

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

Yeşim OKAY¹
Ayşegül Elif SAVCI²

Şebnem ELLİALTIOĞLU¹
Hanife ÖZLER³

Köksal DEMİR¹
Cevdet GÜMÜŞ⁴

Rukiye TIPIRDAMAZ²
Aslı GÜNÖZ⁵

¹Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Ankara

²Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara

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

⁴Bartın Üniversitesi Meslek Yüksekokulu, Bartın

⁵Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü, Ankara

*Sorumlu Yazar:

E-mail: cgumus42@hotmail.com

Geliş Tarihi: Nisan 25, 2014

Kabul Tarihi: Mayıs 31, 2014

Özet

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

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

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

Abstract

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

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

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

GİRİŞ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MATERYAL VE YÖNTEM

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

Tohumla Çoğaltma Çalışmaları

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

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

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

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

Doku Kültürü Çalışmaları

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

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

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

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

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

BULGULAR

Tohumla Çoğaltma Çalışmaları

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

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

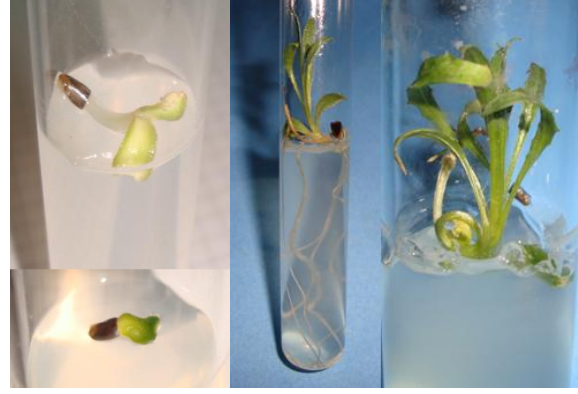
Yetiştirme ortamlarının tüm pH değerlerinde 5 ay katlanan tohumların en yüksek çimlenme oranını (% 58.89) gösterdikleri, bunu 4 ay süre ile katlanan tohumların (% 42.78) izlediği belirlenmiştir. 3 ay süre ile katlanan tohumlarda, tüm yetiştirme ortamlarındaki çimlenme oranları en düşük düzeydedir (%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

Doku Kültürü Çalışmaları

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

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

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

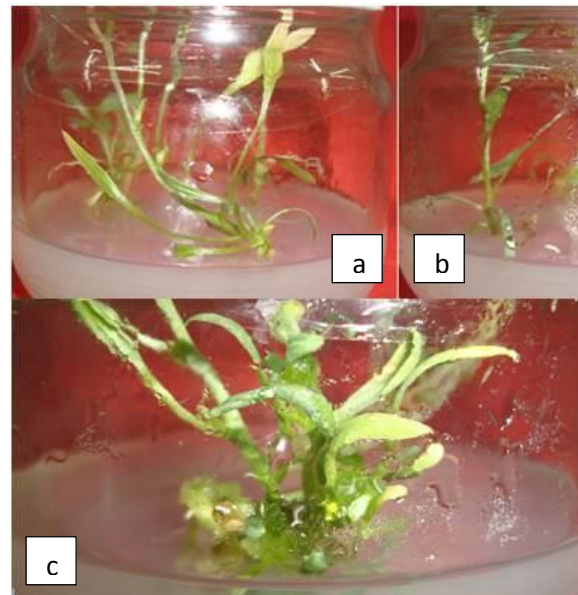


Şekil 1. 1 mg/L GA₃ içeren ortamlarda çimlenen ve gelişen sentorya bitkileri

IBA + BAP Kombinasyonları ile yapılan denemeler

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

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



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

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

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

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

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

Ekim Tarihi	Besin Ortamı	Enfeksiyon Oranı (%)	Çimlenme Oranı (%)			
			2.Hafta	4. Hafta	6.Hafta	8.Hafta
1.Ekim (27.01.2011)	MS	18.03	39.02	50.08	51.08	58.40
2. Ekim (17.04.2011)	MS	1.46	26.39	49.44	54.27	56.13
3. Ekim (07.11.2011)	MS	6.88	20.45 ^{b*}	43.18 ^b	49.43 ^b	55.11 ^b
	MS+1 mg/L GA ₃	4.81	48.88 ^a	84.27 ^a	84.27 ^a	87.64 ^a
4. Ekim (11.12.2011)	MS+1 mg/L GA ₃	7.81	25.42 ^a	49.15 ^a	69.49 ^a	86.90 ^a
	MS+2 mg/L GA ₃	3.17	11.47 ^c	34.42 ^b	67.21 ^b	81.20 ^b
	MS+3 mg/L GA ₃	1.59	19.35 ^b	33.87 ^b	64.51 ^c	76.50 ^c
5. Ekim (17.03.2012)	MS	2.77	20.00 ^b	43.50 ^b	62.86 ^d	64.30 ^d
	MS+1 mg/L GA ₃	8.33	54.54 ^a	61.10 ^a	72.86 ^b	83.60 ^a
	MS+2 mg/L GA ₃	0	44.44 ^a	67.80 ^a	84.85 ^a	85.20 ^a
	MS+3 mg/L GA ₃	8.33	24.24 ^b	42.90 ^b	75.00 ^b	77.20 ^c

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

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

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

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

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

SONUÇ VE ÖNERİLER

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KAYNAKLAR

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

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