Y. (eds), pp. 82-123. Macmillan, New York.
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplast: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 50; 601-639.
- Asada, K. and Takahashi, M. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Photoinhibition. Kyle, D.J., Osmond, C.R., Arntzen, C.J. (eds), Elsevier, pp.227-286, Amsterdam.
- Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. 2002. Bitki Biyoteknolojisi (Doku Kültürü ve Uygulamaları). Selçuk Üniversitesi Basımevi, 374s., Konya.
- Barnes, L.R. 1979. *In vitro* propagation of watermelon. **Scientia Hort.**, 11; 223-227.
- Baskin, C. C. and Baskin, J.M. 2001. *Seeds*. Academic Press, Lexington, Kentucky.
- Beauchamp, C.O. and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. **Anal. Biochem.**, 44; 276-287.

- Beers, R.F.J. and Sizer, I.W. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **J. Biol. Chem.**, **195**; 133-140.
- Benvenuti, S. and Macchia, M. 1997. Light environment, phytochrome and germination of *Datura stramonium* L. seeds. **Environ. Exp. Bot.**, **38**; 61-71.
- Bewley, J.D. 1997. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, **9**; 1055-1066.
- Bewley, J.D and Black, M. 1982. *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination*, Springer-Verlag, Berlin.
- Bewley, J.D and Black, M. 1994. *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Second Edition. Plenum Press, New York.
- Bhatia P., Bhatia N. and Ashwath N. (2004). Somatic embryogenesis in the nickel hyper accumulating shrub, *Hybanthus floribundus* (Lindl.) F. Muell. **Plant Tiss. Cult.**, **14**; 1-7.
- Bhojwani, S.S. and Razdan, M.K. 1996. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Revised Edition, Elsevier Science, pp. 297-335, Amsterdam.
- Biahoua A., Bonneau L. (1999). Control of *in vitro* somatic embryogenesis of the spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) by the sugar type and the osmotic potential of the culture medium. **Plant Cell Reports**, **19**; 185-190.
- Biggs, B.J., Smith, M.K. and Scott, K.J. 1986. The use of embryo culture for the recovery of plants from cassava (*Manihot esculenta* crantz) seeds. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, **6**; 229-234.
- Bogatek, R. and Lewak, S. 1988. Effect of cyanide and cold treatment on sugar catabolism in apple seeds during dormancy removal. **Physiol. Plantarum**, **73**; 406-411.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, **72**; 248-254.
- Brandel, M. 2004. The role of temperature in the regulation of dormancy and germination of two related summer-annual mudflat species. **Aquat. Bot.**, **79**; 15-32.
- Bronner, R., Jeanin, G. and Hahne, G. 1994. Early cellular events during organogenesis and somatic embryogenesis induced on immature zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Can. J. Bot.**, **72**; 239-248

- Bürün, B. and Gürel, A. 2002. Embriyo kültürü. In: Bitki Biyoteknolojisi I- Doku Kültürü ve Uygulamaları. Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (eds), Selçuk Üniversitesi Basımevi, pp. 324-344, Konya.
- Callihan, R.H., Prather, T.S. and Northam, F.E. 1993. Longevity of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*) achenes in soil. **Weed Tech.**, **7**; 33-35.
- Cardemil, L. and Rainero, A. 1982. Changes of *Araucaria araucana* seed reserves during germination and early seedling. **Can. J. Bot.**, **60**; 1629-1639.
- Cassells, A.C. and Curry, R.F. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, **64**;145-157.
- Chawla, H.S. 2002. *Introduction to Plant Biotechnology*. Science Publishers, Inc., p.538., Plymouth, UK.
- Chiwocha, S.D.S., Cutler, A.J., Abrams, S.R., Ambrose, S.J., Yang, J., Ross, A.R.S. and Kermode, A.R. 2005. The *etr1-2* mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination. **Plant J.**, **42**; 35-48.
- Christianson, M. L. and Warnik, D.A. 1983. Competence and determination in the process of *in vitro* organogenesis, **Dev. Biol.**, **95**; 288-293.
- Christianson, M.L. and Warnik, D.A. 1985. Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. **Dev. Biol.**, **112**; 494-497.
- Chu, I.Y.E. 1992. Perspectives of micropropagation industry. In: Transplant Production Systems. Kurata, K. and Kozai, T. (eds), Kluwer Academic, pp.137-150, Amsterdam.
- Cuenca, S., Marco, J.B. and Parra, R. 1999. Micropropagation from inflorescence stems of the Spanish endemic plant *Centaurea pauri* Loscos ex Wilk. (Compositae). **Plants Cell Rep.**, **18**; 674-679.
- Cuenca, S. and Marco, J.B. 2000. *In vitro* propagation of *Centaurea spachii* from inflorescence stems. **Plant Growth Regul.**, **30**; 99-103.
- Çakırcılar, H., Çiçek, N. ve Doğru, A. 2005. *Centeurea tchihatcheffii* Fisch. Et Mey.'in çimlenme fizyolojisi. In: *Centeurea tchihatcheffii*. Boşgelmez, A. (eds), Bizim Büro Basımevi, pp.309-324, Ankara.

- Çelik, S. and Yücel, E. 2008. Conservation strategy of critical endemic *Centaurea hausknetchii* Boiss. (Section: *Cyanoroides*) and effects of different salt, nitrate and acid concentrations on the germination of seeds. **Asian J. Chem.**, **20**, No. **5**; 4051-4058.
- Davies, K.J.A. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals, I. General aspects. **J. Biol. Chem.**, **262**; 9895-9901.
- Davis, P.H. 1982. "Flora of Turkey and the East Aegean Islands" Volume:8. Edinburgh University Press., Edinburgh.
- Davis, P.H., Mill, R.R. and Tan, K. 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh at the University Press, Vol:10: 166-169, Edinburgh.
- De Jong, A.J., Schmidt, E.D.L. and De Vries, S.C. 1993. Early events in higher plant embryogenesis. **Plant Mol. Biol.**, **22**; 367-377.
- De Klerk, G.J. 1996. Markers for adventitious root formation. **Agronomie**, **16**; 609-616.
- De Klerk, G.J., Arnholdt-Schmitt, B., Lieberei, R. and Neumann, K.H. 1997. Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. **Biol. Plant.**, **39**; 53-66.
- Debergh, P.C. and Read, P.E. 1993. Micropropagation. In: Micropropagation Technology and Application. Debergh, P.C., Zimmerman, R.H.(eds), Kluwer Academic Publishers, pp.1-15, Dordrecht, Holland.
- Del Ry'o L.A., Pastori, G.M., Palma, J.M., Sandalio, L.M., Sevilla, F., Corpas, F.J., Jimenez, A., Lopez-Huertas, E. and Herman'dez, J.A. 1998. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. **Plant Physiol.**, **116**; 1195-1200.
- Densmore, R.V. 1997. Effect of day length on germination of seeds collected in Alaska. **Am. J. Bot.**, **84** (2); 274-278.
- Dewir, Y.H., Chakrabarty, D., Ali, M.B., Hahn, E.J. and Paek, K.Y. 2006. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. **Environ. Exp. Bot.**, **58**; 93-99.
- Devlin, R. 1975. Dormancy. In: Plant Physiology, Third Edition. D. Van Nostrand Company. pp: 551-564.
- Dhar, U. and Joshi, M. 2005. Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (Asteraceae): Effect of explant type, age and plant growth regulators. **Plant Cell Rep.**, **24**; 195-200.

- Dornbos, D.L. 1995. Production environment and seed quality. In: Seed Quality. Basic Mechanisms and Agricultural Implications. Basra, A.S. (eds), Food Products Press, pp. 119-145, London.
- Dweikat, I.M. and Lyrene, P.M. 1989. Response of highbush blueberry seed germination to gibberellin A₃ and ⁶N-benzyladenine. **Can. J. Bot.**, **67**; 3391-3393.
- Earnshaw, B.A. and Johnson, M.A. 1987. Control of wild carrot somatic embryo development by antioxidants. **Plant Physiol.**, **85**; 273-286
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., ve Adıgüzel, N. 2000. *Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler)*. Türkiye Tabiatını Koruma Derneği, Ankara.
- Eira, M. S. and Caldas, L. S. 2000. Seed dormancy and germination as concurrent processes. **R. Bras. Fisiol.**, **12**; 85-104.
- Elstner, E.F. 1987. Metabolism of activated oxygen species. In: The Biochemistry of Plants, Vol.II, Biochemistry of Metabolism. Davies, D.D. (eds), Academic Press, pp.252-315, San Diego, CA.
- Emek, Y. and Erdağ, B. 2007. *In vitro* propagation of *Gladiolus anatolicus* (Boiss.) Stapf. **Pak. J. Bot.**, **39 (1)**; 23-30.
- Endress, H.R. 1994. Basic techniques. In: Plant Cell Biotechnologies, Springer Verlag-Berlin, pp.16-17, Heidelberg.
- Erdağ, B. ve Emek, Y. 2005. *In vitro* micropropagation of *Anthemis xylopoda* O. Schwarz, a critically endangered species from Turkey. **Pak. J. Biol. Sci.**, **8 (5)**; 691-695.
- Erdağ, B. and Emek, Y. 2009. Adventitious shoot regeneration and *in vitro* flowering of *Anthemis xylopoda* O. Schwarz, a critically endangered Turkish Endemic. **Turk. J. Biol.**, **33(4)**; 319-326.
- Erdağ, B., Emek, Y. and Aktaş, L.Y. 2009. *In vitro* somatic embryogenesis from cormel-derived callus cultures of *Gladiolus anatolicus*. **Propag. Ornam. Plants**, **9(4)**; 176-180.
- Eren, Ö. 2007. The genus *Rhaponticoides* Vaill. (Asteraceae) in Turkey: a new species and first key. **Plant Syst. Evol.**, **267**; 13-23.
- Etkin, N.L. 1998. Indigenous patterns of conserving biodiversity: pharmacologic implications. **J. Ethnopharmacol.**, **63**; 233-245.

- Evenor, D. and Reuveni, M. 2004. Micropropagation of *Achillea filipendulina* cv. 'Parker'. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, **79**; 91-93.
- Fay, M.F. 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. **In Vitro Cell. Develop. Biol.-Plant**, **28**; 1-4.
- Fenner, M. 1985. Seed Ecology. Chapman and Hall. London.
- Finer, J.J. 1987. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) on a high sucrose containing medium. **Plant Cell Rep.** **6**; 372-376.
- Fonnesbach, A. and Fonnesbach, M. 1980. *In vitro* propagation of *Monstera deliciosa*. **Hort. Sci.**, **15(6)**; 740-741.
- Fountain, D.W. and Bewley, J.D. 1976. Modulation of pre-germination protein synthesis by gibberellic acid, abscisic acid, and cytokinin. **Plant Physiol.**, **58**; 530-536.
- Fowler, L.M.O., Russinova, A.I., Scott, A.S. and Elliott, M.C. 1998. Early changes in gene expression during direct somatic embryogenesis in alfalfa revealed by RAP-PCR. **J. Exp. Bot.**, **49**; 249-253.
- Foyer, C.H., Mullineaux, P. 1994. *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. Boca Raton, Florida.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F. and Scott, I.M. 1997. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. **Physiol. Plant**, **100**; 241-254
- Franklin, C.I. and Dixon, R.A. 1994. *Initiation and Maintenance of Callus and Cell Suspension Cultures*. Oxford University Pres. Oxford. UK.
- Fridovic, I. 1986. Biological effects of superoxide radical. **Arch. Biochem. Biophys.**, **247**; 1-11.
- Fuentes, S.R.L., Calheiros, M.B.P., Manetti-Filho, J. and Vieira, L.G.E. 2000. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell Rep.**, **19**; 185-190.
- Gamborg OL, Miller RA, 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: Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Fundamental

Methods. Gamborg, O.L. and Phillips, G.C. (eds), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Gaspar, T. 1995. The concept of cancer in *in vitro* plant cultures and the implication of habituation to hormones and hyperhydricity. **Plant Tiss. Cult. Biotechnol.**, **1**; 126-136.

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

Gidrol, X., Lin, W.S., Degousee, N., Yip, S.F. and Kush, A. 1994. Accumulation of reactive oxygen species and oxidation of cytokinin in germinating soybean seeds. **Eur. J. Biochem.**, **224**; 21-28.

Gray, D.J., Mcolley, D.W. and Compton, M.E. 1993. High frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* cultivars. **J. Am. Soc. Horticult. Sci.**, **118**; 425-465.

Gupta, S.D. and Datta, S. 2003. Antioxidant enzyme activities during *in vitro* morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidants on plant regeneration. **Biol. Plant.**, **47(2)**; 179-183.

Guri, A. Z. and Patel, K.N. 1998. Compositions and Methods to Prevent Microbial Contamination of Plant Tissue Culture Media. United States Patent 5 750, 402.

Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., and Başer, K.H.C. 2000. "Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Supplement 2)" Vol. 11. University Press, Edinburgh.

Halliwell, B. 1982. The toxic effects of oxygen on plant tissues. In: Superoxide Dismutase, Vol. 1. Oberley, L.W. (eds), CRC Press, pp. 89-123, Boca Raton FL.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1985. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Oxford University Press, New York.

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. and Moore, K.G. 1970. The shapes and sizes of seeds. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, **1**; 327-356.

- Hartman, H.T., Kester, D.E. 1975. *Plant Propagation - Principles and Practices*. Prentice-Hall. Inc., New Jersey.
- Hartmann, K., Krobb, C. and Mollwo, A. 1997. Phytochrome-mediated photocontrol of the germination of the Scentless Mayweed, *Matricaria inodora* L., and its sensitization by nitrate and temperature. **J. Photochem. Photobiol. B: Biology**, **40**; 240–252.
- Hellwig, F.H. 2004. Centaureinae (Asteraceae) in the Mediterranean-history of ecogeographical radiation. **Plant Syst. Evol.**, **246**; 137-162.
- Hernandez, J.A., Ferrer, M.A., Jimenez, A., Barcelo, A.R. and Sevilla, F. 2001. Antioxidant systems and O_2^- / H_2O_2 production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. **Plant Physiol.**, **127**; 817-831.
- Herzog, V. and Fahimi, H. 1973. Determination of the activity of peroxidase. **Anal. Biochem.** **55**; 554-562.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohasi, Y. and Matsui, H. 2001. A large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiol.**, **4**; 462-468.
- Ho, R.H. 1987. Embryo culture. **Cell Tiss. Cult. Forest.**, **2**; 137–167.
- Hu, C.Y., Wang, P.J. 1986. Embryo culture: technique and application. In: *Handbook of Plant Cell Culture*, vol 4. Evans, D.A, Sharp, W.R. and Ammirato, P.B. (eds), Macmillan, pp. 43-96, New York.
- Hu, C.Y., Zanetini, M.H.B. 1995. Embryo culture and embryo rescue for wide cross hybrids. In: *Plant Cell Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods*. Gamborg O.L. and Phillips, G.C. (eds), Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 129 140, Germany.
- Iglesias, R.G. and Babiano, M.J. 1997. Endogenous abscisic acid during the germination of chickpea seed. **Physiol. Plant.**, **100**; 500–504.
- Iiyama, K., Lam, T.B.T. and Stone, B.A. 1994. Covalent cross-links in the cell wall. **Plant Physiol.**, **104**; 315-320.
- Imlay, J.A. and Linn, S. 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. **Science**, **240**; 1302-1309.
- Inzè, D. and van Montagu, M. 1995. Oxidative stress in plants. **Curr. Opin. Biotechnol.**, **6**; 153–158.

- Iriondo, J.M. and Perez, C. 1996. Micropropagation and *in vitro* strage of *Centaurium rigualii* Esteve (*Gentianaceae*). **Israel J. Plant Sci.**, **44**; 115-123.
- ISTA. 1966. International rules for seed testing. **Proceed. Internat. Seed Test. Assoc.**, **31**; 92–106.
- Jabs, T., Tschope, M., Colling, C., Hahlbrock, K. and Scheel, D. 1997. Elicitor stimulated ion fluxes and superoxide from the oxidative burst are essential component in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **94**; 4800–4805.
- Jeanin, G., Bronner, R. and Hahne, G. 1995. Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivated *in vitro*: role of the sugar. **Plant Cell Rep.**, **15**; 200–204.
- Jehan, H., Courtois, D., Ehret, C., Lerch, K. and Petiard, V. 1994. Plant regeneration of *Iris pallida* Lam. and *Iris germanica* L. via somatic embryogenesis from leaves, apices and young flowers. **Plant Cell Rep.**, **13**; 671–675.
- Joersbo, M., Anderson, J.M., Okkels, F.T. and Rajagopal, R. 1989. Isoperoxidasesas markers of somatic embryogenesis in carrot cell suspension cultures. **Physiol. Plant.**, **6**; 10-16.
- Joshi, M. and Dhar, U. 2003. *In vitro* propagation of *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew.–an endangered ethnoreligious medicinal herb of Himalaya. **Plant Cell Rep.**, **21**; 933-939.
- Kairong, C., Gengsheng, X., Xinmin, L., Gengmei, X. and Yafu, W. 1999. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. **Plant Sci.**, **146**; 9-16.
- Kamada, H., Kobayashi, K., Kiyosue, T., and Harada, H. 1989. Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, **25**; 1163–1166.
- Karam, N.S. and Al-Salem, M.M. 2001. Breaking dormancy in *Arbutus andrachne* L. seeds by stratification and gibberellic acid. **Seed Sci. Technol.**, **29** (1); 51-56.
- Kauffman, M.R. 1969. Effects of water potential of germination of lettuce, sunflower and *Citrus* seeds. **Can. J. Bot.**, **49**; 410-515.

- Kawano, T. 2003. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defence and growth induction. **Plant Cell Rep.**, **21**; 829-837.
- Kaynak, G. and Tarımcılar, G. 2001. New floristic records for the grid square B3 Uluborlu - Isparta, Turkey. **Turk. J. Bot.**, **25**; 163-165.
- Kermode, A.R. 1990. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. **Crit. Rev. Plant Sci.**, **9**; 155-195.
- Kermode, A. R. 1995. Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: Interaction between the embryo and the seed environment. In: Seed Development and Germination. Kigel, J. and Galili, G.(eds), Marcel Dekker Inc., pp. 273-332.,New York-Basel-Hong Kong.
- Kevseroğlu, K. 1993. The effects of some physical and chemical treatments on germination of *Datura stromonium* seeds. **Turk. J. Agric. Forest.**, **17**; 727-735.
- Khan, A.A. 1971. Cytokinins: Permissive roles in seed germination. **Science**, **171**; 853-859.
- Khan, M.A. and Gulzar, S. 2003. Light, salinity and temperature effects on the seed germination of perennial grasses. **Am. J. Bot.**, **90**; 131-134.
- Kocaçalışkan, İ. 2008. *Bitki Fizyolojisi*. Nobel Yayın Dağıtım TİC. LTD. şTİ., s.316, Ankara.
- Kocataş, A. 2006. Ekoloji ve Çevre Biyolojisi. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, No:51.
- Kagan, V.E., Serbinova, E.A. and Packer, L. 1990. Generation and recycling of radicals from phenolic antioxidants. **Arch. Biochem. Biophys.**, **280**; 33-39.
- Koger, C. H., Reddy, K. N., and Poston, D. H., 2004. Factors affecting seed germination, seedling emergence and survival of texasweed (*Caperonia palustris*). **Weed Science**, **52**; 989-995.
- Konieczny, R., Libik, M., Tuleja, M., Niewiadomska, E. and Miszalski, Z. 2008. Oxidative events during *in vitro* regeneration of sunflower. **Acta Physiol. Plant.**, **30**; 71-79.
- Koorneef, M.,Bentsink, L. and Hilhorst, H. 2002. Seed dormancy and germination. **Curr. Opin. Plant Biol.**, **5**; 33-36.

- Kurt, S. 2005. *Centaurea zeybekii* Wagenitz'in Tohum Çimlenmesi Üzerine Araştırmalar. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 73s., Aydın.
- Kurt, S.ve Erdağ, B. 2009. *In vitro* germination and axillary shoot propagation of *Centaurea zeybekii*. **Biologia**, **64(1)**; 97-101.
- Lamb, C. and Dixon, R. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. **Ann Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.**, **48**; 251-275.
- Leinonen, K. and Cahantal, M. 1998. Regulation of *Picea abies* seed dormancy by red and far-red light at various moisture contents. **Scand. J. Forest Res.**, **13**; 43-49.
- Leveck, H.H. 1962. The Tetrazolium Test for Seed Viability. Mississippi State University, Mississippi.
- Litze, R.E. 1986. Effects on osmotic stress on somatic embryogenesis in *Carica* suspension culture. . **J. Am. Soc. Hort. Sci.**, **11**; 969-972.
- Lou, H. and Kako, S. 1995. Role of high sugar concentrations in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. **Scientia Hort.**, **64**; 11-20.
- Lou, H., Obara-Okeyo, P., Tamaki, M. and Kako, S. 1996. Influence of sucrose concentration on *in vitro* morphogenesis in cultured cucumber cotyledon explant. **J. Am. Soc. Hort. Sci.**, **71**; 497-502.
- Maddox, D.M., Joley, D.B., Supkoff, D.M. and Mayfield, A. 1996. Pollination biology of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*) in California. **Can. J. Bot.**, **74**; 262-267.
- Mansuroglu, S. ve Gürel, E. 2001. Mikroçogaltım. In: Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Babaoglu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (eds.), S.Ü. Vakfı Yayınları, ISBN 975-6652-04-7, s. 262-281, Konya.
- Marks, G.E. 1973. Selecting *Asparagus* plants as sources of haploids. **Euphytica** **22**; 330-316.
- Mayer, A.M. and Poljakoff-Mayer, A. 1982. The Germination of Seeds. Pergamon Press, 211p., Oxford.
- Mehanna, H.T., Martin, G.C. and Nishijima, C. 1985. Effects of temperature, chemical treatments and endogenous hormone content on peach seed germination and subsequent seedling growth. **Scientia Hort.**, **27**; 63-73.

- Menges, E.S. 1986. Predicting the future of rare plant populations: Demographic monitoring and modelling. **Natural Areas Journal**, **6**; 13-25.
- Meratan, A.A. , Ghaffari, S.M. and Niknam, V. 2009. *In vitro* organogenesis and antioxidant enzymes activity in *Acanthophyllum sordidum*. **Biol. Plant.**, **53** (1); 5-10.
- Merkle, S.A., Parrott, W.A. and Williams, E.G. 1990. Applications of Somatic Embryogenesis and Embryo Cloning, In: Plant Tissue Culture, Applications and Limitations. Bhojwani, S.S. (eds), Elsevier, pp. 67-101, Amsterdam.
- Meyer, S.E. and Monsen, S.B. 1991. Habitat correlated variation in mountain big sage brush (*Artemisia tridentata* ssp. *vaseyana*) seed germination patterns. **Ecology**, **72**; 739-742.
- Molassiotis, A.N., Dimassi, K., Diamantidis, G. and Therios, I. 2004. Changes in peroxidases and catalase activity during *in vitro* rooting. **Biol. Plant.**, **48**; 1-5.
- Monnier, M. 1990a. Zygotic embryo culture, In: Plant Tissue Culture: Applications and Limitations. Bhojwani, S.S. (eds), pp. 366-393, The Netherlands.
- Monnier, M. 1990b. Culture of zygotic embryos of higher plants, In: Plant Cell and Tissue Culture, Methods in Molecular Biology, Vol. 6. Pollard, J.W. and Walker, J.M. (eds), The Humana Press, pp. 129-139, USA.
- Monnier, M. 1990c. Induction of embryogenesis in callus culture. In: Plant Cell and Tissue Culture, Methods in Molecular Biology, Vol. 6. Pollard, J.W. and Walker, J.M. (eds), The Humana Press, pp. 141-148, USA.
- Muntz, K. 1982. Seed development. In: Nucleic Acids and Proteins in Plants. Encyclopedia of Plant Physiology New Series, vol. 14A. Parthier, B. and Boulter, D.(eds), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp.505-558, New York.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, **15**; 473-497.
- Murch, S.J., KrishnaRaj, S. and Saxena, P.K. 2000. Phytochemicals: Mass production, standardization and conservation. **Sci. Rev. Alternative Med.**, **4**; 39-43.
- Nakagawa, H., Saijyo, T., Yamauchi, N., Shigyo, M., Kako, S. and Ito, A. 2001. Effect of sugars and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. **Scientia Hort.**, **90**; 85-92.

- Nikolić, R., Mitić, N., Miletić, R. and Nešković, M. 2006. Effects of cytokinins on *in vitro* seed germination and early seedling morphogenesis in *Lotus corniculatus* L., **J. Plant Growth Regul.**, **25**; 187-194.
- Noctor, G. and Foyer, C.H. 1997. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen species under control. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, **49**; 249-279.
- Noranha, A., Andersson, L. and Milberg, P. 1997. Rate of change in dormancy level and light requirement in weed seeds during stratification. **Ann. Bot.**, **80**; 795-801.
- Ogawa, K., Iwabuchi, M. 2001. Mechanism for promoting the germination of *Zinnia elegans* seeds by hydrogen peroxide. **Plant Cell Physiol.**, **42**; 286-291.
- Özcan, S., Babaoğlu, M. ve Sancak, C. 2001. Somatik Embryogenesis. In: Bitki Biyoteknolojisi I- Doku Kültürü ve Uygulamaları Babaoğlu, M., Gürel E. ve Özcan, S. (eds). Selçuk Üniversitesi Basımevi, s.71-88. Konya, Türkiye.
- Özel, Ç.A., Khawar, K. M., Mirici, S., Özcan, S. and Arslan, O. 2006. Factors affecting *in vitro* plant regeneration of the critically endangered Mediterranean knapweed (*Centaurea tchihatcheffii* Fisch et. Mey), **Naturwissenschaften**, **93**; 511–517.
- Özer, Z., Kadioğlu, İ., Önen, H. ve Tursun, N. 1998. *Herboloji (Yabancı Ot Bilimi)*. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fak. Yay. No: 20, Tokat.
- Padilla, I.M.G. and Encina, C.L. 2002. *In vitro* germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) seeds. **Scientia Hort.**, **97**; 219-227.
- Parrott, W.A., Merkle, S.A. and Williams, E.G. 1993. Somatic embryogenesis: Potential for use in propagation and gene transfer systems. In: *Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology*, Murray, D.R. (eds). C.A.B. International, pp.158-200, UK.
- 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, In: *Plant Cell, tissue and Organ Culture Fundamental Methods*. Gamborg, O. L. and Philips, G. C. (eds), pp.45-47, Germany.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* culture of higher plants, Martinus Nijhoff Publishers, p.344. Dordrecht.

- Podstolski, A.P., Gajewska, B. and Lewak, S. 1974. Electrophoretic investigation of phenol oxidases in stratified apple seeds. **Biol. Plant.**, **16**; 163-166.
- Potikha, T.S., Collins, C.C., Johnson, D.I., Demler, D.P. and Levine, A. 1999. The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. **Plant Physiol.**, **119**; 849-858.
- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A. and Stewart, C.R. 1994. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. **Plant Cell**, **6**; 65-74.
- Price, A.H., Atherton, N.M. and Hendry, G.A.F. 1989. Plants under drought stress generate activated oxygen. **Free Radic. Res. Commun.**, **8**; 61-66.
- Raghavan, V. 1980. Embryo culture, In: Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. Vasil, I.K. (eds), Academic Press, pp. 209-236, New York.
- Rai, M.K., Akhtar, N. and Jaiswal, V.S. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. **Scientia Hort.**, **113**; 129-133.
- Rodriguez, A.A., Grunberg, K.A. and Taleisnik, E.L. 2002. Reactive oxygen species in the elongation zone of maize leaves are necessary for leaf extension. **Plant Physiol.**, **129**; 1627-1632.
- Rout, G.R., Samantaray, S. and Das, P. 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnol. Adv.**, **18**; 91-120.
- Ruffoni, B. and Massabo, F. 1991. Tissue culture in *Gerbera jamesonii* hybrida. **Acta Hort.**, **289**; 147-148.
- Rychter, A. and Lewak, S. 1971. Apple embryos peroxidases. **Phytochemistry**, **10**; 2609-2613.
- Scandalios, J.G. 1990. Response of plant antioxidant defence genes. In: Genomic Responses to Environmental Stress. Scandalios, J.G. and Wright, T. (eds), Academic, pp.1-41. New York.
- Scandalios, J.G., Guan, L. and Polidoros, A.N. 1997. Catalase in plants: gene structure, properties, regulation and expression, In: Oxidative Stress and Molecular Biology of Antioxidant Defenses. Scandalios, J.G. (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp.343-406, Cold Spring Harbor, NY.
- Schmidt, L. 2000. Dormancy and Pretreatment. Chap. 9. In: *Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed*. Danida forest seed centre, Danimarka.

- Schütz, W. 1997. Primary dormancy and annual dormancy, cycles in seeds of six temperate wetland sedges. **Aquatic Botany**, **59**; 75-85.
- Schütz, W. and Milberg, P. 1997. Seed dormancy in *Carex canescens*: regional differences and ecological consequences. **Oikos**, **78**; 420-428.
- Seçmen, Ö. 1998. Türkiye Florası (Ders Notları). Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, No:120. Bornova/İzmir.
- Sha Valli Khan, P.S., Prakash, E. and Rao, K.R. 1997. *In vitro* micropropagation of an endemic fruit tree *Syzygium alternifolium* (Wight) walp. **Plant Cell Reports**, **16**; 325-328.
- Sharma, D.R., Kavr, R. and Kumar, K. 1996. Embryo rescue in plants. **Euphytica**, **89(3)**; 325–337.
- Smith, P.G. 1944. Embryo culture of the tomato species hybrid. **Am. Soc. Hort. Sci.**, **44**; 147-215.
- Smith, R. 1992. Plant Tissue Culture Techniques and Experiments. Academic Press Inc., pp. 1-27, UK.
- Sreedhar, R.V., Venkatachalam, L., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., Narayan, M.S. and Ravishankar, G.A. 2008. Direct organogenesis from leaf explants of *Stevia rebaudiana* and cultivation in bioreactor. **Biol. Plant.**, **52 (2)**; 355-360.
- Stebbins, G.L. 1971. Adaptive radiation of reproductive characteristics of Angiosperms II. Seeds and seedlings. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, **2**; 237-260.
- Stirk, W.A., Gold, J.D. Novák, O., Strnad, M. and van Staden, J. 2005. Changes in endogenous cytokinins during germination and seedling establishment of *Tagetes minuta* L. **Plant Growth Regul.**, **47**; 1-7.
- Şehirali, S., Özgen, M., Karagöz, A., Sürek, M., Adak, S., Güvenç, İ., Tan, A., Burak, M., ve Kaymak, H.Ç. 2005. “Bitki Genetik Kaynaklarının Korunma ve Kullanımı”, [http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/6tk05/014sezensehirali.pdf], Erişim Tarihi: 22.07.2009.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc., Publishers, p.792, Sunderland.
- Takahama, U. and Yoshitama, K. 1998. Hydroxycinnamic acid esters enhance peroxidase-dependent oxidation of 3, 4-dihydroxyphenylamine. Differences in the enhancement among the esters. **J. Plant Res.**, **111**; 97–100.

- Takashi, H. and Daisuka, K. 1997. Micropropagation of *Centaurea macrocephala* Pushk. EX. Wild. by shoot axis splitting. **Hort. Sci.**, **32(6)**; 1124-1125.
- Tang, W. and Newton, R.J. 2005. Peroxidase and catalase activities are involved indirect adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) zygotic embryos. **Plant Physiol. Biochem.**, **43**; 760-769.
- Taylorson, R.B. and Hendricks, S.B. 1977. Dormancy in seeds. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, **28**; 331-354.
- Terzi, S.A. and Loschiavo, F. 1990. Somatic embryogenesis. In: Plant Tissue Culture: Applications and Limitations. Bhojwani S.S.(eds)., Elsevier, pp. 54-66, NewYork.
- Thakar, J. and Bhargava, S. 1999. Seasonal variation in antioxidant enzymes and the sprouting response of *Gmelina arborea* Roxb. nodal sectors cultured *in vitro*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, **59**; 181-187.
- Tian, M., Gu, Q. and Zhu, M. 2003. The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus. **Plant Sci.**, **165**; 701-707.
- Valdés, A.E, Ordás R.J, Fernández, B, and Centeno, M.L. 2001. Relationships between hormonal contents and organogenic response in *Pinus pinea* cotyledons. **Plant Physiol. Biochem.**, **39**; 377-384.
- Vardar, Y. 1982. Bitkilerde Büyüme ve Gelişme Fizyolojisi. Karşıyaka, İzmir.
- Vegis, A. 1964. Dormancy in higher plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, **15**; 185-224.
- Wagenitz, G. 1975. *Centaurea* L., In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Davis, P.H. (Eds), Edinburgh at the University Press., **Edinburgh.**, **5**; 465-585.
- Wagenitz, G. 1986. *Centaurea* in South-West Asia: Patterns of distribution and biodiversity. **Proc. Roy. Soc., Edinburgh**, **89B**; 11-21.
- Walbot, V., Clutter, M. and Sussex, I. 1975. Effects of abscisic acid on germinating bean axes. **Plant Physiol.**, **56**; 570-574.
- White, P. 1963. The Cultivation of Animal and Plant Cells. Ronald Press. New York.

- Wildi, E., Schaffner, W. and Büter, K.B. 1998. *In vitro* propagation of *Petasites hybridus* (Asteraceae) from leaf and petiole explants and from inflorescence buds. **Plant Cell Reports**, **18**; 336-340.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C. and Van Montagu, M. 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. **EMBO J.**, **16**; 4806-4816.
- Wise, R.R. and Naylor, A.W. 1987. Chilling-enhanced photooxidation: Evidence for the role of singlet oxygen and endogenous antioxidants. **Plant Physiol.**, **83**; 278-282.
- Yentür, S. 1982. Tohum Çimlenmesi. *Doğa Temel Bilimler*, **6**; 175-186.
- Yeung, E.C. 1981. *In vitro* fertilization and embryo culture. In: *The Plant Tissue Culture*. Thorpe, T.A.(eds), Academic press, pp. 253-271, New York.
- Yıldız, K. and Gücel, S. 2005. Kuzey Kıbrıs Endemik Bitkilerinin *Ex-situ* Korunması. 5. Uluslararası Kıbrıs Araştırmaları Kongresi Bildirileri Cilt II Kıbrıs Araştırmaları Merkezi, Doğu Akdeniz Üniversitesi, Kıbrıs. [<http://www.emu.edu.tr/daukam/ukak5c2/kemal%20yildiz%20%20salih%20>], Erişim Tarihi: 22.07.2009
- Zambre, M., Chowdhury, B., Kuo, Y.H., Van Montagu, M., Angenon, G. and Lambein, F. 2002. Profilic regeneration of fertile plants from green nodular callus induced from meristematic tissues in *Lathyrus sativus* L. (grass pea). **Plant Sci.**, **163**; 1107-1112.
- Zhou, X., Han, Y., Yang, W. and Xi, T. 1992. Somatic embryogenesis and analysis of peroxidase in cultured lettuce (*Laruca sativa* L.) cotyledons. **Ann. Bot.**, **69**; 97-100.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Yelda (ÇALMAZ) EMEK

Doğum Yeri ve Tarihi : Yeşilyurt/KIBRIS, 07.02.1978

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 1995-1999.

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2000-2003.

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan SCI & SSCI kapsamında makaleler

1. Emek Y. and Erdağ B. 2007. *In vitro* propagation of *Gladiolus anatolicus* (Boiss.) Stapf. **Pak.J. Bot.**, **39** (1); 23-30.
2. Karagözler A. A, Erdağ B., Emek Y.C and Uygun D.A. 2008. Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. **Food Chemistry**, **111**(2); 400-407.
3. Erdağ B., Emek Y. and Aktaş L.Y. 2009. *In vitro* somatic embryogenesis from cormel-derived callus cultures of *Gladiolus anatolicus*. **Propag. Ornam. Plants**, **9**(4); 176-180.

4. Erdağ B. and Emek Y. 2009. Adventitious Shoot Regeneration and *in vitro* Flowering of *Anthemis xylopoda* O. Schwarz, a Critically Endangered Turkish Endemic. **Turk. J. Biol.**, **33(4)**; 319-326.
5. Erdağ B., Emek Y and Kurt S. 2010. Clonal propagation of *Dorystoechas hastata* via axillary shoot proliferation. **Turk. J. Bot.**,(baskıda)

Uluslararası diğer hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Erdağ B., Kırmacı M., Emek Y. and Erdağ A. 2002. A note on spore production and *in vitro* spore germination capacities of *Cheilothela chloropus* (Brid.) Lindb., *Funaria convexa* Spruce and *Pleuridium acuminatum* Lindb. (Bryopsida). **Bulletin Pure App. Sci.**, **21 B (2)**; 149-153.
2. Erdağ B. and Emek Y. 2005. *In vitro* adventitious shoot regeneration of *Liquidambar orientalis* Miller. **J. Biol. Sci.**, **5(6)**; 805-808.
3. Erdağ B. and Emek Y. 2005. *In vitro* micropropagation of *Anthemis xylopoda* O. Schwarz, a critically endangered species from Turkey. **Pak. J. Biol. Sci.**, **8(5)**; 691-695.
4. Emek Y. and Erdağ B. 2007. Somatic embryogenesis from leaf explants of *Gladiolus anatolicus* (Boiss.) Stapf. **Pak. J. Biol. Sci.**, **10 (8)**; 1190-1194.

b) Bildiriler

1. Emek Y. ve Erdağ B. *Gladiolus anatolicus* (Boiss.) Stapf'un mikroçoğaltımı üzerine araştırmalar (Poster bildiri). XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi. Bildiri Özet Kitabı, sf. 82, 21-24 Haziran 2004. Adana, Türkiye
2. Erdağ B., Emek Y. ve Kurt S. *Dorystoechas hastata*'nın *in vitro* çimlenmesi ve fide gelişimi üzerine araştırmalar (Poster bildiri). XVIII Ulusal Biyoloji Kongresi, Bildiri Özet Kitabı, sf. 139-140, 26-30 Haziran 2006. Kuşadası, Aydın, Türkiye.
3. Emek Y. ve Erdağ B. Bursa Siyahı (*Ficus carica* L. cv. Bursa Siyahı) incir çeşidinin *in vitro* koşullarda NaCl stresine tepkileri (Poster Bildiri). XIX.

Ulusal Biyoloji Kongresi, Bildiri Özet Kitabı, sf. 411, 23-27 Haziran 2008. Trabzon, Türkiye.

4. Erdağ B., Emek Y. ve Kurt S. *Dorystoechas hastata* Boiss. & Heldr. Ex Bentham'nın *in vitro* elde edilmiş fide eksplantlarının kallus oluşturma potansiyellerinin araştırılması (Poster Bildiri). XIX. Ulusal Biyoloji Kongresi, Bildiri Özet Kitabı, sf. 433, 23-27 Haziran 2008. Trabzon, Türkiye.
5. Emek Y. ve Erdağ B. *Rhaponticoides mykalea*'nın Kuşadası Populasyonu Üzerine Gözlemler (Poster Bildiri). IX. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, Bildiri Özet Kitabı, sf. 366, 7-10 Ekim 2009. Nevşehir, Türkiye.

c) Katıldığı Projeler

1. *Gladiolus anaticus* (Boiss.) Stapf'un mikroçoğaltımı üzerine araştırmalar. B.A.P, FEF 02007 (araştırıcı, proje tamamlanmıştır).
2. *Dorystoechas hastata* Boiss. & Heldr. ex Bentham'ın Doku Kùltürü Teknikleri Kullanılarak Çoğaltımı. B.A.P, FEF-06014 (araştırıcı, proje tamamlanmıştır).
3. *Rhaponticoides mykalea* (Hub.-Mor.) M. V. Agab. & Greuter'nın *in vitro* koşullarda çoğaltılması ve bu süreçlere etki eden faktörlerin araştırılması. B.A.P, FEF-07012 (araştırıcı, proje tamamlanmıştır).

İLETİŐİM

E-posta Adresi : e-mail: 1) yelda@adu.edu.tr

2) yelda_ce@hotmail.com

Tarih : 05.03.2010