

ENDEMİK VE TEHLİKE ALTINDAKİ *Thermopsis*
turcica (Fabaceae)'NİN *IN VITRO* ÇİMLENMESİ
VE MİKROÇOĞALTIMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Sergun DAYAN

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
OCAK 2006

“Bu tez çalışması “042.FENED.04” numaralı proje olarak A.K.Ü BAPK tarafından desteklenmiştir.”

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDEMİK VE TEHLİKE ALTINDAKİ *Thermopsis turcica*
(Fabaceae)’NİN *IN VITRO* ÇİMLENMESİ VE MİKROÇOĞALTIMI

Sergun DAYAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ

AFYON
2006

Sergun DAYAN'ın yüksek lisans tezi olarak hazırladığı “Endemik ve Tehlike Altındaki *Thermopsis turcica* (Fabaceae)'nın *in vitro* Çimlenmesi ve Mikroçoğaltımı” başlıklı bu çalışma, lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

... / ... /

Jüri Üyesi :Doç. Dr. Cevdet UĞUZ
(Başkan)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ
(Danışman)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Mustafa KARGIOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nunGün
vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu araştırmada, endemik ve tehlike altındaki *Thermopsis turcica*'nın ekolojik durumu, *in vitro* tohum çimlenmesi ve mikroçoğaltımı araştırılmıştır. Tarla açılması ve böcek istilası dolayısıyla sağlıksız tohumlara sahip olması *T. turcica*'yı tehdit eden en önemli unsurlar olarak belirlenmiştir. *T. turcica*'nın belirlenen beş popülasyonundan birisi olan Eber popülasyonundan temin edilen sağlıklı tohumlar çimlenme deneyleri ve mikroçoğaltım için kullanılmıştır. *T. turcica* tohumları MS yatağına alınmadan önce stratifikasyon ve/veya konsantre sülfürik, hidroklorik ve nitrik asit kullanarak kimyasal skrafikasyon işlemine tabi tutulmuştur. 90 dakika sülfürik asit muamelesi maksimum (%100) ve hızlı (3,6 gün) imlenme için ideal bulunmuştur. Fakat stratifikasyon ve diğer asit uygulamalarının *T. turcica* tohumlarının çimlenmesi üzerine her hangi bir etkisi olmamıştır. *In vitro* fiderden temin edilen kotiledon, epikotil ve kök eksplantları değişik konsantrasyonlarda (0.5, 1, 2, 4 ve 8 mg/L) NAA veya 2,4-D bulunduran temel MS ortamlarına transfer edilmiştir. En iyi kallus oluşumu (%100) 2mg/L NAA ve 2,4-D ortamındaki kök eksplantlarından alınmış olmasına rağmen, NAA uygulanmış eksplantlara göre 2,4-D bulunduran temel MS besi yerleri üzerindeki kalluslarda biyokütle gelişimi yarı yarıya az olarak tespit edilmiştir. Buna ek olarak, NAA uygulanmış tüm eksplant çeşitlerinin kallus oluşumu sırasında adventif kök ve fide gelişimi gözlemlenmişken, bunlar 2,4-D'de gözlemlenmemiştir. NAA içeren ortamlardan elde edilen kalluslar sitokinin içeren ortamlara alındığında sürgün oluşumları meydana gelmişken, 2,4-D içerikli ortamlarda oluşan kalluslardan hiçbirisinde rejenerasyon olmamıştır. Bu nedenle, 2,4-D, *T. turcica* kallus oluşumunu ve kallustan rejenerasyonu engellemiştir. Değişik konsantrasyonlarda (0, 0.5, 1 ve 2 mg/L) kinetin ve benzilamino prin bulunduran temel MS ortamına alınan kalluslardan en iyi sürgün oluşumu (kallus başına 4,4) 2 mg/L BA ortamında elde edilmiştir. Rejenerantlar 1 mg/L NAA içeren temel ½ MS ortamında başarıyla (%70) kklendirildikten sonra, *T. turcica* *in vitro* fidecikleri toprağa şaştırılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Thermopsis turcica*, endemik, tehlike altındaki bitki tr, *in vitro* imlenme, mikropropagasyon.

ABSTRACT

In this study, ecological status, *in vitro* seed germination and micropropagation of an endemic and endangered plant species, *Thermopsis turcica*, were investigated. It was determined that clearing new agricultural lands and holding unhealthy seeds due to insect attacks are the most threatened factors for *T. turcica*. Healthy seeds obtained from Eber population which is one of five designated populations of *T. turcica* were used for germination experiments and micropropagation. *T. turcica* seeds were treated with stratification and/or chemical scarification using concentrated sulfuric, hydrochloric and nitric acids before taken on MS beads. 90 minute sulfuric acid treatment was optimal for the maximum (%100) and fast (3,6 days) germination. However, stratification and other acid treatments were not had an effect on the germination of *T. turcica* seeds. Cotyledon, epicotyl and root explants obtained from these *in vitro* seedling were transferred on basal MS media containing various concentrations (0.5, 1, 2, 4 ve 8 mg/L) of NAA or 2,4-D. Although the best callus formation (%100) was obtained from root explants treated with both 2 mg/L NAA and 2,4-D, only the half biomass development was determined for calli on basal MS media containing 2,4-D as compared to the NAA treated explants. Furthermore, adventitious root and shoot developments were only observed during callus formation from the all kinds of explants treated with NAA, but not with 2,4-D. The shoot formation was only occurred on cytokinin media if the calli's obtained in NAA containing media. Therefore, 2,4-D inhibited *T. turcica* callus formation and regeneration from the callus. The best shoot regeneration (4,4 per callus) was gained with 2 mg/L benzyladenine (BA) after the calli's transferred onto basal MS media including various concentrations (0.5, 1 ve 2 mg/L) of benzyladenine (BA) or kinetin. After the regenerates successfully rooted (%70) with basal ½ MS containing 1 mg/L NAA, *in vitro* *T. turcica* seedlings were acclimatized to the soil.

Key Words: *Thermopsis turcica*, endemic, endangered plant species, *in vitro* germination, micropropagation.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ.....	3
3. MATERYAL ve METOT.....	16
3.1 Bitki Materyali ve Arazi Çalışması.....	16
3.2 Metot.....	18
3.2.1 Kültür Besi Yerlerinin Hazırlanması ve Sterilizasyonu.....	18
3.2.2 Denemelerde Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu.....	18
3.2.3 Çalışma Ortamının Sterilizasyonu.....	19
3.2.4 İklimlendirme Koşulları.....	19
3.2.5 <i>İn vitro</i> Çimlendirme.....	19
3.2.6 Kallus Başlatımı.....	20
3.2.7 Kallustan Rejenerasyon.....	21
3.2.8: Köklendirme.....	22
3.2.9 Dış Ortama Şaşırtma.....	22
3.2.10 Verilerin İstatistiksel Analizleri.....	23
4. BULGULAR.....	24
4.1 Arazi Çalışması Bulguları.....	24
4.2 Çimlenme Bulguları.....	26
4.3 Mikroçoğaltım Bulguları.....	29
4.3.1 Kallus Başlatımı ve Oluşumu	29
4.3.2 Kallustan Rejenerasyon.....	34
4.3.3 Köklendirme Denemesi	36
4.3.4 Dış Ortama Şaşırtma.....	38
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	40
KAYNAKLAR.....	52
TEŞEKKÜR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

örn.	Örnek
m	Metre
ml	Mililitre
mg/ml	Miligram/Mililitre
N	Normal
°C	Santigrat Derece
g/L	Gram/Litre
L	Litre
atm	Atmosfer
cm	Santimetre
mm	Milimetre
km ²	Kilometre kare
%	Yüzde
g	Gram

Kısaltmalar

vb	Ve benzeri
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
GA ₃	Giberellik Asit
2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetik Asit
IBA	İndol-3-bütirik Asit
NAA	Naftalen Asetik Asit
BA	6-benzilaminopürin
K	Kinetin
MS	Murashige&Skoog
dk	Dakika
sa	Saat
sn	Saniye
PVP	Polivinilpirolidon
SPSS 10	İstatistiksel değerlendirme için bilgisayar programı
ANOVA	Varyans Analizi
CR	Critically Endangered
EN	Endangered
VU	Vulnerable
LR	Lower Risk
IUCN	The International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>		<u>Sayfa</u>
3.1	<i>Thermopsis turcica</i> 'nın doğal yayılış alanındaki görünümü.....	16
3.2	<i>T. turcica</i> 'nın yayılış alanında belirlenen populasyonlar.....	17
3.3	<i>in vitro</i> fidelerden eksplant alım yerleri ve eksplantların kallus başlatımı için petrilere yerleşimi.....	21
3.4	Rejenerasyon için kallusların BA ve K içeren MS ortamına alınması.....	22
4.1	Sürülmüş bahçelerde rizomları ile çoğalmış olan <i>T. turcica</i> fideleri.....	25
4.2	<i>T. turcica</i> meyve ve tohumları.....	25
4.3	90 dk sülfürik asit muamelesine tabi tutulan <i>T. turcica</i> tohumlarından çimlenen fideler.....	27
4.4	120 dk sülfürik asit muamelesinde hasarlı <i>T. turcica</i> fideleri.....	29
4.5	2 mg/L NAA içeren MS besi yerindeki kallus uyarımı ve oluşumu.....	30
4.6	NAA bulunan MS ortamlarında adventif kök oluşumları.....	33
4.7	2 mg/L BA içeren MS ortamındaki kalluslardan rejenere olan sürgünler.	35
4.8	Kök oluşumu gözlenmemiş <i>T. turcica</i> fideleri.....	37
4.9	Köklenmiş <i>T. turcica</i> fidelerinin alttan görünümü.....	37
4.10	Altıncı hafta sonunda köklenmiş tam bir <i>T. turcica</i> fidesi.....	38
4.11	Toprağa şaşırtılmış <i>T. turcica</i> bitkisi.....	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>		<u>Sayfa</u>
4.1	<i>T. turcica</i> 'nın yayılış alanında belirlenen popülasyonlar.....	24
4.2	Stratifikasyon ve asit skarifikasyonun <i>T. turcica</i> tohumlarının <i>in vitro</i> çimlenmesi üzerine etkisi.....	27
4.3	Stratifikasyon ve asit skarifikasyonu uygulamalarının <i>T. turcica</i> tohumları ortalama çimlenme zamanı üzerine etkisi.....	28
4.4	Farklı konsantrasyonlarda NAA ve 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisi içeren temel MS besi yerlerinin, kotiledon, epikotil ve kök eksplantlarından kallus oluşumuna etkileri.....	31
4.5	Kallus oluşumu için NAA ortamına alınan eksplantların adventif kök oluşturma yüzdeleri.....	32
4.6	Kallus oluşumu için NAA ortamına alınan eksplantların adventif sürgün oluşturma yüzdeleri.....	33
4.7	BA ve Kinetinin farklı konsantrasyonlarının NAA kökenli kalluslardan rejenerasyonun üzerine etkisi.....	35
4.8	Köklenme ortamına alınmış fidelerden 6 hafta sonunda elde edilen bulgular.....	37

1. GİRİŞ:

Beslenme, çevresel koşullardan korunmak için barınma ve giyinme, hastalıkların üstesinden gelmek için tıp, avlanma ve günlük ihtiyaçları karşılama amaçlı yapılan araç, gereç, vs, insanoğlunun temel ihtiyaçları içinde bulunan ana olgulardır. Bu ve bunun gibi sayabileceğimiz birçok konudaki başka bir ortak özellik ise bitkilerin başrolde olması ve insanlar için vazgeçilmez bir unsur haline gelmiş olmasıdır.

İnsan için olan yararlarından daha da fazla olarak bitkiler, su ve güneş enerjisi yardımı ile organik madde sentezleyebilme kabiliyetleri sayesinde besin piramidinin tabanını teşkil eder ve havadaki karbondioksidi soğurup aerobik canlılar için vazgeçilmez olan oksijen molekülünü oluşturur.

Sentezledikleri primer ve sekonder metabolitler sayesinde sadece besin kaynağı olarak değil, aynı zamanda kimya sanayinde, lif teknolojisinde ve ilaç sanayinde önemli hammaddeler olarak da kullanılırlar.

Dünya üzerinde yayılmış olan bitkilerin insanlar için bu denli önemli olması ve tüketimlerinin günden güne artması ise başka bir sorun doğurmuş ve bu bitkilerin birçoğunu yok olma sınırına getirmiştir. Bu riskin ortaya çıkmasında biz insanların tüketim haricinde daha büyük bir etkisi vardır. Bu etkiyi, dünya üzerindeki baskın tür olarak tüm doğal yaşam alanlarını istila etmemiz olarak adlandırmamız çok da haksızlık olmaz diye düşünebiliriz.

Yukarıda bahsettiğimiz gibi birçok yararları olan bitkilerin korunması ve dünya sahnesindeki yerlerinin sağlamlaştırılması, özellikle biyoloji bilimiyle uğraşan bilim insanları için vazgeçilemez bir olgudur. Gen teknolojisindeki hızlı ilerlemeler ve rekombinant DNA uygulamaları göz önüne alındığında dünya hazinesi olarak değerlendirmemiz gereken bitki gen kaynaklarının korunması gelecek kuşaklara bırakabileceğimiz en önemli miras olacaktır.

Türkiye bitki türü açısından zengin bir ülkedir. Bunun yanında bu türlerin yaşam alanlarının başta insani etkilerce tehdit edilmesinden dolayı yok olma tehlikesi ile karşı karşıya olan tür sayısı da oldukça fazladır.

Bu bitkilerin korunmaları için uzun yıllardır uygulana gelen klasik koruma metotlarının yeterliliği tartışmalı olup bunların laboratuvar uygulamaları ve yeni teknolojiler ile desteklenmesi sürecine 70'li yıllarda başlanmıştır. Bitki biyoteknolojisindeki hızlı gelişmeler bu teknikleri destekler yönde önemli açılımlar sağlamış ve sağlamaya devam etmektedir.

Bu çalışmada da Afyonkarahisar bölgesinde yaşayan ve nesli tükenme tehlikesi ile karşı karşıya olan endemik bitki türü *Thermopsis turcica*'nın korunması için mevcut uygulamalara alternatif bir koruma yöntemi olarak *in vitro* teknikler üzerine çalışılmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ:

Bugün yeryüzünde 270 000'in üzerinde bitki türü olduğu düşünülmemekte ve bu bitkilerin yaklaşık 34 000'inin tehlike altında olduğu varsayılmaktadır (Benson 1999). Avrupa kıtasındaki tür sayısının 12 000 civarında olduğu ve bunların 2750 tanesinin endemik olduğu bildirilmektedir (Ekim vd. 2000).

Türkiye, coğrafik konum itibariyle Asya ve Avrupa arasında bir köprü konumundadır. Çeşitli iklimsel faktörlerin etkisi, topoğrafik ve jeolojik yapısı, çok değişik toprak tiplerinin bulunması ülkemizin çok zengin bir floraya sahip olmasına neden olmuştur. Türkiye İran-Turan, Akdeniz ve Avrupa-Sibirya gibi üç ayrı fitocoğrafik bölgenin kesiştiği bir yerde bulunmaktadır. Anadolu'ya doğudan İran-Turan, güneyden Akdeniz ve kuzeyden Avrupa-Sibirya elementleri sokularak popülasyonlar oluşturmaları bu zenginliğin başlıca nedenleridir. Türkiye ayrıca çeşitli ekolojik etmenler, makro ve mikroklimalar nedeniyle çok sayıda cinsin gen merkezi durumundadır ve endemik taksonlar bakımından oldukça zengin bir ülkedir (Davis 1982).

Yapılan son kayıtlarla birlikte Türkiye'de 9 222 adet bitki türü olduğu tespit edilmiştir. Alt türleri ve varyeteleri de dahil ettiğimizde toplam 11 014 takson bulunmaktadır. Bu taksonların 10 754'ü yerli, 101'i yabancı ve 159'u kültür bitkisidir. Bu taksonlardan 3 708 tanesi endemik taksondur ve endemizm oranı % 34.5 olarak belirtilmiştir (Güner vd. 2000).

Bu yüksek endemizm ülkemizi önemli bir gen kaynağı haline getirmektedir. Endemik bitkiler ekstrem şartlara bağlı olarak belirli bölgelere uyum sağlamış ve bunun dışında başka yerde bulunmayan bitki türleri olarak tanımlanabilir. Dolayısı ile canlılıklarını sürdürebildikleri bu sınırlı şartlardaki değişimlere oldukça hassastırlar ve bu sebeple Türkiye'nin sahip olduğu bu yüksek endemizm oranı aynı zamanda bu türlerin yaşamlarının devamı için yüksek riski beraberinde getirmektedir. Aslında her endemik bitki türünün yok olma tehlikesinin

olmamasına karşın, daha dar alanlarda sıkışmış ve birey sayıları oldukça azalmış olan endemik türler tehlike altında olabilmektedir.

Ekim vd.'ne (2000) göre Türkiye'de yüksek risk altındaki bitki gruplarına ait (CR-critically endangered-, EN- endangered-, VU-vulnerable-) 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 takson mevcuttur. Bu yüksek endemizm rakamları ülkemizin biyolojik zenginliğinin nasıl bir tehdit altında olduğunu ve korunması gerekliliğini gözler önüne sermektedir.

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 vd. 2005).

IUCN (The International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources) tehlike kategorilerine göre CR kategorisindeki bitkilerin genel tehlike kriterleri ise kısaca habitat özelliğinin değişimi, türün kaplama derecesinin azalması, aktüel ve potansiyel bir toplama tehdidi altında olması, tohum bağlamama, kirlilik, başka bir takson tarafından istila, rekabetçilerin ve parazitlerin etkisi şeklinde sıralanabilir. Bu sebeplerden dolayı popülasyonda 10 yıl içinde % 80 azalma olacağı düşünülen türler bu kategoride değerlendirilmektedir (Ekim vd. 2000).

Dünyamızı güneş sisteminde eşsiz yapan, genetik kaynaklardır. Genetik kaynaklar, canlıların gelişimini yönlendiren genleri içermektedir. Bu genlerin farklı kombinasyonları geçmişte ve günümüzde yapılmış, gelecekte yapılacak bitki ıslahı çalışmaları için son derece önemli olan genetik çeşitliliğin oluşumunu

sağlamaktadır. Bu sebepten dolayı, bu çok değerli gen kaynaklarının gelecek için korunması son derece önemlidir (Şehirli vd. 2005).

Temelde her biri değişik tekniklerin bir araya gelmesiyle oluşan iki temel bitki koruma sistemi vardır. Bu iki uygulama *in situ* ve *ex situ* koruma olarak belirtilmektedir.

Tehlike altındaki bitkileri korumak için, bu bitkilerin doğal yayılış alanları içerisinde korumaya alınması ve koruma alanları oluşturulması *in situ* koruma çalışmaları olarak bilinmektedir (Ekim vd. 2000). Bu bağlamda Tan vd. (2003) “Tehlike Altındaki Türlerin Ekosistemlerinde Muhafazası ve Yönetimi Projesi” adı altında bir çalışma gerçekleştirmiş, Tuz Gölü, Toroslar, Burdur ve Konya bölgelerindeki tehlike altındaki türlerin bulunduğu, aynı zamanda araştırmamızın hedef türü olan *Thermopsis turcica*’nın habitatını da içeren 15 önemli bitki alanı tespit edilmiştir. Bu çalışmada hedef türlerin yayılış alanları ve bu türlerle birlikte aynı ekosistemde yaşayan bitki türleri saptanmıştır.

Tohum bankalarının oluşturulması, türlere ait genetik dağılımların tespiti, tohumların çimlenme prosedürlerinin belirlenmesi, tohumdan çoğaltımın yapılması ve bitki doku kültürü tekniklerini kullanarak hem mikroçoğaltımın yapılması hem de sürekli kültürlerin oluşturulması *ex situ* koruma çalışmalarına örnek olarak verilebilir.

Tohumdan çoğaltım çalışmalarına örnek olarak, Kaye ve Kuykendall (2001 a) nadir beş bitkinin (*Lupinus sulphureus* ssp. *kincaidii*, *Erigeron decumbens*, *Lomatium bradshawii*, *Horkelia congesta* ve *Aster curtus*) çimlendirme prosedürlerinin belirlenmesi ve bu bitkilerin sera şartlarında çoğaltılması ile ilgili çalışmışlardır. Başarılı fide eldesi sağlanan (%50-100) bu çalışma sonucunda bu tekniğin kullanımıyla bitkilerin doğal habitatlarının onarımının sağlanabileceği, uygun başka habitatlara ekimlerinin yapılabileceği veya sera şartlarında üretiminin yapılabileceği rapor edilmiştir.

Bir başka tohumdan çoğaltma çalışmasında, Cerabolini vd. (2004) tehlike altındaki *Physoplexis comosa* ve *Primula glaucescens* adlı iki tür için steril ve steril olmayan ortamlarda çimlendirme deneyleri yapmış, iki tür için % 90 ve üzerinde çimlenme oranları elde etmişlerdir. *Primula glaucescens* her iki ortamda da çimlenmişken, *Physoplexis comosa* bazı yapay gereksinimlere (bitki hormonları ve zengin besi ortamları) ihtiyaç duyarak sadece steril ortamda çimlenme göstermiştir. Bu araştırma sonuçları nadir veya tehlike altındaki bitkilerin korunmasında tohumdan çoğaltma yapılmasının önemli bir yöntem olduğuna işaret etmektedir.

Yukarıdaki çalışmalardan da anlaşılacağı üzere tohumdan çoğaltım yapabilmenin en önemli aşaması verimli bir çimlenme prosedürünün elde edilmesidir. Ayrıca türe ait tohumların çimlenme özelliklerinin araştırılması ile yabancı bitkilerin üreme problemleri olup olmadığı da belirlenebilmektedir. Çünkü, yabancı bitkilerin tohumları herhangi bir ön muamele gerekmeksizin çimlenebildiği gibi bazı tohum çimlenmesini kısıtlayıcı faktörlerden dolayı tohum çimlenme problemleri olabilmektedir.

Çimlenme genellikle su alımı (imbibisyon=şişme) ile başlayan ve radikulanın tohum kabuğundan uzaması veya çıkması ile sonlanan olaylar dizisi olarak tanımlanır. Çok basitleştirilmiş şekliyle çimlenme sırasında dört aşama mevcuttur; (i) suyun embriyo içine girip proteinlerle diğer kolloidleri hidrate ettiği aşama yani hidrasyon veya imbibisyon, (ii) metabolik aktiviteyi arttırmayı sağlayan enzimlerin yapımı veya aktivasyonu, (iii) radikulanın tohum kabuğundan çıkmasıyla devam eden radikula hücrelerindeki uzama ve (iv) fide büyümesi (Salisbury ve Ross 1992).

Fakat bazı durumlarda tohum canlılığını sürdürse de birçok sebepten ötürü çimlenememektedir. *Hareketsizlik*, sadece uygun dışsal koşulların (örn. çok kuru veya soğuk durumlarda) olmamasından dolayı tohumun çimlenmediği, *dormansi* ise dışsal koşullar (örn. nem, ısı ve atmosfer) uygun da olsa içsel koşullardan dolayı tohumun çimlenmeyi başaramadığı durumdur (Salisbury ve Ross 1992).

Tohumlara çimlenme öncesi uygulanan soğuk muamelesinin (*stratifikasyon*) içsel dormansinin ortadan kaldırılmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir (Rehman ve Park 2000). Bu engelleyici etkilerden bir tanesi de embriyoyu çevreleyen tabakalardır (örn. endosperm, tohum kabuğu, meyve kabuğu). Bu tabakalar, su ve/veya oksijen alımını engelleyebilmekte ve mekanik bariyer etkisi ile radikulanın çıkışına engel olabilmektedir. Bu tip sert tohum kabukları *Fabaceae* familyasının üyeleri arasında oldukça yaygındır. Tohum kabuğunu kırmak, inceltmek veya eritmek, yani kısaca onun engelleyici bariyer etkisini ortadan kaldırmak ise *skarifikasyon* olarak adlandırılmaktadır. Bu işlemi mekanik olarak yapmak için bıçaklar, törpüler veya zımpara kağıtları kullanılabilir. Ayrıca konsantre asitler (örn. sülfürik, nitrik ve hidroklorik asit) kullanılarak da skarifikasyon işleminin kimyasal olarak yapılması mümkündür.

Kaye ve Kuykendall (2001 b) sert tohum kabuğu bulunan *Lupinus sulphureus* ssp. *kincaidii*'nin iki ayrı popülasyonundan alınan tohumlarda çimlenmenin arttırılması için mekanik skarifikasyonun etkilerini araştırmıştır. Hiçbir muamele yapılmamış tohumlardaki çimlenme oranları popülasyonlara göre %2 ve %9 iken zımpara kağıdı ile skarifiye edilmiş tohumlardaki çimlenme oranları yine popülasyonlara göre sırasıyla %18 ve %45 olarak bulunmuştur.

Sy vd. (2001) *Fabaceae* üyeleri üzerinde yaptıkları çalışmada tohumların konsantre sülfürik asit ile ön muamelesinin tohum kabuğunun su geçirmezliğini ortadan kaldırdığını ve yüksek oranda çimlenmeye neden olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan bir başka çalışmada, sert ve suya geçirgen olmayan bir tohum kabuğu ve embriyo dormansisine sahip olan *Koelreuteria paniculata* ağacının doğal çimlenmesinin neredeyse imkansız hale gelmesi sonucunda Kore'de neslinin tehlike altında olduğu rapor edilmiştir (Rehman ve Park 2000). Bu sorunu ortadan kaldırmak için yapılan denemede skarifiye tohumlarla karşılaştırıldığında skarifiye olmamış tohumlarda hiçbir denemede çimlenme gözlenmemiştir. Dıştan

GA₃ (giberellik asit) uygulaması ile çimlenme yaklaşık % 15, distile suda ön soğutma ile yaklaşık %45 ve GA₃ içinde ön soğutma ile de yaklaşık % 60 civarına çıkarılabilmektedir.

Tetsuya ve Takahashi (2003) *Fabaceae* ailesinin bir üyesi olan *Thermopsis lupinoides* üzerinde yaptıkları çalışmada tohumların sert tohum kabuğuna ve dolayısı ile fiziksel dormansiye sahip olduğunu ve bu dormansinin kırılmasında konsantre sülfürik asit muamelesinin yüksek çimlenme oranına sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Doğal yaşamda bu işlem, mikrobiyal aktivite, tohumların kuşların veya diğer hayvanların sindirim sisteminden geçmesi, tohumların su vasıtasıyla kum veya taşlar arasında sürüklenmesi sonucu olan aşınma veya değişik sıcaklıklara maruz kalma sonucu kabukta oluşabilecek çatlamlar ile gerçekleşmektedir (Salisbury ve Ross 1992).

Maksimum genetik çeşitliliği sürdürmek için tohumdan yapılan çoğaltım yöntemlerinin tercih edilmesine rağmen, az tohum üreten ve çimlenmesi zor olan ya da sera şartlarında çimlenme sonrası fide gelişimini devam ettiremeyen tehlike altındaki türlerin *ex situ* korunması söz konusu olduğu durumlarda bitki doku kültürü teknikleri de kullanılmaktadır (Benson 1999).

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besi ortamında, bütün bir bitki, hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesidir. Bu doğrultuda bitki kısımları (eksplant) sterilizasyon işlemine tabi tutulduktan sonra yapay besi ortamlarına alınmaktadır ve sıcaklık, ışık ve nem kontrollü odacıklarda kültüre edilmektedir (Babaoğlu vd. 2002).

1902 yılında ilk izole hücre kültürlerinin elde edilmesiyle başlayan bu süreç özellikle son kırk yılda müthiş bir şekilde gelişmiş ve türler arası melezlemeler sonrası embriyo kültürü, haploid bitki üretimi, *in vitro* seleksiyon, *in vitro* döllenme, *in vitro* germplazm muhafazası, protoplast füzyonu, hastaliksız bitki

elde edilmesi, mikroçoğaltım, somatik embriyogenesis, sentetik tohum üretimi ve sekonder metabolit üretimi gibi tekniklerde geniş açılımlar sunmuştur.

Bir bitkiden alınan ve totipotent özelliği bulunan kısımlardan (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre veya polen) yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullarda yeni bitkilerin elde edilmesine mikroçoğaltım denir (Babaoğlu vd. 2002).

Mikroçoğaltım tekniği, kullanılan eksplantın özelliğine göre adlandırılır. Çoğunlukla kullanılan teknikler ise: tek boğum yöntemi, aksiler dallanma, adventif sürgün ya da tomurcukların rejenerasyonu, kallus, hücre ve protoplastlardan bitki rejenerasyonudur.

Başarılı bir mikroçoğaltımın beş aşaması bulunmaktadır. Bunlar; (i) hazırlık aşaması, (ii) kültür başlangıç aşaması, (iii) sürgün çoğaltım aşaması, (iv) sürgün gelişimi ve köklendirme aşaması ile (v) dış ortama alıştırma (aklimatizasyon) aşamasıdır.

Hazırlık aşamasında hedef bitkinin iyi araştırılması, yaşının ve büyüme döneminin iyi tespit edilmesi gerekmektedir. Debergh ve Read (1993) genç ve aktif büyüme dönemindeki bitkilerden elde edilen eksplantların rejenerasyon kapasitelerinin daha iyi olduğunu bildirmiştir.

Kültür başlangıç aşamasında ise eksplantın seçimi, sterilizasyon, başlangıç ortamları ve çevresel faktörlerin iyi belirlenmesi ve uygulanması gerekmektedir. Mikroçoğaltımda çoğunlukla apikal ve aksillar tomurcukların kullanılmasının yanında kök, sürgün ucu, çiçek sapı, yaprak ve gövde eksplantları da kullanılmaktadır. Eksplantlar, doğadaki bitkilerden alındığı gibi *in vitro* şartlarda çimlendirilmiş fidelerden de alınabilmektedir. *In vitro* çimlenmiş fidelerin kullanımı hem daha verimli hem daha pratik olmaktadır, çünkü steril ortamlarında yetiştirildiklerinden dolayı kontaminasyon riski aza indirilmiş ve sterilizasyon işleminin zararlı etkisinden kaçınılmış olur. Ayrıca genç fide hücrelerinin

bölünme yetenekleri olgun bitkilere göre daha fazladır (Kocaçalışkan 2002). *Thymus sipyaleus*'un doğadan toplanan yaprak ve yaprak sapları kallus oluşumu için eksplant olarak kullanılmış ancak başarılı olunamamıştır. Aynı bitkinin *in vitro* çimlenmiş fideleri eksplant olarak kullanıldığında % 100 verimle kallus vermişlerdir (Erdağ ve Yürekli 2000).

Dış ortamlardan alınan bitkilere önce sterilizasyon işlemi uygulanmalıdır. Bazı deterjanlar (örn. Tween-80), etil alkol, sodyum hipoklorit gibi kimyasallar ve son aşamada da steril distile su sterilizasyon için başarıyla kullanılan bileşenlerdir. Bu işlemden sonra, kültüre başlanılacak ortamın besin maddeleri ve diğer bileşenleri iyice ayarlanmalıdır. Bu elementler, inorganik maddeler (makro ve mikro besin elementleri), organik maddeler (myo-inositol, tiamin-HCl, adenin sülfat, nikotinik asit vb.), bitki büyüme düzenleyicileri (sitokinin, oksin, vb.) ve diğer (şeker, katılaştırıcı ajan) maddelerdir (Kocaçalışkan 2002).

Bu aşamada kullanılacak bitki büyüme düzenleyicisi (hormon) tipi ve miktarı da önemlidir. Hormon tipleri ve miktarları eksplanttan istenilen cevaba göre belirlenmelidir. Sitokininin yüksek oranda bulunması sürgün oluşumunu, oksinin yüksek oranda bulunması kallus ve kök oluşumunu, ikisinin dengede bulunması ise yine kallus oluşumunu uyarmaktadır. Bu aşamada son olarak kültür ortam (örn. ışık, sıcaklık ve nem) şartlarını iyi belirlemek gerekmektedir (Babaoğlu vd. 2002).

Mikroçoğaltımdaki üçüncü aşama olan sürgün çoğaltma aşamasında ise bir önceki ortamda elde edilmiş olan sürgün ve/veya kallus kültürleri birbirinden ayrılarak ya da kalluslar birkaç parçaya ayrılarak çok sayıda sürgün kültürü elde edilir. Kalluslar birkaç parçaya bölünerek yeterli miktarda çoğaltıldıktan sonra sürgün çoğaltımını uyaran sitokininlerin bulunduğu ortamlara alınarak sürgün oluşumları uyarılabilir (Reinert ve Yeoman 1982, Babaoğlu vd. 2002).

Dördüncü aşamada tam bir bitki elde etmek için sürgünlerin geliştirilmesi ve köklenmenin sağlanması gerekmektedir. Bunun için ilk olarak yüksek sitokin

ortamlarındaki sürgünler sitokinin bulunmayan hormonsuz veya oksin içeren ortamlara alınmalıdır. Çünkü sitokinin varlığı köklenmeyi inhibe eder. Oksin varlığında ise köklenme teşvik edilmektedir. Köklenme aşaması hem *in vitro* ortamda hem de *in vivo* ortamda yapılabilmektedir.

Son olarak köklendirilmiş tam bitkicikler steril olmayan, daha yüksek ışık şiddeti bulunan, düzensiz ısı değişimi ve nem oranlarının mevcut olduğu dış ortama alıştırılmalıdır. Bu dikkat isteyen bir iştir ve aşamalı olarak yapılması gerekmektedir. İlk olarak kültür odalarındaki kültür kaplarının kapakları açılarak işe başlanabilir. Bu bir haftalık gibi süre sırasında oluşacak kontaminasyon risk taşımamaktadır. Ancak bu aşamada bitkinin su kaybını önlemek amacı ile ortamın nemi oldukça yüksek tutulmalıdır (% 90-100). Köklerdeki besi yerinin iyice temizlenmesinin ardından bitki toprağa aktarılabilir. Ancak bu aşamada yine nem yüksek oranda tutulmalı ve 15 günlük bir süre içinde 2-3 günde bir kademeli olarak indirilmelidir (Babaoğlu vd. 2002).

Yukarıda bahsetmiş olduğumuz bu teknik ile hem dünya çapında hem de ülkemizde birçok tehlike altındaki bitkinin çoğaltma prosedürü geliştirilmiş ve uygulama alanı bulmuştur. Bu çalışmalara aşağıda birkaç örnek verilmiştir.

Normah et al. (1997) güney –batı Asya’da yaşayan ve tehlike altında olan *Citrus halimi* türü ile yaptıkları çalışmada mikroçoğaltım tekniği ile eksplant başına ortalama 9,6 sürgün elde etmiş ve bu sürgünleri başarı ile köklendirerek % 83 gibi yüksek bir oranla dış ortama alıştırmışlardır.

Bir diğer çalışmada, ekonomik özelliğinden dolayı tüketilmesi nedeni ile tehlike altında olan ve klasik çoğaltma metotları ile çoğaltılmasının zor oluşundan dolayı *in vitro* çoğaltma yöntemine başvuru olan *Syzygium travancoricum* türünün tek tomurcuğundan 25 sürgün elde edilmiş, bu sürgünler başarılı bir şekilde köklendirilmiş ve % 40 oranında bir başarı ile dış ortama alıştırılmıştır (Anand et al. 1999).

Sophora toromiro, doğada yok olmuş ve çeşitli botanik bahçelerinde yaşayan *Fabaceae* ailesine ait bir türdür. Bu bahçelerdeki tohumlarından elde edilen steril fideler kullanılarak bitkinin mikroçoğaltımı başarıyla gerçekleştirilmiştir (Jordan 2001).

Aloe vera L. var. *chinensis* Güney Çin'de yaşayan ekonomik bir bitkidir ve yoğun toplama nedeniyle sayısı oldukça azalmıştır. Liao et al. (2004) yaptıkları çalışma ile bu bitkinin tek tomurcuğundan 4 haftada ortalama 15 sürgün elde etmişlerdir. Dolayısı ile bu teknik ile uygun koşullarda teorik olarak bir yılda 15^{13} bitkinin elde edilebileceğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca elde edilen genç bitkilerin %93 gibi yüksek bir oranda dış ortama alıştırıldığı rapor edilmiştir.

Bu çalışmaların yanında ülkemizde de bazı ekonomik ve tehlike altındaki türlerin *in vitro* çoğaltımı gerçekleştirilmiştir. Baba (1995), Türkiye endemiği olan ve ekonomik öneme sahip olan beş bitkinin (*Astragalus tmoleus* var. *tmoleus*, *Digitalis cariensis*, *Sideritis sipylea*, *Stachys tmolea* ve *Thymus sipyleus*) doku kültürü yöntemleri ile çoğaltımını ve bu bitkilerin dış ortama alıştırılma aşamasını başarı ile gerçekleştirdiğini rapor etmiştir.

Özel (2002), endemik ve tehlike altında olan *Centaurea tchihatceffii*'nin mikroçoğaltımı üzerine çalışmalar yapmıştır ve başarılı sonuçlar almıştır. Yine başka bir Türkiye endemiği olan *Gladiolus anatolicus*'un doku kültürü yöntemleri ile çoğaltımı üzerine araştırmalar yapılmış ve bu bitkinin hızlı çoğaltımı için bir prosedür belirlenmiştir (Çalmaz 2003).

Tehlike altındaki bir başka tür olan *Muscari muscarimi*'nin olgunlaşmamış embriyoları kullanılarak hızlı soğancık üretim prosedürü geliştirilmiştir (Parmaksız vd. 2005). Ayrıca *Fabaceae* ailesinin bir üyesi olan lokal endemik ve gelecekte yok olma riski taşıyan (CR) *Astragalus duranii*'nin *in vitro* hızlı çoğaltım prosedürü başarıyla gerçekleştirilmiştir (Çöçü vd. 2005).

Endemik bitkiler ve korunmaları yönünde yapılmış olan çalışmalara genel bir bakış yaptıktan sonra bu çalışmanın hedef bitkisi olan *Thermopsis turcica* ile ilgili yapılmış çalışmalara göz atacak olursak, yeterli miktarda araştırma olmadığını görürüz.

T. turcica ilk defa 1983 yılında keşfedilmiş ve bilim dünyasına tanıtılmıştır (Kit Tan vd. 1983). Davis vd.'ne (1988) göre *T. turcica*'nın yayılış alanı Akşehir Gölü'nün batısı Gölçayır (Yasıyan) mevkiidir. Dolayısı ile 2000 yılında basılan Türkiye bitkileri kırmızı kitabına göre (Ekim vd. 2000) Konya endemiği olarak görünmektedir. Ancak 2003 yılında yapılan bir çalışmada Tan vd.'lerinin (2003) yayılış alanı olarak gösterdikleri bölgeler ise Eber Gölü'nün güneyi ve Akşehir Gölü'nün güneyi ve batısı yani Afyonkarahisar il sınırları içerisidir.

Thermopsis genusuna ait türlerin büyük bir çoğunluğu genelde Orta Asya ve Amerika Birleşik Devletinin Doğu kısmında ve genelde dağlık alanlarda yayılış göstermektedir. Türkiye'de bu genus sadece *T. turcica* türü ile temsil edilmektedir ve bu tür Türkiye endemiği olarak kayıtlara geçmiştir. *T. turcica* uzun rizomlu çok yıllık otsu bir bitki olup, bitki boyu 35-85 cm arasında değişmektedir ve altın sarısı petallerinden dolayı yöre halkı tarafından "altın otu" veya "piyan" olarak bilinmektedir. Her ne kadar kendisine en yakın tür olan *Thermopsis alpina* ile benzerlik gösterse de, doğal olarak sulak ve düz alanda (970-980 m) yetişmesi, bitki karpel sayısının 3 adet olması, 10 adet stameninin serbest olması *T. turcica*'nın en belirgin ayırt edici özellikleridir (Davis vd. 1988). Mor renkli tohumlarının ise karpel içerisinde 2-3 tane olduğu bildirilmiştir (Sinan 2002).

Thermopsis genusu zengin bir lupin alkaloid kaynağıdır (Ohmiya et al. 1974, 1984, Saito et al. 1988). Bazı türleri tıbbi bitki olarak kullanılmakta iken (Saito et al. 1989) yapılan çalışmalarda bu genusun diğer üyelerinin tohumlarının çocuklar tarafından yenmesi sonucu bulantı, kusma ve baş ağrısı gibi belirtilerle ortaya çıkan zehirlenmelere de sebep olduğu ortaya konmuştur (Şener vd. 1992). Bu genusun üyelerinden biri olan *Thermopsis montana*'da bulunan anagirin, termopsin, 5,6-dehidrolupanın, sitisin ve N- metilsitizin alkaloidlerinin, sıgırlarda

bitkinin yenmesi sonucu ortaya çıkan miyopatiden sorumlu olabileceği öne sürülmüştür (Keller ve Baker 1990).

1991 yılında yayınlanan bir çalışmada *T. turcica* bitkisinde alkaloid, flavanoid, kumarin, radyoaktif glikozit ve steroidal bileşiklerin varlığı tespit edilmiştir. Bu bitkinin meyvelerindeki total alkaloid miktarının % 1.48, anagirin miktarının ise %0.69 olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu bitkideki majör alkaloid olan anagirinin ise koyunlarda teratojen etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Şener vd 1992).

Tarımsal faaliyetlerde yoğun yeraltı sularının kullanılması dolayısıyla taban suyu seviyesinin azalması, göl suyunun aşırı drenajı sonunda sulak habitatların tahrip edilmesi, hedef türlerin yer aldığı bölgelerde yerleşim alanlarının genişlemesi, şehirleşme, evsel ve kentsel atıklar (çöp vb.), aşırı otlatmanın dolaylı etkileri bu türü tehlikeye atan en önemli unsurlardır. Büyükbaş ve küçükbaş hayvanlar tarafından yeşil dönemde yenmemekle beraber, bu alanların otlatılması sırasında sürüler tarafından basılma ve ezilme sonucu da zarar görmektedir (Tan vd. 2003).

T. turcica'nın yaşadığı habitat olan Akşehir ve Eber Göllerinin çevresinin önemli bitki alanı olarak tespit edilmesinin ve tohum örnekleri ile herbaryum örneklerinin saklanması haricinde (Tan vd. 2003) literatürde bu bitkinin korunmasına yönelik yapılan başka bir çalışma bulunmamaktadır.

Bunun yanında *Thermopsis* genusu üyelerinden yalnızca bir tanesinin doku kültürü çalışması mevcuttur. *Thermopsis lupinoides* ile ilgili yapılan bu çalışmada doku kültüründe (+)-Lupanin üretimi ile ilgili bir araştırma yapılmış ve beyaz kalluslarda bu maddenin sentezine rastlanmamıştır. Fakat, oluşan yeşil kallusların bu maddeyi sentezlediği tespit edilmiştir. Ancak bu çalışmada bir mikroçoğaltım prosedürü bulunmamaktadır (Saito vd. 1989).

Bizim çalışmamızın ilk amacı, tohumdan çoğaltım sırasında tohumların dormansi sorunlarının aşılmasının sağlanması ve böylece etkin bir çimlenme prosedürünün geliştirilmesidir. Bu çalışmaları *in vitro* ortamlarda gerçekleştirerek sağlıklı steril

fideler elde etmek ve bunları mikroçoğaltım aşamasında eksplant kaynağı olarak kullanmak ise ikinci amacımızdır. Son ve asıl amacımız ise *in situ* koruma yöntemlerine destekleyici olarak gördüğümüz bitki doku kültürü tekniklerini kullanarak verimli ve hızlı bir mikroçoğaltım prosedürü belirlemek ve çok tehlike altındaki *T. turcica*'nın korunmasına bir katkı sağlamaktır.

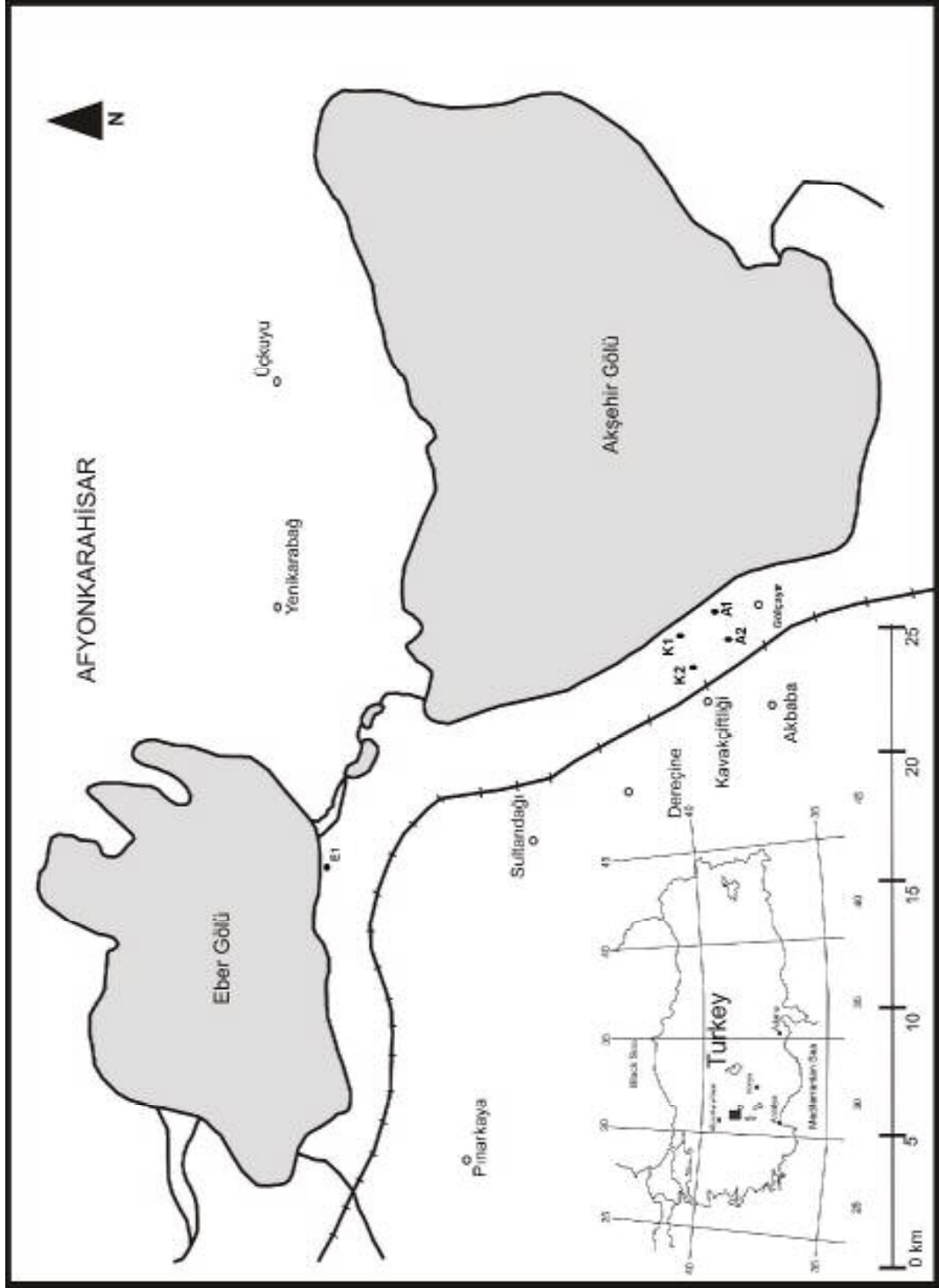
3. MATERYAL ve METOT

3.1 Bitki Materyali ve Arazi Çalışması

Bu çalışmanın araştırma materyali Afyonkarahisar ili sınırları içinde yayılış gösteren *T. turcica*'dır (bkz. Şekil 3.1). *T. turcica*'nın yayılış gösterdiği alanlarda yapılan kapsamlı bir arazi çalışması ile tespit edilen popülasyonlar Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Bu türün olgunlaşmış meyveleri Ağustos-Eylül 2004'te, Eber Gölü'nün güneyindeki bataklık araziden ve Akşehir Gölü'nün güney-batı kıyısından toplanmıştır (Bkz. Şekil 3.2). Toplanan meyvelerin içerisindeki sağlıklı tohumlar laboratuarda ayıklanmış ve cam kavanozlara yerleştirilerek deneylerde kullanılıncaya kadar karanlık ve oda sıcaklığında, Afyon Kocatepe Üniversitesi Herbaryumu'nda muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1 *Thermopsis turcica*'nın doğal yayılış alanındaki görünümü.



Şekil 3.2 *T. turcica*'nın yayılış alanında belirlenen populasyonlar. E1, Eber populasyonu, K1, Kavaklı 1 popülasyonu, K2, Kavaklı 2 popülasyonu, A1, Akbaba 1 populasyonu ve A2, Akbaba 2 popülasyonu.

3.2 Metot

3.2.1 Kültür Besi Yerlerinin Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Besi yerlerine eklenecek bitki büyüme düzenleyicilerinin ve pH'yı ayarlamak için kullanılan asit ve bazların stok solüsyonları hazırlanmıştır. Denemelerde kullanılan 2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ve indol-3-bütirik asit (IBA) balon joje'de 20 ml etanol içinde çözülmüş ve son konsantrasyonu 2mg/ml olacak şekilde bidistile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Naftalen asetik asit (NAA), 6-benzilaminopürin (BA) ve Kinetin (K) 70 ml sodyum hidroksit içinde çözülmüş ve son hacim 2 mg/ml olacak şekilde steril bidistile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Glasiyal asetik asidin %50'lik ve sodyum hidroksidin 1 N'lik çözeltileri hazırlanmıştır. Tüm stok solüsyonlar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Tüm besi yeri kompozisyonlarında MS (Murashige ve Skoog 1962) hazır tuz ve vitaminleri (4,3 g/L), sükroz (30 g/L) ve agar (7 g/L) kullanılmıştır. Gerekli miktardaki MS tuzları, vitaminleri ve sükroz 0.5 L distile suda manyetik karıştırıcı ile çözüldükten sonra stok hormonlardan arzu edilen miktarlarda eklenmiştir. pH glasiyal asetik asit ve sodyum hidroksit ile $5,7 \pm 0,1$ 'ye ayarlandıktan sonra agar eklenmiş ve hacim 1 L'ye tamamlanmıştır. Ardından besi yeri 121 °C ısı, 1 atm basınç altında 15 dk otoklavlanmıştır. Otoklavlanmış besi yeri oda sıcaklığında bir miktar soğutulduktan sonra steril kabin içerisinde amaca uygun kaplara (çimlendirme kabı, petri, cam kavanoz, cam tüp) dökülmüştür.

3.2.2 Denemelerde Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu

Denemelerde kullanılan beher, balon joje, cam petri, çimlendirme kabı, cam kavanoz, cam tüp, pens, bistüri, gazlı bez, spatül gibi malzemeler 121 °C ısı, 1 atm basınç altında 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan 9 cm'lik plastik petriler ise steril ve tek kullanımlıktır.

3.2.3 Çalışma Ortamının Sterilizasyonu

In vitro çalışmaların tümü steril kabin içerisinde ve bek alevinin yanında gerçekleştirilmiştir. Steril kabinin tüm iç yüzeyi çalışma öncesinde %70'lik etanol ile temizlenmiştir. Kültürlerin inkübasyona bırakıldığı iklim kabinleri ise ticari çamaşır suyu ile sık sık temizlenmiştir.

3.2.4 İklimlendirme Koşulları

Kültürler, 25 ± 1 °C'de ve beyaz GroLux™ floresan lamba ışığında 16 sa aydınlık ve 8 sa karanlıkta olmak üzere iklim kabininde inkübe edilmiştir. Kültürler tesadüf parselleri deneme desenine göre iklim kabinlerine yerleştirilmiştir.

3.2.5 *In vitro* Çimlendirme

Çimlendirme denemelerine Ocak 2005'te başlanmıştır. Herhangi bir ön muamele uygulanmayan tohumlar yüzey sterilizasyonu için önce üç defa distile su ile yıkanmıştır. Bunu takiben % 20'lik ticari çamaşır suyu içinde 20 dk bekletilmiş ve daha sonra % 70'lik etanolde 90 sn çalkalanmıştır. Son olarak, tohumlar 3 defa steril distile su ile durulanmıştır.

Tohumların bir diğer grubu stratifikasyon için iki kat nemli filtre kağıdı arasında 8 hafta, + 4 °C'de ve karanlıkta bekletilmiş ve ardından değişik sürelerde sülfirik asit ile (0, 15, 30, 60, 90, 120 dk) muamele edilmiştir. Diğer bir grup tohum ise stratifikasyon uygulaması yapılmaksızın konsantre sülfirik asit, hidroklorik asit ve nitrik asitte yukarıda belirtilen sürelerde bekletilmiştir. Asit muamelesi uygulanan tohumlara sterilizasyon işlemi uygulanmamış yalnızca muamele sonrası asidi uzaklaştırmak için üç defa steril distile su ile çalkalanmıştır. Stratifikasyon yapılmış tohumların bir kısmı ise yüzey sterilizasyonu sonrası agar yatağı üzerine alınmıştır.

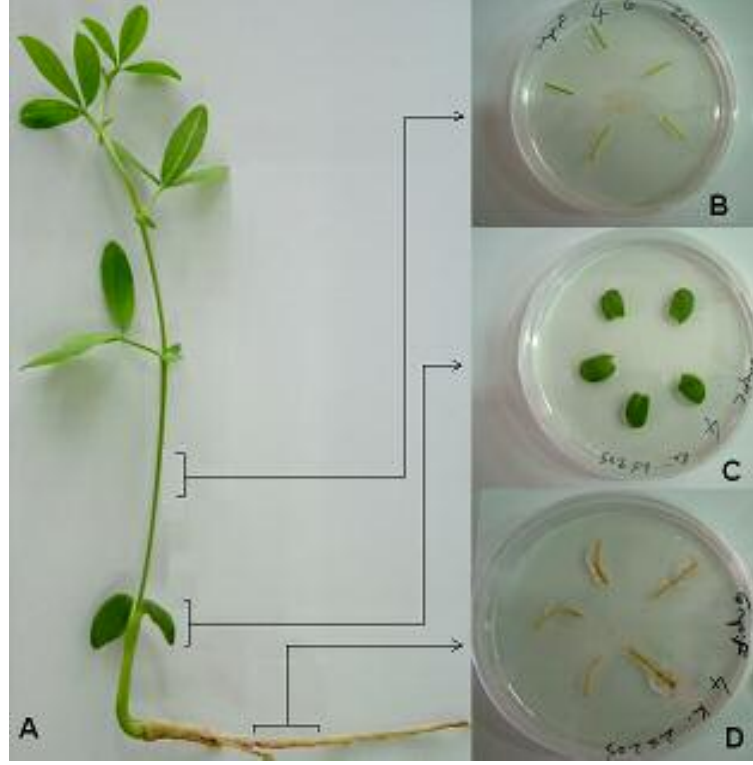
Çimlendirme yatağı olarak kullanılacak besi yerleri yukarıda belirtildiği şekilde bitki büyüme düzenleyicisi kullanılmadan hazırlanmış ve otoklavlanmıştır. Çimlendirme 11x11x9 cm ebatlarında hava girişine izin veren fakat mikroorganizmaların girişini engelleyen steril şeffaf plastik kaplarda gerçekleştirilmiştir. Çimlendirme kaplarına 200 ml besi yeri dökülmüştür. Her kaba 20 tohum yerleştirilmiştir ve her bir deneme 4 defa tekrarlanmıştır. Kültür kapları yukarıda belirtilen desende ve şartlarda iklim kabineye yerleştirilmiştir. Radikulanın tohum kabuğundan 2 mm uzamış olması (Rehman ve Park 2000) çimlenme için yeterli görülmüştür. Çimlenme denemesi 28 gün sürdürülmüştür ve çimlenen tohum sayıları her gün kaydedilmiştir.

3.2.6 Kallus Başlatımı

Besi yerlerine kahverengileşmeyi önlemek amacı ile 0.06 g/L PVP (polivinilprolidon) (Liao et al. 2004), 2,4-D veya NAA'nın farklı konsantrasyonları (0.5, 1, 2, 4, 8 mg/L) eklenerek 3.2.1'de bahsedildiği şekilde hazırlanmış ve otoklavlanmıştır. Besi yeri her birine yaklaşık 30 ml olacak şekilde petrilere dökülmüştür.

3.2.5'de bahsedilen çimlendirme yöntemlerinden en uygun olanı ile çimlendirilmiş olan 15 günlük steril *T. turcica* fideleri kallus denemesi için eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Kallus başlatımı için steril fidelerin kotiledon, epikotil ve kök eksplantları kullanılmıştır. Kotiledonlar bistüri yardımı ile bitkiden ayrılmış ve nodları uzaklaştırmak için proksimal uçları kesilerek atılmıştır. Epikotil ve köklerden ise 1 cm'lik parçalar kesilerek besi yeri üzerine konulmuştur (bkz Şekil 3.3). Her bir petriye aynı tip 5 eksplant yerleştirilmiş ve toplam üç petri kullanılmıştır. Deneme iki kez tekrarlanmıştır.

Kültürler 3.2.4'te anlatılan şartlarda iklim kabinlerine yerleştirilmiştir. Gözlemler haftalık yapılmış ve kalluslar iki haftada bir alt kültüre alınmıştır. Altıncı haftadan sonra kallus başlatımı denemesine son verilmiş ve kallus, adventif kök ve adventif sürgün oluşturan eksplantların sayıları ile kallus yaş ağırlıkları kaydedilmiştir.



Şekil 3.3 *In vitro* fidelerden eksplant alım yerleri ve eksplantların kallus başlatımı için petrilere yerleşimi. A, 15 günlük steril *T. turcica* fidesi, B, epikotil eksplantları, C, kotiledon eksplantları, D, kök eksplantları.

3.2.7 Kallustan Rejenerasyon

Kallus oluşum aşamasında elde edilmiş olan 6 haftalık kalluslar hangi hormon tipinde meydana geldiği dikkate alınarak sürgün oluşturma ortamına transfer edilmiştir. Rejenerasyon aşamasında MS besiyeri yerine BA veya K farklı konsantrasyonlarda (0.5, 1, 2 mg/L) eklenerek 3.2.1’de belirtildiği şekilde hazırlanmış ve otoklavlanmıştır. Daha sonra 200 ml’lik steril cam kavonozların her birine yaklaşık 40 ml olacak şekilde dökülmüştür. Her bir kavonoza 3 kallus (yaklaşık 0,5 g) konularak (bkz Şekil 3.4) 5 tekrar yapılmış ve 3.2.4’deki şartlarda iklim kabineye yerleştirilmiştir. Deneme 6 hafta sürdürülmüş ve bu süre sonunda sürgün oluşturan kallus sayıları, kallus başına oluşan sürgün sayıları ve oluşan sürgünlerin uzunlukları kaydedilmiştir.



Şekil 3.4 Rejenerasyon için kallusların BA ve K içeren MS ortamına alınması.

3.2.8 Köklendirme

Elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi için $\frac{1}{2}$ MS kullanılmıştır. Agar ve sükröz ise 3.2.1’de anlatılan miktarlarda eklenmiştir. Köklenme için hormonsuz, 1 mg/L NAA ve 1mg/L IBA içeren üç farklı ortam denenmiştir. Besi yerleri cam kavanozlara 50 ml olacak şekilde dökülmüş ve 2 cm’den büyük sürgünler köklendirmeye alınmıştır. Her bir hormon ortamı için 30 sürgün transfer edilmiştir. Köklenme denemesi 6 hafta sürdürülmüş ve bu sürenin sonunda kallus oluşumları, ölen sürgün sayıları, köklenen sürgün sayıları, sürgün başına kök sayıları ve kök uzunlukları kaydedilmiştir.

3.2.9 Dış Ortama Şaşırtma

Altıncı hafta sonunda köklenmiş olan bitkiciklerin içinde bulunduğu kültür kaplarının kapakları açılmış ve daha önceden belirtilmiş olan iklim odası

şartlarına ilaveten %80 üzerinde bir nem uygulamasında 3-4 gün öylece bekletilmiştir. Bunun ardından bitkiler perlit- toprak (1:1) karışımı içeren saksılara aktarılmışlar ve yine yüksek nemli ortamda bekletilmişlerdir. Nem oranı 2-3 günde bir göreceli olarak düşürülmüştür. Bu sırada saksılar 1/5 oranında sulandırılmış MS makro tuz karışımı ile 2-3 günde bir sulanmışlardır.

3.2.10 Verilerin İstatistiksel Analizleri

Çimlenme denemesinde elde edilen ortalama çimlenme zamanı Chuanren vd. (2004) göre aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır;

$$\sum (nd) / N$$

Burada n : gözlem yapılan gün aralığında çimlenen tohum sayısını, d : inkübasyon süresinin o anki gününü ve N ise denemede çimlenmiş toplam tohum sayısını belirtmektedir.

Denemeler sonunda kaydedilmiş olan tüm verilerin ortalamaları ve standart hataları SPSS 10 (Ural ve Kılıç 2005) paket programı ile hesaplanmıştır. Yapılan muamelelerin etkileri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiştir. Uygulama sonuçlarının ortalamaları arasındaki farklar 0,05 önem düzeyinde Duncan (çimlenme verileri için) ve Tukey (diğer tüm veriler için) testi ile karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Arazi Çalışması Bulguları

2004 yılı Ağustos-Eylül ayları dönemlerinde *T. turcica* türünün yayılış gösterdiği bölgeye tohum elde edebilmek amacıyla sık sık gidilmiştir. Bu çalışmalarda, *T. turcica*'nın yaklaşık 2x10 km² alanı kapsayan Eber ve Akşehir Gölleri kıyıları arasındaki bataklıklarda, meralarda ve çamurlu çayırlarda yayılış gösterdiği tespit edilmiştir (bkz. Şekil 3.2). Bu alan içerisinde yapılan detaylı arazi çalışmalarında *T. turcica*'nın değişik birey sayıları bulunduran 5 popülasyonu tespit edilmiştir (bkz. Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 *T. turcica*'nın yayılış alanında belirlenen popülasyonlar.

Popülasyon	Bitki Sayısı	Enlem, Boylam	Yükselti
A1, Akbaba 1	<1000	38.28 N, 31.20 E	952
A2, Akbaba 2	Yoğun	38.28 N, 31.19 E	963
K1, Kavaklı 1	<5 000	38.29 N, 31.19 E	967
K2, Kavaklı 2	Yoğun	38.30 N, 31.19 E	966
E1, Eber	<50	38.36 N, 31.13 E	968

Bireysel gözlemlerimize göre, *T. turcica*'nın en fazla yayılış gösterdiği Akbaba 1&2, Kavaklı 1&2 popülasyonlarının bulunduğu bölgelerdeki tarla ve bahçelerde, toprak sürme işlemlerinin gerçekleştirilmesinin ardından rizomları aracılığı ile çoğaldığı düşünülen genç *T. turcica* fidelerinin bu tarlaları kaplamış olduğu tespit edilmiştir (bkz. Şekil 4.1).

Ek olarak, *T. turcica* meyvelerinin açılmaması (Davis 1988) nedeniyle en az iki yıl bitki üzerinde kaldıkları ve tohumların doğal olarak yayılmasının oldukça kısıtlanmış olduğu gözlenmiştir. *T. turcica*'nın yoğun yayıldığı popülasyonlarda (Akbaba 1&2, Kavaklı 1&2) mevcut olan bir ya da iki yıllık meyvelerin tamamına yakınında sağlıklı tohumlara rastlanmamıştır (bkz. Şekil 4.2).



Şekil 4.1 Sürülmüş bahçelerde rizomları ile çoğalmış olan *T. turcica* fideleri. (Eylül 2004)



Şekil 4.2 *T. turcica* meyve ve tohumları. Üstte, sağdan sola Eber Gölü kıyısından toplanan üç karpelli meyve, karpelin açık durumu ve sağlıklı tohumlar. Altta sağdan sola Akşehir Gölü kıyılarından toplanan meyve, karpelin açık durumu ve sağlıklı tohumlar.

Bu bitkinin morfolojik ve anatomik özelliklerinin ilk tanımlanması yapıldığında (Davis 1988), *T. turcica*'ya ait her bir meyvede 2-3 tohum bulunduğu bildirmiş olsa da, sağlıklı tohumları temin ettiğimiz küçük Eber popülasyonundaki her bir meyvede 8'e varan sayılarda tohum olduğu gözlemlenmiştir (bkz Şekil 4.2) . 50'den az *T. turcica* bireyi bulunduran Eber popülasyonundan elde edilen kısıtlı miktarda fakat sağlıklı tohumlar çalışmamızdaki *in vitro* çimlendirme ve mikropropagasyon deneylerinde kullanılmıştır.

4.2 Çimlenme Bulguları

Bu çalışmada, sağlıklı tohumların oldukça az olması nedeni ile denemelerde kullanılan tohum sayısı kısıtlı olmuştur. Asit muamelesi yapılmamış tohumlar MS ortamına alınma öncesi klasik sterilizasyon tekniği uygulanmışken, asit muamelesine tabii tutulmuş tohumlar için klasik sterilizasyon uygulaması yapılmaya gerek duyulmamış, asitte bekletme yeterli bulunmuştur. Bu uygulama sonrası MS ortamına transfer edilmiş tohumlarda herhangi bir kontaminasyon problemine rastlanmamıştır.

In vitro çimlenme denemesinde, asit skarifikasyonu ve +4 °C'de 8 hafta soğuk stratifikasyonun *T. turcica* tohumları çimlenmesine ve ortalama çimlenme zamanına olan etkisi araştırılmıştır. Stratifikasyon yapılmamış tohumlarda üç farklı asit kullanılırken (sülfürik asit, hidroklorik asit, nitrik asit) stratifikasyon muamelesi yapılan tohumlar ya doğrudan çimlendirme ortamına alınmış ya da sadece sülfürik asit skarifikasyonuna maruz bırakılmıştır.

T. turcica tohumlarının çimlenme yüzdeleri, $P \leq 0,05$ önem seviyesinde ve Duncan testine göre aralarındaki farklarla birlikte Çizelge 4.2'de verilmiştir. Ön işleme tutulmamış veya sadece +4 °C'de 8 hafta soğuk muamelesi uygulanmış tohumlar ancak % 6,7 oranında çimlenmiştir. Sadece sülfürik asit skarifikasyonuna tabii tutulan tohumların çimlenme oranları asitte bekleme süresi arttıkça artmıştır ve % 98,3 çimlenme oranı yakalanmıştır. 90 dk sülfürik asit ile muamele edilmiş tohumlardan elde edilen fideler Şekil 4.3'te verilmiştir. Tohumların, değişik

sürelerde hidroklorik asit ile muamele edilmeleri $P \leq 0,05$ önem seviyesinde çimlenmeyi etkilememişken, 120 dk nitrik asitte tutulan tohumların çimlenmesi ancak %20 seviyesine ulaşmıştır. Stratifikasyon uygulanan tohumlara yalnızca sülfürik asit muamelesi yapılmış ve 120 dk asitle muamele edilmiş tohumların tümü (%100) çimlenmiştir. Ancak stratifikasyonun çimlenme üzerine $P \leq 0,05$ önem seviyesinde önemli bir etkisi tespit edilmemiştir (bkz. Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Stratifikasyon ve asit skarifikasyonun *T. turcica* tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine etkisi.

Çimlenme (%)				
Süre (dk)	Sülfürik Asit	Hidroklorik Asit	Nitrik Asit	Soğuk + sülfürik Asit
0	6,7 ^{a*}	6,7 ^a	6,7 ^a	6,6 ^a
15	23,3 ^b	5,0 ^a	8,3 ^a	23,4 ^b
30	83,3 ^c	6,6 ^a	8,3 ^a	83,5 ^c
60	83,3 ^c	6,6 ^a	8,3 ^a	83,4 ^c
90	94,9 ^d	8,3 ^a	10,0 ^a	95,2 ^d
120	98,3 ^d	8,3 ^a	20,0 ^b	100,0 ^e

* Rakamların üzerindeki farklı harfler aynı sütun içindeki değerlerin Duncan testine göre %0,05 önem seviyesinde farklı olduğunu gösterir.



Şekil 4.3 90 dk sülfürik asit muamelesine tabi tutulan *T. turcica* tohumlarından çimlenen fideler.

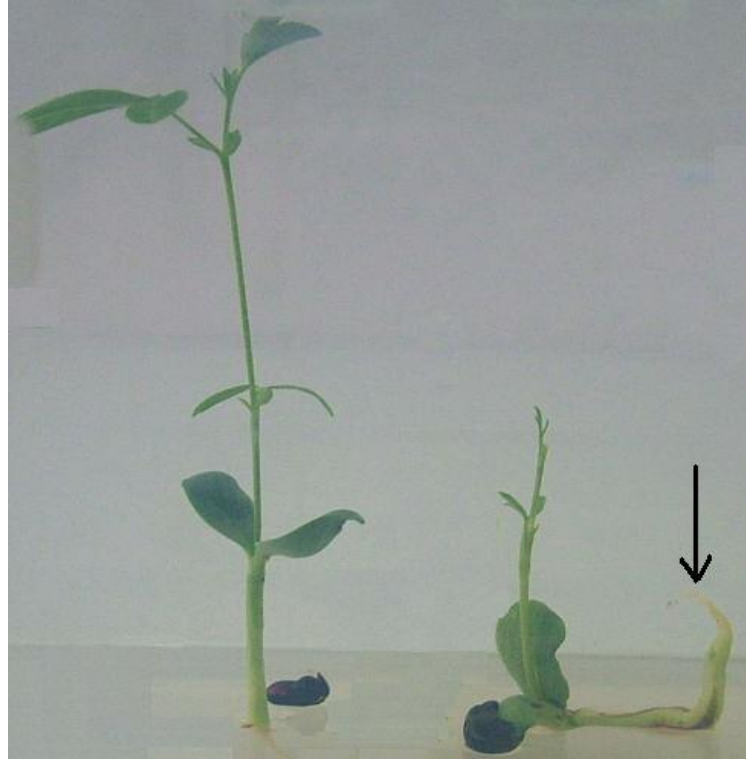
T. turcica tohumlarının ortalama çimlenme zamanları Duncan testine göre $P \leq 0,05$ önem seviyesinde değerlendirmeleri ile birlikte Çizelge 4.3'te verilmiştir. Uygulama yapılmamış veya sadece stratifikasyon yapılmış tohumların ortalama çimlenme zamanları en yavaş (7 gün) seyretmiştir. Hidroklorik asit, çimlenme süresini kontrole göre önemli derecede değiştirmemiştir (6.5 gün). 120 dk nitrik asitle muamele edilmiş tohumlarda ortalama çimlenme zamanını kontrol grubuna göre önemli derece düşürmüştür (5,8 gün). Sülfürik asit ile skarifikasyona tabi tutulan tohumlarda ortalama çimlenme zamanı 3,8 güne kadar düşmüştür. Yalnız sülfürik asit uygulanan guruplar ile stratifikasyon sonrası sülfürik asit uygulanan guruplar arasında ortalama çimlenme zamanları açısından $P \leq 0,05$ önem seviyesinde fark gözlenmemiştir.

Çizelge 4.3 Stratifikasyon ve asit skarifikasyonu uygulamalarının *T. turcica* tohumları ortalama çimlenme zamanı üzerine etkisi.

Ortalama Çimlenme Zamanı (gün)				
Süre (dk.)	Sülfürik Asit	Hidroklorik Asit	Nitrik Asit	Soğuk + Sülfürik Asit
0	7,0 ^{a*}	7,0 ^a	7,0 ^a	7,2 ^a
15	4,4 ^b	6,6 ^a	6,7 ^{ab}	4,4 ^b
30	4,0 ^b	6,7 ^a	6,8 ^{ab}	4,1 ^{bc}
60	3,6 ^b	6,6 ^a	6,7 ^{ab}	3,7 ^{cd}
90	3,5 ^b	6,5 ^a	6,4 ^{ab}	3,6 ^{cd}
120	3,8 ^b	6,5 ^a	5,8 ^b	3,3 ^d

* Rakamların üzerindeki farklı harfler, aynı sütundaki değerlerin Duncan testine göre %0,05 önem seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Bu çalışmada, yalnızca 120 dk. süreyle sülfürik asitle muamele edilmiş tohumlardan gelişen *T. turcica* fidelerinde %20 oranında anomalilikler gözlenmiştir (bkz Şekil 4.4). Anormal bitkilerde özellikle fidelerin kotiledonları ve/veya kök uçlarında hasarlar tespit edilmiştir. Fide gelişiminde gözlenen bu hasarlar diğer uygulamalarda gözlenmemiştir. Ek olarak, az tohumun çimlendiği deneme guruplarında fidelerin daha iyi geliştiği, fakat çimlenmenin yüksek olduğu guruplarda fidelerin daha bodur ve ince olduğu gözlenmiştir.



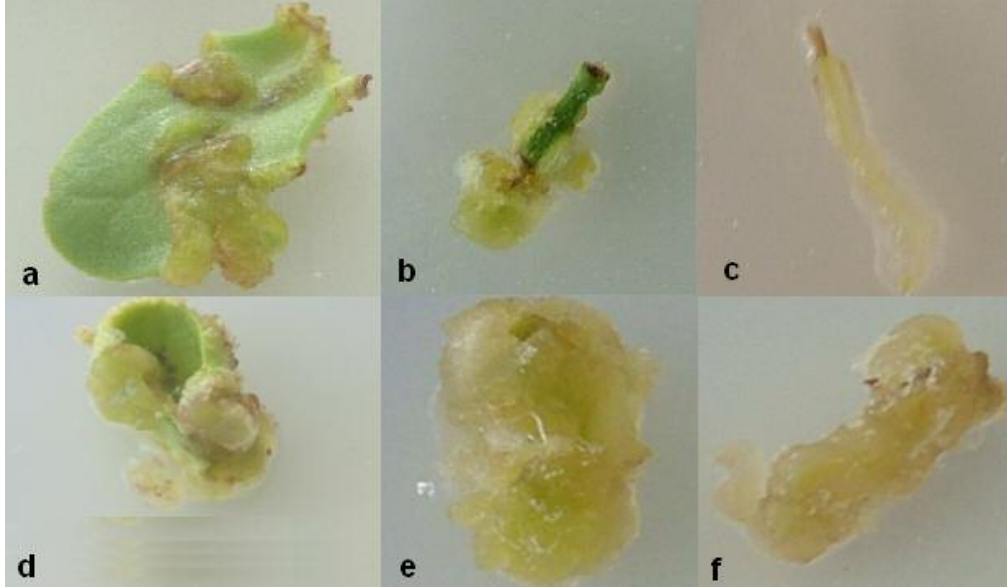
Şekil 4.4 120 dk sülfürik asit muamelesinde hasarlı *T. turcica* fideleri. Solda sağlıklı *T. turcica* fidesi, sağda radikulası hasar görmüş (okla gösterilen) ve uzayamamış sağlıklı fide.

4.3 Mikroçoğaltım Bulguları

4.3.1 Kallus Başlatımı ve Oluşumu

15 günlük steril fidelerden alınan kotiledon, epikotil ve kök eksplantları değişik konsantrasyonlarda NAA ve 2,4-D (0,5, 1, 2, 4, 8 mg/L) içeren MS besi yerlerinde kültüre alınmıştır. Tüm eksplantlar ikinci ve dördüncü haftalarda aynı ortamlarında alt kültüre edilmiştir ve altıncı hafta sonunda kallus denemesi sonuçlandırılmıştır. Deneme başlangıcının 6. gününden itibaren kök eksplantlarının yüzeylerinde kallus dokusu oluşmaya başlamıştır (bkz. Şekil 4.5c). Epikotil segmentlerinden kallus uyarımı ilk olarak denemenin ikinci haftasında gözlemlenmişken (bkz Şekil 4.5b) kotiledon eksplantlarında uyarım ise ancak üçüncü hafta başlangıcında görülmüştür (bkz Şekil 4.5a). Kotiledonlardan ve epikotillerden kallus uyarımı kesim ve yara yüzeylerinde başlamışken, kök eksplantlarının tüm yüzeylerinde kallus dokusu geliştirmiştir. Altıncı haftanın

sonunda NAA ve 2,4-D hormonu içeren tüm eksplant gruplarından benzer görünüşte yumuşak ve açık sarı renkte kalluslar elde edilmiştir (bkz. Şekil 4.5def).



Şekil 4.5 2 mg/L NAA içeren MS besiyerindeki kallus uyarımı ve oluşumu. (a) üç haftalık kotiledon eksplantı, (b) iki haftalık epikotil eksplantı, (c) bir haftalık kök eksplantı, (d, e, f) sırasıyla altı hafta sonunda elde edilen kotiledon, epikotil ve kök kallusları.

Altıncı hafta sonunda deneme gruplarına göre kallus oluşumu toplu sonuçları Tukey testine göre $P \leq 0,05$ önem seviyeleri ile birlikte Çizelge 4.4'te verilmiştir. Elde edilen verilere göre, değişik NAA ve 2,4-D bitki büyüme düzenleyicileri içeren besiyerlerindeki kotiledon eksplantlarından en düşük kallus oluşumu 0.5 mg/L NAA içeren ortamda (%30) elde edilmiştir. 8 mg/L NAA ortamına alınmış olan tüm kotiledon eksplantları (%100) ise kallus oluşturmuştur. Göreceli olarak 2, 4 ve 8 mg/L NAA ortamındaki ve 1, 2, ve 8 mg/L 2,4-D ortamındaki kotiledon eksplantlarından farklı oranlarda kallus oluşumu gözlenmiş olsa da $P \leq 0,05$ önem seviyesinde bu gruplar arasında önemli bir fark çıkmamıştır (bkz. Çizelge 4.4). Epikotil eksplantlarında en yüksek kallus oluşumu %93 ile 4 mg/L NAA içeren ortamda gerçekleşmişken, % 47 ile en düşük kallus oluşturma oranı 0,5 mg/L NAA'li besiyeri üzerinde gerçekleşmiştir (bkz. Çizelge 4.4). 8 mg/L NAA ortamı haricindeki kök eksplantlarının bulunduğu ortamlar %80-100 oranlarında kallus oluşturmuş ve bu değerler arasında $P \leq 0,05$ önem seviyesinde farklılık oluşmamıştır.

Çizelge 4.4 Farklı konsantrasyonlarda NAA ve 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisi içeren temel MS besi yerlerinin, kotiledon, epikotil ve kök eksplantlarından kallus oluşumuna etkileri.

(mg/L)	Kallus Oluşturan Eksplantlar (%)		
	Kotiledon	Epikotil	Kök
NAA			
0,5	30 ^{a*} A**	47 ^a A	97 ^b B
1	73 ^{bcd} AB	57 ^{ab} A	93 ^b B
2	97 ^{de} A	90 ^c A	100 ^b A
4	87 ^{cde} A	93 ^c A	87 ^b A
8	100 ^e A	70 ^{abc} B	47 ^a C
2,4-D			
0,5	60 ^b A	67 ^{abc} A	93 ^b B
1	80 ^{bcd} A	73 ^{abc} A	90 ^b A
2	93 ^{cde} A	83 ^{bc} A	100 ^b A
4	70 ^{bc} A	70 ^{abc} A	93 ^b A
8	80 ^{bcd} A	60 ^{ab} A	80 ^b A

* Rakamların üzerindeki farklı küçük harfler aynı sütun içindeki değerlerin Tukey testine göre %0,05 önem seviyesinde farklı olduğunu, ** farklı büyük harfler aynı satır içindeki değerlerin Tukey testine göre %0,05 önem seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Aynı bitki büyüme düzenleyicileri ile muamele edilmiş kotiledon, epikotil ve kök eksplantlarının kallus oluşum değerleri Tukey testine göre $P \leq 0,05$ önem seviyesinde karşılaştırmaları ile birlikte Çizelge 4.4'te verilmiştir. 8 mg/L 2,4-D içeren ortam haricindeki diğer bitki büyüme düzenleyicisi ortamlarında kök eksplantlarının, kotiledon ve epikotil eksplantlara göre $P \leq 0,05$ önem seviyesinde önemli olarak yüksek ya da aynı oranda kallus verdiği gözlenmiştir.

Bitki büyüme düzenleyicileri ve konsantrasyonları göz ardı edilerek, eksplant tipinin kallus oluşumu üzerine etkisi incelendiğinde kotiledon, epikotil ve kök eksplantlarının ortalama olarak sırasıyla %77, %71 ve %88 oranlarında kallus verdiği hesaplanmıştır. Kotiledon ve epikotil değerleri arasında Tukey testine göre $P \leq 0,05$ önem seviyesinde bir fark oluşmamışken, kök eksplantları $P \leq 0,05$ önem seviyesinde diğer iki eksplanta göre farklı çıkmıştır.

Eksplant tipi ve hormon konsantrasyonlarına bakılmaksızın, deneme genelinde NAA ve 2,4-D içeren MS besi yerlerinde sırasıyla %78 ve % 80 oranlarında kallus oluşumu gerçekleşmiş ve hormon tipleri açısından $P \leq 0,05$ önem seviyesinde bir fark gözlemlenmiştir. Altıncı hafta sonunda elde edilen tüm

kallusların NAA ve 2,4-D ortamlarında biyo-kütle bağlama açısından karşılaştırıldığında NAA içeren ortamlarda kallus başına ortalama ağırlık 1,22 g olarak belirlenmişken, 2,4-D içeren ortamlarda bu değer 0,58 g olarak saptanmıştır.

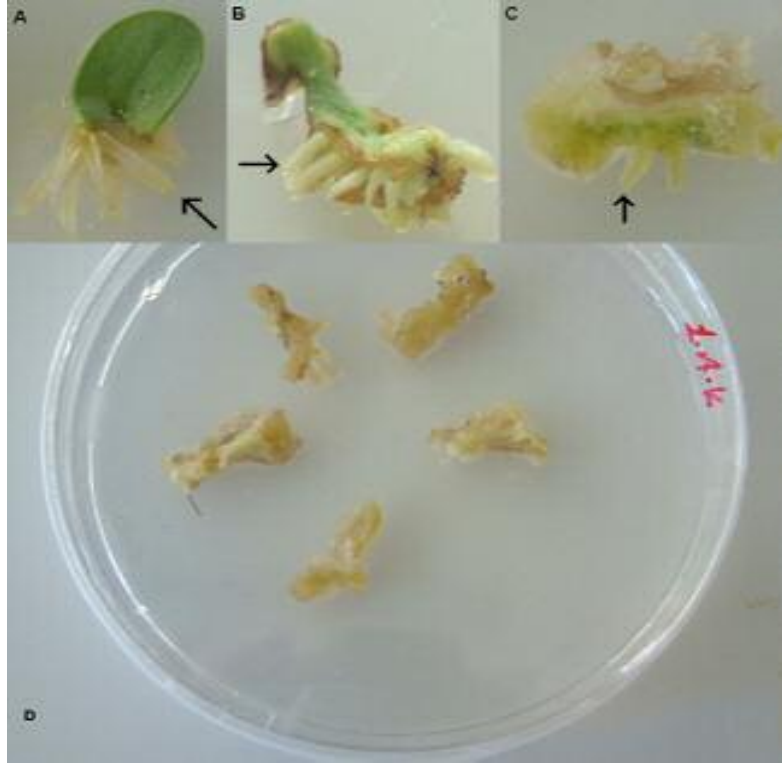
Bunlara ek olarak, yalnızca NAA içeren besin ortamlarında ikinci haftadan itibaren adventif kök oluşumları (bkz Şekil 4.6) ve dördüncü haftadan itibaren adventif sürgün oluşumları gözlenmişken, bu oluşumlar 2,4-D ortamındaki hiçbir eksplantta kesinlikle gözlemlenmemiştir (bkz Çizelge 4.5 ve 4.6).

Kotiledon eksplantlarında en fazla adventif kök oluşumu (%90) 8 mg/L NAA ortamında gerçekleşmişken, en düşük adventif kök oluşumu ise 0,5 mg/L NAA ortamında (%60) elde edilmiştir. Epikotil eksplantlarında en yüksek ve en düşük adventif kök oluşumları (%77 ve %13) sırasıyla 2 mg/L ve 0,5 mg/L NAA ortamlarında tespit edilmiştir. En düşük adventif kök oluşumlarının gözlemlendiği kök eksplantlarında ise en yüksek %47 (4 mg/L NAA) ve en düşük %7 (8 mg/L NAA) oranlarında adventif kök oluşumu gözlenmiştir. Kullanılan NAA miktarları göz ardı edildiğinde, kotiledon, epikotil ve kök eksplantları sırasıyla % 74, %49 ve %22 oranlarında adventif kök oluşturmuştur ve bu değerler %0,05 önem seviyesinde ve Tukey testine göre birbirlerinden farklıdır.

Çizelge 4.5 Kallus oluşumu için NAA ortamına alınan eksplantların adventif kök oluşturma yüzdeleri.

NAA (mg/L)	Adventif Kök Oluşturan Kallus (%)		
	Kotiledon	Epikotil	Kök
0,5	60 ^a *A**	13 ^a B	10 ^a B
1	70 ^{ab} A	33 ^{ab} B	13 ^a B
2	83 ^{ab} A	77 ^c A	37 ^{ab} B
4	67 ^{ab} A	60 ^{bc} A	47 ^b A
8	90 ^b A	60 ^{bc} B	7 ^a C

* Yüzdelerin üzerindeki farklı küçük harfler aynı sütun içindeki değerlerin Tukey testine göre %0,05 önem seviyesinde farklı olduğunu; ** farklı büyük harfler aynı satır içindeki değerlerin Tukey testine göre %0,05 önem seviyesinde farklı olduğunu gösterir.



Şekil 4.6 NAA bulunan MS ortamlarında adventif kök oluşumları. (A) kotiledon eksplanti, (B) epikotil eksplanti, (C) kök eksplanti, (D) 2,4-D bulunan ortamda adventif kök oluşturmayan kalluslar.

Çizelge 4. 6 Kallus oluşumu için NAA ortamına alınan eksplantların adventif sürgün oluşturma yüzdeleri.

NAA (mg/L)	Adventif Sürgün Oluşturan Kallus (%)		
	Kotiledon	Epikotil	Kök
0,5	37 ^{abc*} A*	30 ^{ab} A	10 ^a A
1	53 ^{bc} A	40 ^{ab} A	13 ^a B
2	60 ^c A	47 ^{ab} B	17 ^a B
4	20 ^{ab} A	33 ^{ab} A	17 ^a A
8	10 ^a A	10 ^a A	0 ^a A

* Yüzdelerin üzerindeki farklı küçük harfler aynı sütun içindeki değerlerin Tukey testine göre %0,05 önem seviyesinde farklı olduğunu; ** farklı büyük harfler aynı satır içindeki değerlerin Tukey testine göre %0,05 önem seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Adventif kök oluşumunda olduğu gibi, adventif sürgün oluşumu da NAA ortamındaki eksplantlarda gözlenmiştir. Tüm eksplant çeşitleri 2 mg/L NAA ortamında en yüksek seviyede, 8 mg/L NAA ortamında ise eksplantlardan en düşük seviyede adventif sürgün oluşum gözlenmiştir. Kotiledon ve epikotil eksplantları 2 mg/L NAA ortamında sırasıyla %60 ve %47 oranlarında adventif sürgün vermişlerdir. 8 mg/L NAA ortamında bulunan aynı eksplantların ancak

%10'u adventif sürgün oluşturmuştur. Kök eksplantları ise adventif sürgün oluşumu açısından en zayıf eksplant tipi olmuştur ve 2 mg/L NAA ortamına alınan kök parçalarının ancak %17'si sürgün oluşturmuş, 8 mg/L NAA'de ise hiçbir kök eksplantı sürgün oluşturmamıştır. Bunlara ek olarak, tüm kotiledon eksplantlarının % 36'sı, epikotil eksplantlarının %32'si ve, kök eksplantların %11'i adventif sürgün oluşturmuştur. Tukey testine göre, epikotil ve kotiledon eksplantlarından oluşan adventif sürgün oranlarında %0,05 önem seviyesinde fark oluşmamışken, kök eksplantları için bu değer önemli seviyede düşük çıkmıştır.

4.3.2 Kallustan Rejenerasyon

Tüm eksplant tiplerinden elde edilen kallusların rejenerasyon ortamlarına transferi öncesi kallusların hangi bitki büyüme düzenleyicisinde oluştukları kaydedilmiştir. Mevcut kalluslar K ve BA bitki büyüme düzenleyicilerinin değişik konsantrasyonlarını bulunduran (0,5, 1, 2, mg/L) temel MS besi yeri üzerine rejenerasyon amacıyla alınmıştır. Kallus transferi sırasında sadece kallusların alınmasına dikkat edilmiş ve eksplant parçaları mümkün olduğu kadar alınmamıştır. Rejenerasyon ortamına alınan kalluslar 21. günde yine kendi besin ortamlarında alt kültüre edilmiş ve deneme 8. haftada sonlandırılmıştır.

Bu denemede, 2,4-D ortamından rejenerasyon ortamına alınan hiçbir kallustan rejenerasyon gözlemlenmemiştir. NAA içeren besi yerlerinden rejenerasyon ortamına alınmış olan kallusların rejenerasyon ortamına bağlı olarak sadece %21'i rejenerasyona tepki vermiştir.

NAA kaynaklı kallusların, üç farklı konsantrasyonda (0,5, 1 ve 2 mg/L) BA bulunduran temel MS ortamına alınması sonrası %13 oranında rejenerasyon gözlenmiştir (bkz Çizelge 4.7, Şekil 4.7) ve konsantrasyonlar arasında önemli bir fark oluşmamıştır. Fakat, en düşük seviyede K (0,5 mg/L) kullanımıyla transfer edilen NAA kaynaklı kallusların % 47'si rejenere olmuştur. Kinetin oranının artmasıyla (1 ve 2 mg/L kinetin) rejenerasyon oranı azalmıştır (sırasıyla %26.3 ve

%13) ve K miktarının artışı ile birlikte rejenerasyonun azalması $P \leq 0,05$ önem seviyesinde Tukey testine göre önemli bulunmuştur (bkz Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 BA ve Kinetinin farklı konsantrasyonlarının NAA kökenli kalluslardan rejenerasyonun üzerine etkisi.

mg/L	Rejenerasyon (%)	Ort. Sürgün Sayısı	Ort. Sürgün Boyu
BA			
0,5	13,3 ^{a*}	1,2 ^{ab}	1,08 ^a
1,0	13,3 ^a	1,8 ^{ab}	1,48 ^{ab}
2,0	13,3 ^a	4,4 ^c	2,16 ^{ab}
K			
0,5	46,6 ^b	2,2 ^b	2,93 ^{ab}
1,0	26,6 ^{ab}	1,5 ^{ab}	1,44 ^{ab}
2,0	13,3 ^a	0,6 ^a	0,96 ^a

* Yüzdelerin üzerindeki farklı küçük harfler aynı sütun içindeki değerlerin %0,05 olasılık seviyesinde ve Tukey testine göre önemli derecede farklı olduğunu gösterir.



Şekil 4.7 2 mg/L BA içeren MS ortamındaki kalluslardan rejenerere olan sürgünler.

Ortalama sürgün sayıları üzerinde hem BA hem de kinetin bulunan ortamların etkisi istatistiki açıdan önemlidir. BA konsantrasyonu arttıkça kallus başına maksimum sürgün sayısında göreceli bir artış olmasına rağmen yalnızca 2 mg/L BA bulunan ortamda istatistiki açıdan önemli sayıda sürgün (4,4) elde edilmiştir. Kinetin bulunan ortamlarda ise konsantrasyon artışına bağlı olarak kallus başına sürgün sayılarında azalma tespit edilmiştir. 0,5 mg/L kinetin bulunan ortamda en fazla sürgünün olduğu (2,2) gözlenmiştir (bkz Çizelge 4.7).

Elde edilen sürgün boyları karşılaştırıldığında en düşük sürgün boyu 2 mg/L K bulunan ortamda elde edilmiştir. Maksimum sürgün boyu ise 0,5 mg/L K ve 2 mg/L BA bulunan ortamlarda gözlenmiştir ve bu değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur. BA konsantrasyonu arttıkça sürgün boylarında göreceli bir artış gözlenmesine rağmen bu gruplar arasında istatistiki açıdan önemli bir fark bulunmamıştır. K konsantrasyonu arttığında ise sürgün boylarında önemli bir düşüş gözlenmiştir (bkz çizelge 4.7).

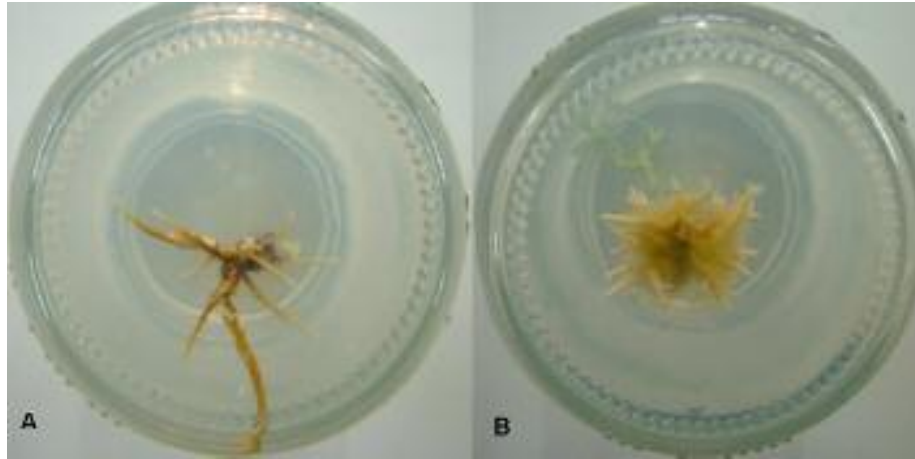
4.3.3 Köklendirme Denemesi

Üç farklı ortamda köklenmeye alınmış fidelerin 6 hafta sonundaki gelişim durumları ve istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 4.8'de toplu olarak verilmiştir. Bu sürenin sonunda hormon içermeyen ½ MS ortamında bulunan fidelerden hiç birisinde kök oluşumu gözlenmemiştir. Bu ortamdaki fidelerin yarısı ölüken diğer yarısı ise 6 hafta sonuna kadar canlılıklarını sürdürmüşlerdir (bkz Şekil 4.8).

1 mg/L IBA bulunan ortamda ise fidelerin %40'ı köklenmiştir. Bu ortamda oluşan köklerin primer kök yapısında olduğu ve görece daha ince olarak geliştiği gözlenmiştir (bkz Şekil 4.9). Fidelerdeki ölüm oranı ise %20'de kalmıştır ve bu istatistiksel olarak NAA içeren ortamdan farklı bulunmamıştır. Bu ortamdaki sürgünlerin ortalama kök sayısı 4 olarak bulunmuş, ortalama kök uzunluğu ise 3 cm olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.8 Kök oluşumu gözlenmemiş *T. turcica* fideleri. A- Hormonsuz ortamda kök oluşumu gözlenmeksizin 6 hafta yaşayan sürgün, B- 1 mg/L NAA içeren ortamdaki kök oluşumu yerine kallus gelişimi gözlenen 6 haftalık sürgün.



Şekil 4.9 Köklenmiş *T. turcica* fidelerinin alttan görünümü. A- 1 mg/L IBA içeren ½ MS ortamında köklenmiş fide, B-1 mg/L NAA içeren ½ MS ortamında köklenmiş fide.

Çizelge 4.8 Köklenme ortamına alınmış fidelerden 6 hafta sonunda elde edilen bulgular.

Ortam (1/2 MS) +	Köklenme (%)	Ölüm (%)	Kallus (%)	Ort.Kök Sayısı	Ort. Kök Uzunluğu (cm)
Hormonsuz	0 ^{a*}	50 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
1mg/L IBA	40 ^b	20 ^b	0 ^a	4 ^b	3,0 ^c
1 mg/L NAA	70 ^c	13 ^b	50 ^b	8 ^c	1,3 ^b

* Değerlerin üzerindeki farklı küçük harfler aynı sütun içindeki değerlerin %0,05 olasılık seviyesinde ve Tukey testine göre önemli derecede farklı olduğunu gösterir.

1 mg/L NAA içeren ortamdaki köklenme oranı ise %70'tir. Bu ortamda oluşan köklerde ise sekonder kök oluşumları daha yoğun olarak gözlenmiştir. Ayrıca kökler daha kalın ve kısadır. Ortalama kök sayısı, IBA içeren ortama oranla iki kat (8 kök) daha fazladır. Bunun aksine kök uzunlukları ise yaklaşık yarı yarıya daha kısadır (1,3 cm). Ayrıca bu ortamda diğer ortamlarda görülmeyen bir durum da gözlenmiştir. Öyle ki, özellikle kök oluşturmayan bazı sürgünlerin besi yerine temas eden bölgelerinde kallus oluşumları gözlenmiştir (bkz Şekil 4.8). Şekil 4.10, bu aşama sonunda elde edilen tam bir bitkiyi göstermektedir.



Şekil 4.10 Altıncı hafta sonunda köklenmiş tam bir *T. turcica* fidesi.

4.3.4 Dış Ortama Şaşırtma

Köklenen ve tam bir bitki konumuna gelen fidelerin önce içinde buldukları kültür kaplarının kapakları açılmış ve ardından yüksek nemde 2-3 gün bekletilmiştir. Bunun ardından perlit-toprak karışımı içeren saksılara aktarılmış ve

yine yüksek nemde muhafaza edilmişlerdir (bkz Şekil 4.11). Nem düzenli olarak 2 günde bir düşürülmüştür. Bir haftalık süre içerisinde bu fidelerin çoğu hayatta kalamamıştır. Çok az sayıda fide ise yaşamını devam ettirmiştir.



Şekil 4.11 Toprağa şaşırtılmış *T. turcica* bitkisi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitkilerin kendi özel habitatlarında, kasıtlı veya masum insan aktiviteleri tarafından yıkımı türlerin birçoğunu tehdit veya tehlike altına sokmuştur (Wochok 1981). Öyle ki, önümüzdeki 50 yıl içerisinde mevcut vasküler bitkilerin %25'inin doğada tükeneceği düşünülmektedir (Schemske vd. 1994). Bitki topluluklarının insan etkisi ile değişmesi ve bozulan bu habitatların eski koşullarına döndürülmesinin çok yavaş olması sebebi ile tehdit altındaki kaynakları korumak ve habitatları restore edebilmek amacı ile kullanılabilir her teknolojiye yararlanmak gerekmektedir (Wochok 1981). Bitki biyoteknolojisi de bu amaçla 1970'li yıllardan beri kullanılmakta ve *in situ* koruma metodlarına çok önemli alternatifler sağlamaktadır.

Bu çalışmada çok tehlike altında olan *T. turcica*'nın, bitki doku kültürü tekniklerini kullanarak hızlı çoğaltımını sağlayacak prosedürün belirlenmesi üzerine yoğunlaştık. Öncelikle bu türün doğadaki mevcut durumu ve elde edilen tohumların çimlenme özellikleri araştırılmıştır.

T. turcica'nın otlak hayvanları tarafından yenmemesi, tıbbi amaçla kullanılmaması ve bitkinin rizomları ile çoğalabilmesi bitkinin ekolojik avantajları olarak değerlendirilebilir. *Thermopsis* genusuna ait bitki türlerinin yüksek oranda alkaloid içerdiği bazı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Saito et al. 1988, Keeler vd. 1986). Ayrıca, Şener vd. (1992), *Thermopsis turcica*'nın yüksek anagyrene alkaloidi içerdiğini rapor etmiştir. Keeler vd., (1986) kurutulmuş *Thermopsis montana* Nutt. bitkisini yiyen ineklerin zehirlendiklerini hatta hasta hayvan sütlerinden insanlara bile geçtiğini bildirmiştir. *T. turcica* bitkisi de muhtemelen bu nedenle otlak hayvanları tarafından yenmemektedir. Buna ek olarak, *Thermopsis* genusunun bazı türleri Çin halk tıbbında kullanılmakta olduğu rapor edilmiş olsa da (Saito et al. 1989), *T. turcica* için bu tip bir tüketim söz konusu değildir.

Bu avantajların yanı sıra bitkinin tehlike altındaki durumunu daha kritik noktaya taşıyan bazı önemli hususlar da vardır. İklim ve toprak yapısının elverişli olması nedeni bu bölgede yoğun bir tarım yapılmaktadır ve son yıllarda Eber ve Akşehir Göl sularının yaklaşık 5 km ve daha fazla çekilmiş olması, bu bitkinin de doğal yaşamını devam ettirdiği habitatta tarla açma çabalarının hızla arttığı Tan vd. (2003) tarafından rapor edilmiştir. Bireysel gözlemlerimize göre, *T. turcica*'nın en fazla yayılış gösterdiği Akbaba 1&2, Kavaklı 1&2 popülasyonlarında sürülmüş tarlalarda çıkan genç *T. turcica* fideleri bu bitkiye karşı bilinçsiz olan yöre halkını daha sert tedbirler almaya itmektedir. Hal böyle iken bu savaşı insanoğlunun kazanacağını kestirmek çok zor görünmemektedir. Dolayısı ile bitki için en büyük tehdit unsurlarından birisi, yaşadığı alanın insan eli ile tahrip edilmesi olarak görülmektedir.

Bu en önemli tehdit unsurunun yanı sıra, Davis vd.'nin (1988) tanımladığı gibi *T. turcica* karpellerinin açılmaması ve bitki üzerinden düşmemesi nedeni ile tohumlar en az iki yıl bitki üzerinde kalmaktadırlar. *T. turcica*'nın en yoğun yayıldığı popülasyonlarda (Akbaba 1&2, Kavaklı 1&2) mevcut olan bir ya da iki yıllık karpellerin tamamına yakınında, muhtemelen böcek istilasından dolayı, sağlıklı tohumlara rastlanmamıştır. Karpellerin kapalı olması ve meyveler içerisindeki tohumların böcek larvalarınca yenmesi bitkinin çoğalmasında ve yayılmasında en önemli gereksinim olan tohumdan üremenin çok az veya hiç mümkün olmadığı fikrini akla getirmektedir. Bu durumda etkin çoğalma mekanizmasının rizomlar sayesinde olduğu düşünülmektedir. Bu da muhtemelen mevcut *T. turcica* popülasyonlarında oluşabilecek genetik varyasyonların önünü kapatmaktadır, çünkü mevcut bitkiler yalnızca klonlarını üretmektedir. Dolayısı ile uzun vadede habitatta meydana gelen değişimlere uyum sağlayabilecek yeni genotiplerin ortaya çıkması zorlaşabilir. Bu olguda bitkinin tehlike altında olma sebeplerinden biri olarak düşünülebilir. Keza başka çalışmalar da, bir türün genetik varyasyonun kaybının hem kısa hem uzun vadede çevresel ve demografik dalgalanmalara karşı o türün yaşamını sürdürme yeteneğini azaltacağını ve ortadan yok olmasına yol açabileceğini vurgulamaktadır (Ellstrand ve Elam 1993, Miligran et al. 1994).

Akbaba 1&2 ile Kavaklı 1&2 popülasyonlarında karpel içerisinde 2-3 tohumun bulunduğu ve renklerinin Davis vd.'nde (1988) tarif edildiği gibi mor renkli olduğu gözlenmiştir. Fakat bunlar hasarlı tohumlar olup karpel içinde tohum artıkları da mevcuttur. Eber Göl'ü kenarındaki 50'den az bitkiden elde ettiğimiz tohumlar ise oldukça sağlıklıdır ve karpellerin içerisinde 8'e kadar tohum bulunmaktadır. Ayrıca bunların renkleri açık kahverengidir ve böcekler tarafından zararlanmadıkları görülmüştür. Dolayısı ile literatürde geçen tohum sayı ve renklerinin Akşehir Göl'ü kıyısındaki bitkilerden tayin edildiği de hesaba katılırsa, böcek istilasının bu bitkinin teşhis edildiği günden bu yana mevcut olduğu düşünülebilir.

Nadir ve yabancı bitki türlerinde en sık rastlanan durumlardan biriside bu bitkilere ait tohumların çimlenme problemlerine yada çimlenme sonrası fide gelişimi problemlerine sahip olmalarıdır. Nadir bitkilerin tohumdan çoğaltılmasının sağlanması tür içi genetik varyasyon seviyesinin artmasına katkı sağlar. Ayrıca *in vitro* çoğaltımlarda steril fidelerin temini için yabancı bitki tohumlarının çimlenme isteklerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla, 50'den az bitki bulunduran Eber popülasyonundan elde edilen kısıtlı miktarda fakat sağlıklı tohumlarla *in vitro* çimlendirme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Asit muamelesi yapılan tüm gruplara başka herhangi bir sterilizasyon muamelesi yapılmamıştır ve denemelerde tohum kaynaklı hiçbir kontaminasyona rastlanmamıştır. Sterilizasyon işleminin doku kültürü çalışmalarındaki en önemli ve sorunlu basamak olduğunu göz önüne aldığımızda bu sonucun *T. turcica* tohumlarının sterilizasyonunda çok başarılı ve pratik olduğunu söyleyebiliriz.

Her hangi bir ön muameleye maruz bırakılmamış ya da sadece 8 hafta süreyle nemli stratifikasyon uygulanmış tohumların MS besin ortamındaki çimlenme oranı %10'u geçmemiştir. Bu sonuçlar, *T. turcica* tohumlarının derin bir çimlenme problemi olduğunu ve bu problemin ortadan kaldırılmasında yalnızca soğuk uygulamasının yeterli olmadığını bir göstergesidir. Nadir bitkilerin çimlenme problemleri olabileceği çoğu araştırmacı tarafından da rapor edilmiştir, örneğin 150 gün süre ile steril olmayan ortamda çimlendirmeye bırakılan *Physoplexis*

comosa tohumlarından hiçbirisinin çimlenmediği gözlenmiştir (Cerabolini et al. 2004). Kaye ve Kuykendall (2001) ise her hangi bir ön muamelenin uygulanmadığı Leguminosae familyasına ait *Lupinus sulphureus* Hook. ssp. *kincaidii* türü tohumlarından ancak %10'nun çimlendiğini belirtmiştir.

Stratifikasyon uygulanmış ya da uygulanmamış tohumların artan sürelerde sülfürik asitle muamelesi *T. turcica* tohumlarının çimlendirme oranlarını %90 ve üzerine çıkarmıştır, dolayısıyla sülfirik asit skarifikasyonunun *T. turcica* tohumlarının çimlenmesi üzerine çok kuvvetli bir etkisi olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, çimlenme için tohum kabuğunun sülfürik asit muamelesi ile zayıflatılması tohumların çimlenmesi için yeterli bulunmuştur ve *T. turcica* tohumlarının yalnızca tohum kabuğunun neden olduğu bir fiziksel dormansiye sahip olduğunu belirlenmiştir. Tetsuya ve Takahashi (2003) bu genusun bir diğer üyesi *Thermopsis lupinoides* (L.) Link. ile steril olmayan ortamda benzer çimlenme verilerini almışlar ve tohum kabuğu dormansisinin varlığını bildirmişlerdir. Derin bir dışsal dormansinin *Koelreuteria paniculata* (Laxm.) tohumları için rapor edildiği bir başka çalışmada (Rehman ve Park 2000) GA₃ ve ön soğutma muamelesine tutulmuş ya da tutulmamış *K. paniculata* tohumlarının skarifikasyon uygulanmadıkça çimlenmediğini bildirmiştir. Aksine, skarifikasyon yapılmış *T. turcica* tohumlarının çimlenmesi üzerine soğuk muamelesinin hiçbir etkisi olmamıştır.

Her hangi bir muamele uygulanmamış tohumlarda ortalama çimlenme süresi yaklaşık 7 gün iken, sülfürik asit skarifikasyona tabii *T. turcica* tohumlarının ortalama çimlenme süresi yaklaşık yarı süreye (3,8 gün) inmiştir. Chuanren et al. (2004) *Echinacea angustifolia* tohumlarına ait kabukların uzaklaştırılması ile birlikte ortalama çimlenme süresini üçte bir oranında kıstığını ve beraberinde skarifikasyon uygulamaları ile ortalama çimlenme süresinin minimuma indiğini belirtmiştir. Fakat *T. turcica*'nın *in vitro* ortamdaki ortalama çimlenme zamanı üzerinde stratifikasyon uygulamasının herhangi bir etkisi olmamıştır.

Sy et al'a (2001) göre mekanik skarifikasyon çoğu legüm familyası tohumlarının yüksek ve sağlıklı çimlenmesi için en iyi metot olarak ileri sürülmüş olsa da, *T. turcica* tohumlarının 90 dk. sülfürik asitle muamelesi ile *in vitro* ortamda yüksek çimlenme oranları elde edilmiştir. Buna ek olarak, bu sürede skarifikasyona maruz bırakılan tohumlardan elde edilen tüm fidecikler sağlıklı olmuşken, daha fazla sürede aside maruz kalmış tohumlardan oluşan fideciklerde %20 oranında hasarlı radikula/kotiledon gibi bazı anomalilikler gözlenmiştir. Dolayısıyla, fide gelişimini etkilemeyecek şekilde süresi iyi ayarlanmış sülfürik asit uygulamasının *T. turcica* tohumlarının çimlenmesi için oldukça başarılı bir metot olmuştur. Tüm bunlara ek olarak aynı çimlenme kabı içinde çimlenen tohum sayısı fazla olduğunda fideler muhtemelen besin rekabetine girmekte ve daha cılız kalmaktadır. Daha az tohumun çimlendiği kaplarda ise görece daha iyi fideler elde edilmiştir. Sonuç olarak tek kap içerisine konulan tohum sayısının az tutulması daha iyi gelişmiş fidelerin elde edilmesini sağlayabilir.

Yukarıda da vurgulandığı gibi tohumlardan çoğalmanın önemli olması ile birlikte az sayıda tohum bulunduran türlerde hızlı çoğaltımın yapılabilmesi için mevcut tüm teknolojilerin kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla hedef bitkimizin bitki doku kültürü teknikleri ile hızlı çoğaltımı üzerine çalışılmıştır. Mevcut bilgilerimize göre *Thermopsis* genusuna ait herhangi bir mikroçoğaltım çalışması yoktur, bu nedenle yaptığımız bu araştırmanın sonuçları bir ilk olma niteliği taşımaktadır.

Mikroçoğaltım için kullanılan eksplantların seçimi, verim açısından çok önemlidir ve türden türe değişik potansiyeller sergilemektedir. Totipotent özellik genç sürgünlerde daha fazladır (Babaoğlu vd. 2002). Olgun bitkiden alınan eksplantların, steril genç fidelerden alınan eksplantlardan daha zayıf ve geç kallus oluşturduğu ayrıca ölümlerin ve kahverengileşmenin daha çok olduğu Matkowski (2004) tarafından da rapor edilmiştir. Dolayısı ile bu çalışmada *in vitro* fideler kullanılmıştır ve bu fidelerle çalışmanın birçok yönden avantajlı olduğu söylenebilir.

In vitro koşullarda en uygun çimlenme prosedürünü belirledikten sonra, bu yöntemle elde edilmiş steril fidelerden sağlanan kotiledon, epikotil ve kök eksplantlarının kallus oluşturma potensiyelleri üzerine MS temel besi yerinde, NAA ve 2,4-D'nin etkisini araştırdık.

Başka türler ile yapılan mevcut çalışmalarda kallus başlatımı için değişik eksplant tipleri kullanılmış ve bunların bazılarında eksplant tipleri arasında fark bulunamamış iken bazılarında ise önemli farklılara rastlanmıştır. *Lycopersicon esculentum* ile yapılan bir çalışmada hipokotil parçaları ve yaprak diskleri eksplant olarak kullanılmıştır. NAA veya 2,4-D içeren MS besi yerinde hipokotil eksplantlarının daha iyi kallus oluşumu gösterdiği bildirilmiştir (Chaudary vd. 2001). Haque vd. (2003) *Allium sativum* ile yaptıkları çalışmada kök ucu, basal disk ve yaprak diski eksplantlarını 2,4-D içeren MS temel ortamında költüre almış ve bu eksplant tiplerinden elde edilen kallus oluşturma yüzdeleri arasında önemli bir fark gözlememiştir.

Bizim alışmamızda ise kotiledon (%77) ve epikotil eksplantlarının (%71) kallus oluşturma oranları arasında fark bulunmamış iken, kök eksplantlarının (%88) bu iki eksplant tipinden önemli seviyede fazla oranda kallus oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kök eksplantlarında kallus oluşumu birinci hafta itibari ile başlamış olup diğer eksplantlara göre daha hızlı bir oluşum göstermiştir. 2 mg/L NAA ve 2 mg/L 2,4-D içeren besi yerlerinde kök eksplantları %100 verimde kallus oluşumu sergilemiştir. 8 mg/L NAA içeren ortam haricinde kök eksplantlarının kallus verimi %80'in altına düşmemiştir. Bu sonuçlara göre *T. turcica*'nın 15 günlük steril fidelerinden alınan kök parçalarının verimli ve hızlı kallus eldesi için kotiledon ve epikotil eksplantlarına oranla daha iyi olduğu söylenebilir.

Bizim bulgularımıza ilaveten *in vitro* fidelerden elde edilen kök parçalarının diğer eksplantlara göre bazı avantajlara sahip olduğu rapor edilmiştir. Bunlar, kolay elde edilebilirlik, canlılık ve oksidasyona sebep olan sekonder metabolitlerden yoksun olmaları olarak özetlenebilir (Bhau 1999). Kullanılan eksplantlarda çok

fazla kahverengileşme sorununa rastlanmaması PVP kullanımıyla ilgili olabilir. Yinede epikotil ve kotiledon eksplantların kesim yüzeylerinde kısmen kahverengileşmeler oluşmuş iken kök eksplantlarında böyle bir durumla karşılaşmamıştır. Bunda yukarıda söylenildiği kök eksplantlarının oksidasyona sebep olan bileşiklerden yoksun olması rol oynamış olabilir.

Kullanılan oksin tiplerinin (2,4-D ve NAA) kallus oluşturma oranları üzerinde herhangi farklı bir etkisi bulunmamışken, kültürün 6. haftasında yaş ağırlıklar karşılaştırıldığında NAA içeren MS ortamındaki kallusların ağırlıkları 2,4-D içeren ortamdaki elde edilen kalluslardan yaklaşık iki misli daha fazladır. Buda *T. turcica*'da kallus biyo-kütle artışı için NAA hormonunun daha etkili olduğunu göstermektedir. *Lycopersicon esculentum* ile yapılan bir çalışmada da NAA+BAP hormonlarının 2,4-D hormonuna göre yaş ağırlıklar üzerinde (Yaklaşık iki misli) daha iyi olduğu vurgulanmıştır (Chaudary 2001). Ayrıca ileride tartışılacağı gibi 2,4-D bulunan ortamlardaki bu zayıf kallusların elde edilme sebebinin 2,4-D'nin inhibe edici özelliği olduğu düşünülebilir.

Tüm bu bulgular ve yorumlar ışığı altında, 15 günlük *in vitro* *T. turcica* fidelerinden alınan 1 cm uzunluğundaki kök eksplantlarının 2 mg/L NAA içeren MS ortamında kültüre alınması verimli, hızlı ve sağlıklı kallus başlatımı için ideal bulunmuştur.

Sitokinin ve oksinler hücre bölünmesini başlatmada birbiri ile etkili iki bitki büyüme düzenleyicisi olarak bilinmektedir. Ayrıca bu iki tip bitki hormonu, organize meristemlerin başlamasında da etkili olmaktadır. Böylece, oksin ve sitokinin oranları değiştirilirse, meristem yapısının biçimi değişmektedir. Oksinin sitokinine oranı görece yüksek ise, bazı kallus hücreleri kök primordiasına dönüşmektedir. Sitokininin oksine göre yüksek konsantrasyonu ise hücrelerin sürgün apikal meristemine dönüşmesine sebep olmaktadır. Böylece, oksin sitokinin oranındaki küçük değişimler, meristemi başlatabilir ve bunların sürgün veya kök uç meristemlerine dönüşmesine yol açabilir (Wareing ve Phillips 1981).

Genel olarak ortamda yalnızca oksinin bulunmasının kalluslardan kök oluşmasını uyardığı bilinmekle beraber (Kocaçalışkan, 2002), bazı durumlarda bazı oksin tiplerinin kök oluşumunu inhibe ettiği de rapor edilmiştir (Saito vd. 1989). Bizim çalışmamızda kallus oluşumu için kullanılan ortamlardan NAA içerenlerde adventif kök oluşumları gözlenmişken 2,4-D içeren ortamlarda ise hiçbir kök oluşumu gözlenmemiştir. Bu durumdan yola çıkarak Saito vd. (1989)'lerinin *T. lupinoides* için belirttiği gibi 2,4-D'nin adventif kök oluşumunu inhibe ettiğini söyleyebiliriz. Buna karşın NAA bulunan ortamlarda adventif kök oluşumları başka çalışmalarda da rapor edilmiştir (Singh ve Chand 2003).

Yine NAA bulunan ortamlarda adventif sürgün oluşumları gözlenmiş ve 2,4-D bulunan ortamların ise adventif sürgün oluşturmadığı tespit edilmiştir. Önceki çalışmalar dikkate alındığında genel kanı oksin bulunan ortamlarda kök primordiumlarının oluşumu gözlenir fakat sürgün primordiumlarının oluşması için sitokinin gereklidir. NAA bulunan ortamlarda sürgün oluşumları literatür bilgileriyle çelişmektedir ve bu durumun eksplantların içsel hormon miktarlarından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Kallus başlatımı aşamasında elde edilen kalluslar, oksin konsantrasyonuna ve hangi eksplant tipinden oluştuğu dikkate alınmadan sadece hangi oksin tipinde oluştuğu göz önüne alınarak BA ve K hormonlarının bulunduğu ortamlara alınmıştır. 6. hafta sonunda 2,4-D kökenli kalluslarda hiçbir rejenerasyon gözlenmemiştir. 2,4-D'nin inhibe edici etkisinin bu ortamlarda da devam etmesi ve sürgün oluşumunu engellemesi bunun nedeni olarak düşünülebilir. Akman ve Darıcı (1998), 2,4-D gibi sentetik oksinlerin dokularda doğal oksinler gibi kolayca parçalanamadığını ve birikerek toksik etki yaptığını bildirmişlerdir. Ayrıca otsu bitkilerde P450 monooksijenazlarca metabolize edilebilen bu tip oksinlerin dikotillerde metabolize olmadığı veya çok az ve yavaş metabolize olduğu bildirilmiştir (Srivastava 2002).

NAA kökenli kalluslarda ise rejenerasyon yüzdesi en fazla 0,5 mg/L kinetin bulunan ortamda gözlenmiştir (%46,6). Mirici vd. (2005) mikroçoğaltım

protokollerinde çoklu sürgünlerin elde edildiği aşamanın en önemli aşama olduğunu söylemişlerdir. Çünkü hızlı bir çoğaltımın sağlanabilmesi ve kısa zamanda çok bitki elde edebilmek, tehlike altında ki türlerde doku kültürü tekniklerinin avantajlı şekilde kullanılmasının en önemli ayağı olarak görülmelidir. Bu bağlamda yüksek rejenerasyon frekansı elde etmek başarı için elzemdir. 0,5 mg/L kinetin bulunan ortamlarda kültüre edilen kallusların yaklaşık yarısında rejenerasyon gözlenmesi çok yüksek bir başarı olarak görülmeyebilir. Çünkü, kallustan rejenerasyon çalışmaları dikkate alındığında %100'e varan rejenerasyonun elde edildiği raporlar vardır (Al-Juboory vd. 1998). Bunun yanında BAP ve kinetin içeren ortamlara alınan tehlike altındaki *Hemidesmus indicus* kallusları BAP bulunan ortamlarda hiç rejenerasyon göstermezken 2,5 mg/L kinetin bulunan ortamda %47 oranında rejenerasyon göstermektedir (Siddique vd. 2003). Siddique vd. (2004) bir başka tehlike altındaki bitkinin çoğaltımı sırasında BAP ve kinetinin bulunduğu MS ortama alınan *Withania somnifera* kalluslarının kinetine cevap vermediğini fakat BAP bulunan ortamda maksimum %50'lik bir rejenerasyon elde ettiğini rapor etmişlerdir. BAP ve kinetinin beraber kullanılması sonucu ise bu oran %80'lere kadar çıkmıştır. Tüm bunlar bir araya getirilirse, elde ettiğimiz rejenerasyon yüzdesinin -ileriki çalışmalarda artırılması ihtimalide göz önünde bulundurularak- iyi bir sonuç olduğunu söyleyebiliriz. Görüldüğü üzere değişik türlerde değişik hormonlar farklı cevaplar oluşturmaktadır. Bu değişik tepkilerin sebebi bitki türlerinin hormon metabolizmalarındaki ve eksplantların endojen hormon miktarlarındaki farklılıklardan kaynaklanabilmektedir.

Kallus başına en fazla sürgün (4,4) 2 mg/L BA içeren MS ortamında elde edilmiştir. Daha düşük miktarlarda ise bu oran düşük kalmıştır. Öte yandan Kinetin içeren ortamlarda ise en fazla sürgün (2,2) 0.5 mg/L'de elde edilmiş ve konsantrasyon arttıkça bu sayı düşmüştür. Begum et al. 2003 *Citrus grandis* ile yaptıkları çalışmada elde ettikleri kallusları BA içeren ortama koyduklarında düşük konsantrasyonda (0,5 mg/L) az sayıda sürgün (2) elde etmişler fakat 1 mg/L BA'de bu sayı 5,5 sürgüne kadar çıkmıştır. Dolayısı ile BA konsantrasyonunun bir noktaya kadar artması sürgün sayısını arttırmaktadır. Bu

sonuç bizim bulgularımızla da örtüşmektedir. Aynı çalışmada kallus başına elde edilen sürgün sayılarına bakıldığında BA'nın K'e göre daha etkili olduğu görülmektedir. Ortalama sürgün boylarını da dikkate aldığımızda en uzun fideler 2mg/L BA ve 0,5 mg/L K içeren ortamlarda meydana gelmiştir ve bunlar arasında önemli bir fark bulunamamıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada kalluslardan etkin bir sürgün oluşumu için 2 mg/L BA içeren ortamın en uygun ortam olduğu tespit edilmiştir.

Mikroçoğaltımın bir diğer önemli aşaması ise elde edilen fidelerin köklendirme aşamasıdır. Bu çalışmada iki farklı oksin (IBA ve NAA) köklendirme için kullanılmıştır. Ayrıca bir de hormonsuz MS ortamı da kullanılmıştır. Bu ortamların hepsinde MS tuzları yarım güçte kullanılmıştır. Bunun iyi bir köklenme için daha uygun olduğu bilinmektedir (Chahal ve Gosal 2002). Böyle ½ MS kullanılan bir çalışmada *Tylophora indica* sürgünleri hormonsuz ortama konulduklarında %75 oranında köklenmişlerdir ve bu durum içsel oksin miktarlarının yüksek olma ihtimaline bağlanmıştır (Faisal ve Anis 2003). Bizim çalışmamızda ise hormonsuz ortama aktarılan sürgünlerin hiçbirinde köklenme görülmemiştir. Bu doğrultuda bakıldığında *T. turcica* fidelerinin içsel oksin seviyesinin çok düşük olduğu akla gelmektedir.

1 mg/L NAA veya IBA ile desteklenmiş ortamlarda ise çimlenme yüzdeleri sırasıyla %70 ve %40 olarak bulunmuştur. Yine NAA bulunan ortamdaki fide başına ortalama kök sayısı 8 iken IBA bulunan ortamda ise bu 4 olarak tespit edilmiştir. Görünen odur ki, NAA kök primordialarının oluşumlarının başlamasında ve kök sayısında IBA'ya göre daha etkilidir. Bu durum Panaia vd. (2000) tarafından da bildirilmiştir. Aynı çalışmada, IBA'nın kök oluşumunda değilse bile kök gelişimi ve uzamasında NAA'den daha etkili olduğu bildirilmiştir. Bu durum bizim çalışmamızda IBA içeren ortamdaki köklerin NAA içeren ortamla karşılaştırıldığında neden daha uzun olduğunu da açıklamaktadır.

Sonuç olarak, 1 mg/L NAA içeren ortamın köklenme için uygun ortam olduğu tespit edilmiştir. Ancak elde edilen kök boylarının kısa olması, ileriki çalışmalarda daha düşük NAA oranları ile daha başarılı sonuçların alınabilmesi durumunu ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca Chahal ve Gosal (2002) bu oksinlerin esasen kök başlangıcının uyarımı için gerekli olduğunu, dolayısı ile bir hafta gibi bir süre oksin içeren ortamlarda tutulan sürgünlerin daha sonra hormonsuz ortama alınmalarının daha iyi gelişmiş ve uzamış köklerin elde edilmesine yardımcı olacağını bildirmiştir. Buda etkili bir köklenme için göz önünde bulundurulması gereken bir etmendir.

Köklenen bitkiler dış ortama şaşırtılmış ve böylece tam bir mikroçoğaltım prosedürü oluşturulmuştur. Sonuç olarak doku kültürü tekniklerinin kullanılması ile *T. turcica*'nın az sayıda tohumdan çok kısa sürede ve çok fazla miktarda çoğaltılması mümkün görünmektedir.

Türü yakın gelecekte yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kalmış olan *T. turcica*'nin yayılış gösterdiği alanlarda yöre halkı bu bitkiye karşı bilinçlendirilerek tarla açma çalışmalarına derhal son verilmeli ve popülasyonların bulunduğu alanlar korumaya alınmalıdır. Her ne kadar bölge Tan vd. (2003) tarafından potansiyel önemli bitki alanı olarak belirlenmiş olsa da bu alanın yönetim planının bulunmamasından dolayı etkili bir sonucun alınamadığı gözlenmiştir.

Bu bitki meyvelerini muhtemelen larva gelişimi için kullanılan böcek tür veya türlerinin tespit edilmesi ve tohumların sağlıklı olarak gelişmesinin yollarının aranması gerekmektedir. Ayrıca bu böcek tür veya türlerinin yalnızca bu bitki üzerinde yaşayabilir olma ihtimali (dolayısı ile endemik olma ihtimali) de unutulmamalıdır.

Sonuç olarak bu çalışmanın bundan sonra bu tür ile yapılacak olan koruma çalışmalarına bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Kısaca bu çalışmada elde edilen bulgular ve bu türün korunmasında hangi açıdan önem arz ettiğine

değinirsek; doğal popölasyonlardaki tohumların büyük miktarının parazitlerce zararlandırıldığı ve bu durumun bitkinin tohumdan üremesini son derece kısıtladığı tespit edilmiştir. Bunun yanında tohumlarda tohum kabuğunun neden olduğu fiziksel bir dormansisin varlığı tespit edilmiş ve asit muamelesi ile bunun aşılabileceği gösterilmiştir. Bu sayede bitkinin tohumdan çoğaltılması çalışmalarına ışık tutacağı düşünölmektedir. Son olarak da mikroçoğaltım prosedürü sayesinde kısa zamanda çok sayıda bitki eldesi ile az sayıda sağlıklı tohum bulunduran bu bitkinin çoğaltımına katkı sağlayacağı düşünölmektedir. Çoğaltımın kallus kültürleri yolu ile yapılmasının sonucu bu yolla elde edilecek kallusların kriyoprezervasyon yoluyla uzun süreli muhafazası çalışmalarına da katkıda bulunacağı umulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Akman, Y., Darıcı, C., 1998 “Bitki Fizyolojisi (Beslenme ve Gelişme Fizyolojisi)” Ankara.
- Al-Juboory, K., H., Skirvin, R., M., Williams, D., J., 1998 “Callus induction and adventitious shoot regeneration of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) leaf explants” *Scientia Horticulturae* 72: 171–178.
- Anand, A., Rao, C. S., Balakrishna, P., 1999 “*In vitro* propagation of *Syzygium travancoricum* Gamble – an endangered tree species” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 59–63.
- Baba, B., 1995 “Ekonomik Öneme Sahip Endemiklerin doku Kültürü Teknikleri İle Çoğaltılması” Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S., 2002 “Bitki Biyoteknolojisi I: Doku Kültürü ve Uygulamaları” II. Baskı, Selçuk Üniversitesi Basımevi, KONYA.
- Begum, F. Amin, M.N. Islam, S. Azad M.A.K. and Rehman M.M., 2003 “*In vitro* plant regeneration from cotyledon-derived callus of three varieties Pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osb.)” *On Line Journal of Biological Sciences* 3 (8): 751-759.
- Benson., E., E., (Editor). 1999 “Plant Conservation Biotechnology” . Chapter 15 (V., C., Pence), London, UK: CRC Press, S:227-242.
- Bhau, B., S., (1999) “Regeneration of *Coryphantha elephantidens* (Lem.)Lem. (Cactaceae) from root explants” *Scientia Horticulturae* 81: 337-344.
- Cerabolini, B., Andreis, R.D., Ceriani, R. M., Pierce, S., Raimondi, B., 2004 “Seed germination and conservation of endangered species from the Italian Alps: *Physoplexis comosa* and *Primula glaucescens*” *Biological Conservation* 117: 351-356.
- Chahal, G.,S., Gosal, S.,S., 2002 “Principles and procedures of plant breeding (Biotechnological and Conventional Approaches)” Alpha Science Internationel Ltd. U.K.
- Chaudary, Z., Feroz, I., Ahmed, W., Rashid, H., Mirza B., Quraishi A., 2001 “Varietal response of *Lycopersicon esculentum* L. to callogenesis and regeneration” *OnLine Journal of Biological Sciences* 1 (12): 1138-1140.
- Chuanren, D., Bochu, W., Wanqian, L., Jing, C., Jie, L., Huan, Z., 2004 “Effect of chemical and physical factors to improve the germination rate of *Echinacea*

- angustifolia* seeds” Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol:37, pp: 101-105.
- Çalmaz, Y.,E., 2003 “ Gladiolus anatolicus (Boiss.) Stapf’un mikroçoğaltımı üzerine araştırmalar” Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, AYDIN.
- Çöçü, S., Erişen, S., Duran A., Hamzaoğlu, E., Gürlek, D., Parmaksız İ., Mirici, S., 2005 “Lokal Endemik *Astragalus duranii* Türünün *in vitro* Hızlı Çoğaltımı” XIV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 31 Ağustos- 2 Eylül 2005, ESKİŞEHİR.
- Davis, P.H. (eds),1982, “Flora of Turkey and the East Aegean Islands” Volume: 8, Edinburgh University Press. EDINBURGH.
- Davis, P.H., Mill. R.R., Kıt Tan, 1988 “Flora of Turkey and the East Aegean Islands” Volume 10, Edinburgh University Pres, EDINBURGH.
- Debergh PC, Read PE, 1993 Mikropropagation. In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds), Micropropagation- Technology and Application., pp. 1-15, Kluwer Academic publishers, Dordrecht, HOLLAND.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N., (2000). *Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı*. Ankara: TTKD ve Van 100. Yıl Üniversitesi Yayını, VAN.
- Ellstrand, E.,J., Elam, D.,R., 1993,” Population genetic consequences of small population size: implication for plant conservation” Annual Reiwiew of Ecology and Systematics, 24: 217-242.
- Erdağ, B., B., Yürekli A., K., 2000 “*Thymus sipyleus* Boiss. (Lamiaceae)’un *in vitro* çoğaltılması” Turkish Journal of Biology, 24: 81-86.
- Faisal, M., Anis, M., 2003 “Rapid mass propagation of *Tylophora indica* Merrill via leaf callus culture” Plant Cell, Tissue and Organ Culture 75: 125-129.
- Güner, N., Özhatay, T., Ekim, K. H. C. Başer, 2000 “*Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (Supplement 2)” Vol. 11, University Press, EDINBURGH.
- Haque, M., A., Nath, U.,K., Ahmad Q.,N., Alam, S., 2003 “Effect of 2, 4-D and BAP on *in vitro* regeneration of garlic” On Line Journal of Biological Sciences 2 (12): 771-774.
- Jordan, M., Larrain, M., Tapia, A., Roveraro, C., 2001 “*In vitro* regeneration of *Sophora toromiro* from seedling explants” Plant Cell, Tissue and Organ Culture 66: 89–95.

- Kaye, T.N, and Kuykendall, K., 2001a "Germination And Propagation Techniques For Restoring Rare Pacific Northwest Prairie Plants" Conservation of Washington's Native Plants and Ecosystems. Edited by S.H. Reichard, P.W. Dunwiddie, J.G. Gamon, A.R. Kruckeberg, and D.L. Salstrom.. Washington Native Plant Society, Seattle, Washington.
- Kaye, T.N, and Kuykendall, K., 2001b "Effects of scarification and cold stratification on seed germination of *Lupinus sulphureus* ssp. *kincaidii*" Seed Sci. & Technol., 29, 663-668.
- Keeller, R. F., and Baker, D. C., 1990 "Myopathy in cattle induced by alkaloid extracts from *Thermopsis montana*, *Laburnum anagyroides* and a *Lupinus* sp. J. Comp. Path. Vol:103 p:169-182.
- Keeller, R.,F., Johnson, A.,E., Chase, R.,L., 1986, "Toxicity of *Thermopsis montana* in cattle. Cornell Vet., 76:115-127.
- Kit, T., Vural, M., Küçüködük, M., 1983 "An unusual new *Thermopsis* from Turkey. Notes RBG Edinb., 40(3):515:518.
- Kocaçalışkan, İ., 2002 "Bitki Kültürleri (Organ, Doku ve Hücre)" Kütahya.
- Liao, Z., Chen, M., Tan, F., Sun, X., Tang, K., 2004 "Micropropagation of endangered chinese aloe" Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 76: s.83-86.
- Matkowski, A., 2004 "*In vitro* isoflavonoid production in callus from different organs of *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi" Journal of Plant Physiology 161: 343–346.
- Miligran, B., G., Leebens-Mack, J., Strand, A., E., 1994 "Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity, Molecular Ecology, 3:423-435.
- Mirici, S., Parmaksız, İ., Özcan, S., Sancak, C., Uranbey, S., Sarıhan, E., O., Gümüşçü, A., Gürbüz, B., Arslan, N., 2005 "Efficient *in vitro* bulblet regeneration from immature embryos of endangered *Sternbergia fischeriana*" Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80: 239-246.
- Murashige,T., Skoog,F.A., (1962) "A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay With Tobacco Tissue Cultures" Physiol. Plant., 15: 473-479.
- Normah, M. N., Hamidah S., Ghani F.D., 1997 "Micropropagation of *Citrus halimii* – an endangered species of South-east Asia" Plant Cell, Tissue and Organ Culture 50: 225–227.
- Ohmiya, S., Otomasu, H., Haginiwa, J., Murakoshi, I., 1984 "Alkaloids of *Thermopsis Lupinoides*" Phytochemistry, Vol. 23, No. 11, s. 2665-2667.

- Ohmiya, S., Otomasu, H., Murakoshi, I., Haginiwa, J., 1974 “N-Formylcytisine: A new alkaloid from *Thermopsis chinensis*” *Phytochemistry* Vol: 13, pp:643-644.
- Özel, Ç.,A., 2002 “*Centaurea tchihatceffii*’nin *in vitro* çoğaltımı” Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Panaia, M. Senaratna, T. Bunn, E. Dixon, K.W., Sivasithamparam, K., 2000 “Micropropagation of the critically endangered western australian species, *Symonanthus bancroftii* (F. Muell.) L. Haegi (Solanaceae)” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 23–29.
- Parmaksız İ., Çöçü, S., Uranbey, S., Mirici, S., Özcan, S., Sancak, C., Sarıhan, E., O., İpek, A., Kaya, M., D., Arslan., N., 2005 “Tehlike altındaki endemik *Muscari muscarimi* türünde olgunlaşmamış embriyolardan *in vitro* hızlı soğancık üretimi” XIV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 31 Ağustos- 2 Eylül 2005, Eskişehir.
- Rehman, S., Park, I.H., 2000 “Effect of scarification, GA and chilling on the germination of goldenrain-tree (*Koelreuteria paniculata* Laxm.) seeds” *Scientia Horticulturae* Vol:85 p: 319-324.
- Reinert, J., Yeoman, M., M., 1982 ”Plant Cell and Tissue Culture (A Laboratory Manual)” Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York.
- Saito, K., Takamatsu, S., Ohmiya, S., Otomasu, H., Yasuda, M., Kano, Y., Murakoshi, I., 1988 “Lupin alkaloids from the seeds of *Thermopsis lupinoides*” *Phytochemistry*, Vol: 27 No:11, pp:3715-3716.
- Saito, K., Yamazaki, M., Takamatsu, S., Kawaguchi, A., Murakoshi, I., 1989 “Greening Induced Production Of (+)-Lupanine In Tissue Culture of *Thermopsis lupinoides*” *Phytochemistry*, Vol. 28, No. 9, s. 2341-2344.
- Salisbury, F. B., Ross, C. W., 1992 “Plant Physiology” 4th Edition, Wadsworth Publishing Company, Belmont, California. s: 451-497.
- Schemske, D., W., Husband, B., C., Ruckelshaus, M., H., Goodwillie C., Parker, I., M., Bishop, J., G., 1994 “Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants” *Ecology* 75:3, 584-606.
- Siddique, N.A. Bari, M.A. Khatun, N. Rahman, M. Rahman M.H. and Huda S. 2003 “Plant regeneration from nodal segments derived callus in *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br (*Anantamul*) an endangered medicinal plant in Bangladesh” *Journal of Biological Sciences* 3 (12): 1158-1163.
- Siddique, N.A. Bari, M.A. Shahnewaz, S., Rahman, M.H. Hasan, M.R. Khan M.S.I. and Islam M.S. 2004 “Plant regeneration of *Withania somnifera* (L.) dunal (Ashwagandha) from nodal segments derived callus an endangered

- medicinal plant in Bangladesh” Journal of Biological Sciences 4 (2): 219-223.
- Sinan, B., 2002 “*Thermopsis turcica* Kit Tan, Vural & Küçüköyük (Fabaceae)’nın morfolojisi, anatomisi ve ekolojisi” Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Singh, A., K., Chand, S., 2003 “Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon explants of a timber-yielding leguminous tree, *Dalbergia sissoo* Roxb” Journal of Plant Physiology 160: 415–421.
- Srivastava, L., M., 2002 “Plant Growth and Development (Hormones and Environment)” Academic Press, USA.
- Sy, A., Grouzis, M., Danthu, P., 2001 “Seed germination of seven sahelian legume species” Journal of Arid Environments, 49: 875-882.
- Şehirli, S., Özgen, M., Karagöz, A., Sürek, M., Adak, S., Güvenç İ., Tan, A., Burak, M., Kaymak, H., Ç., 2005 “Bitki Genetik Kaynaklarının Korunma Ve Kullanımı” <http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/6tk05/014sezensehirli.pdf>
- Şener B., Koyuncu M., Ergun F., 1992, “*Thermopsis turcica* bitkisinde anagirin’inin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile tayini” 9. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler (Ed. K. H. C. Başer), s. 411, Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir.
- Tan, A., Duman, H., Niksarlı İnal, F., İnal, A., Karagöz, A., 2003 “Tehlike Altındaki Türlerin Ekosistemlerinde Muhafazası Ve Yönetimi Projesi”, Proje No: 99/TR/065, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, İZMİR.
- Tetsuya, K. and Takahashi, K. 2003 “Breaking of physical dormancy and germination ecology for seeds of *Thermopsis lupinoides* Link.” J. Jpn. Soc. Regevet. Tech. Vol: 30(1) p:163-168.
- Ural, A., Kılıç, İ., 2005 “Bilimsel Araştırma Süreci ve SPSS ile Veri Analizi” Detay Yayıncılık, Ankara.
- Wareing, P., F. & Phillips, I., D., J., 1981 “Growth & differentiation in plants” 3rd Edition, Pergamon Press, Great Britain.
- Wochok Z., S., 1981 “the role of tissue culture in preserving threatened and endangered plant species” Biological Conservation 20: 83-89.

TEŐEKKÖR

Öncelikle bu çalıőmayı destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Komisyonu'na ve özellikle arazi çalışmalarında benden desteklerini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa KARGIOĞLU'na teőekkÖrü bir borç bilirim. Ardından, çalıőmalarım sırasında karőtılaőtıđım zorluklara kendi problemi gibi eğilen, maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen, bazen bir baba bazen bir dost gibi bana yol gÖsteren sevgili hocam ve danıőmanım Sayın Yrd. Doç. Dr SÖleyman CENKCI'ye canı gÖnÖlden Őükranlarımı sunarım.

BÖyle bir çalışmanın ortaya çıkmasındaki en bÖyÖk destekçilerim ise sevgili annem Zekiye DAYAN ve sevgili babam Fethi DAYAN'dır. Emeğinizin, dualarınızın, sabrınızın ve bana olan inancınızın karőtılıđını bir miktar da olsa ÖdeyebilmiŐ olmayı umarak size sevgi ve saygılarımı sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Keşan'ın Kılıçköy'ünde doğmuş, 1992'de ilkokulu burada bitirmiştir. 1995'te Keşan Cumhuriyet Orta Okulu'nu, 1999'da Keşan Yusuf Çapraz Lisesi'ni bitirmiştir. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünü 2003'te bitirmiş ve 2006 yılında bu tez ile de Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını tamamlamıştır.