T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

KRİTİK ENDEMİK *CENTAUREA AMAENA*'NIN DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMLERİYLE HIZLI ÇOĞALTIMI

Hazırlayan
ÖZGE EKİNCİ

Danışman
Doç. Dr. Satı UZUN

Yüksek Lisans Tezi

Eylül 2019
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

KRİTİK ENDEMİK *CENTAUREA AMAENA*'NIN DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMLERİYLE HIZLI ÇOĞALTIMI

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Özge EKİNCİ

Danışman
Doç. Dr. Satı UZUN

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FYL-2016-6308 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Eylül 2019
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Özge EKİNCİ



YÖNERGEYE UYGUNLUK

"Kritik Endemik *Centaurea amaena*'nın Doku Kültürü Yöntemleriyle Hızlı Çoğaltımı" adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi' ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan
Özge EKİNCİ
İmza

Danışman
Doç. Dr. Satı UZUN
İmza

Tarla Bitkileri ABD Başkanı

Doç. Dr. Satı UZUN

Doç. Dr. Satı UZUN danışmanlığında **Özge EKİNCİ** tarafından hazırlanan **"Kritik Endemik *Centaurea amaena*'nın Doku Kültürü Yöntemleriyle Hızlı Çoğaltımı"** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Tarla Bitkileri** Anabilim Dalında **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

20/ 09/ 2019

JÜRİ:

Danışman : Doç. Dr. Satı UZUN .....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ramazan BEYAZ .....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Hamdi ÖZAKTAN .....

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 03/10/2019 tarih ve 2019/52-12 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

T.C. ERCİYES ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ 1223

...08./...10./2019...

Prof. Dr. Mehmet AKKURT

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı sürdürdüğüm süre boyunca engin bilgi ve tecrübeleriyle yoluma ışık tutan, sabrı ve anlayışıyla desteklerini bir an olsun esirgemeyen ve akademik kariyerim ile ilgili koyduğum hedeflere ulaşmam hususunda bana inanıp teşvik eden ve gerek özel hayatı gerek akademik başarılarıyla bana mükemmel bir örnek olan sayın hocam Doç. Dr. Satı UZUN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalarımı yürüttüğüm süreç içerisinde tüm sorularımı sabırla cevaplayan sayın hocam Dr. Bayram ATASAGUN'a ve laboratuvar çalışmalarım boyunca karşılaştığım tüm zorlukları aşmamda bana yardım eden sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Hamdi ÖZAKTAN'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasına maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: FYL-2016-6308) teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca; aldığım tüm kararlarda her an yanımda olan, çıktığım bu yolda bana inanarak maddi manevi desteklerini üzerimden bir an olsun esirgemeyen en değerli varlığım aileme şükranlarımı sunarım.

Özge EKİNCİ

Eylül 2019, KAYSERİ

KRİTİK ENDEMİK *CENTAUREA AMAENA*'NIN DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMLERİYLE HIZLI ÇOĞALTIMI

Özge EKİNCİ

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Eylül 2019
Danışman: Doç. Dr. Satı UZUN

ÖZET

Bu çalışmada kritik endemik *Centaurea amaena* Boiss & Balansa'nın *in vitro* koşullarda hızlı çoğaltım potansiyeli araştırılmıştır. Tohumlar %3 sukroz içeren %0.7 agar ile katılaştırılmış Murashige ve Skoog (MS) besin ortamında çimlendirilmiştir. Oluşan fidelerin kotiledon, yaprak ve kotiledon boğumları farklı konsantrasyonlarda 6-benzilaminopurine (BAP; 1-4 mg/L), Thidiazuron (TDZ;0.3-1.2 mg/L) ve *meta*-Topolin (*m*T; 0.5-4 mg/L) sitokininlerini veya bunların 0.5 mg/L α-naftelenasetik asit (NAA) ile kombinasyonları içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Araştırma sonucunda kotiledon ve yaprak eksplantlarında TDZ konsantrasyonları veya bunların NAA ile kombinasyonlarında sadece kallus oluşumu gözlenmiştir. Kotiledon ve yaprak eksplantlarında sırasıyla en yüksek eksplant başına sürgün sayısı sırasıyla 4.152 ve 4.132 adet ile 1 mg/L ve 4 mg/L *m*T içeren MS besin ortamlarında saptanmıştır. Aksiller sürgün rejenerasyonu amacıyla yürütülen çalışmada ise en yüksek eksplant başına sürgün sayısı 4 mg/L *m*T içeren MS besin ortamında 9.975 adet olarak tespit edilmiştir. Çalışmada gelişen sürgünler, 2.0 mg/L indole-3-bütirik asit (IBA) içeren yarım MS besin ortamında %50.00 frekans ile köklendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Centaurea amaena* Boiss & Balansa, *in vitro* rejenerasyon, oksin, sitokinin.

IN VITRO MICROPROPAGATION OF CRITICALLY ENDANGERED AND ENDEMIC _CENTAUREA AMAENA_ BY TISSUE CULTURE

Özge EKİNCİ

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master Thesis, September 2019

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Satı UZUN

ABSTRACT

In this study, the rapid propagation of critically endangered and endemic *Centaurea amaena* Boiss. & Balansa was investigated under *in vitro* conditions. The seeds were germinated in Murashige and Skoog (MS) medium containing 3% sucrose and 0.7% agar. The cotyledons, leaves, and cotyledon nodes of growing seedlings were cultured in MS media containing different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP; 1-4 mg/L), Thidiazuron (TDZ;0.3-1.2 mg/L) and *meta*-Topoline (*m*T;0.5-4 mg/L) *m*T cytokinins alone or with 0.5 mg/L α-naphtaleneacetic acid (NAA) combinations. Only callus formation was observed from cotyledon and leaf explants in TDZ concentrations or combinations with NAA. The greatest number of shoots per explant was obtained from 1 mg/L *m*T and 4 mg/L *m*T containing media with 4.152 and 4.132 respectively in cotyledon and leaf explants. In the experiments for axillary shoot regeneration from cotyledon node explants, the greatest number of shoots per explant (9.975) was observed in MS medium supplemented with 4 mg/L *m*T. About 50.00% rooting was achieved in a half MS medium containing 2.0 mg/L indole-3-butyric acid (IBA).

Keywords: *Centaurea amaena* Boiss & Balansa, *in vitro* regeneration, auxin, cytokinin.

İÇİNDEKİLER

KRİTİK ENDEMİK *CENTAUREA AMAENA*'NIN DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMLERİYLE HIZLI ÇOĞALTIMI

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....i

YÖNERGEYE UYGUNLUK.....ii

YÖNERGEYE UYGUNLUK.....ii

KABUL VE ONAY.....iii

TEŞEKKÜR.....iv

ÖZET.....v

ABSTRACT.....vi

İÇİNDEKİLER.....vii

KISALTMALAR.....ix

TABLOLAR LİSTESİ.....x

ŞEKİLLER LİSTESİ.....xi

GİRİŞ.....1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Literatür Çalışması.....3

2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

2.1. Bitki Materyali.....10

2.2. Çalışmada Kullanılan Besin Ortamları ve Bitki Büyüme Düzenleyiciler.....10

2.3. Genel Doku Kültürü Şartları.....10

2.4. Aken Sterilizasyonu.....12

2.5. *In vitro* Kültürlerin Oluşturulması 13
2.6. Köklendirme.....13
2.7.Verilerin Değerlendirilmesi 13

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Kotiledon ve Yaprak Eksplantlarında Adventif Sürgün Rejenerasyonu 15
3.2. Kotiledon Boğum Eksplantlarında Sürgün Rejenerasyonu 21
3. 3. Köklendirme.....24

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1.Tartışma.....27
4.2. Sonuç ve Öneriler.....30

KAYNAKÇA 31
ÖZGEÇMİŞ.....36

KISALTMALAR

Simge	Açıklama
µM	Mikro metre
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid/ 2,4-Diklorofenoksiasetik asit
BAP	6-Benzylaminopurine / 6-Benzilaminopurin
dak	Dakika
F	F değeri
IAA	Indole-3-asetic acid/ Indole-3-asetik asit
IBA	Indole-3-Butyric acid /Indol-3-bütirik Asit
IUCN	International Union for Conservation of Nature's Red List of Threatened Species
MS	Murashige ve Skoog Temel Besin Ortamı
***m*T**	Meta-topolin
NAA	α-Naphtaleneacetic acid / α-Naftalin asetik asit
BBD	Bitki Büyüme Düzenleyiciler
TDZ	Thidiazuron

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. MS besin ortamının içeriği 11
Tablo 2.1. BBD saklanma koşulları ve çözücüleri 11
Tablo 3.1. Farklı büyüme düzenleyicilerin *C. amaena*'da yaprak ve kotiledon eksplantlarında kallus oluşum oluşum oranı, sürgün oluşum oranı ve eksplant başına sürgün sayısına etkisine ait varyans analizi sonuçları 15
Tablo 3.2. Farklı büyüme düzenleyicilerin *C. amaena'*da yaprak ve kotiledon eksplantlarında kallus oluşum oranına etkisi 17
Tablo 3.3. Farklı büyüme düzenleyicilerin *C. amaena*'da yaprak ve kotiledon eksplantlarında sürgün oluşum oranına etkisi 18
Tablo 3.4. Farklı büyüme düzenleyicilerin *C. amaena*'da yaprak ve kotiledon eksplantlarında eksplant başına sürgün sayısına etkisi 19
Tablo 3.5. Farklı büyüme düzenleyicilerin *C. amaena*'da kotiledon boğum eksplantında sürgün oluşum oranı ve eksplant başına sürgün saysına etkisine ait varyans analizi tablosu 21
Tablo 3.6. Farklı büyüme düzenleyicilerin *C. amaena*' da kotiledon boğum eksplantında sürgün oluşum oranı üzerine etkisi 22
Tablo 3.7. Farklı büyüme düzenleyicilerin *C. amaena*' da kotiledon boğum eksplantında eksplant başına sürgün sayısına etkisi 23
Tablo 3.8. Farklı IBA konsantrasyonlarının *C. amaena*'da sürgünlerin köklenme oranına etkisine ait varyans analizi 24
Tablo 3.9. Farklı IBA konsantrasyonlarının *C. amaena*'da sürgünlerin köklenme oranına etkisi 24

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Çimlenen *Centaurea amaena* tohumları 12
Şekil 2. Kotiledon boğum eksplantı izolasyonu 14
Şekil 3. Yaprak (a) ve kotiledon (b) eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ... 20
Şekil 4. Kotiledon boğumlarda sürgün çoğaltımı 25
Şekil 5. Sürgünlerin köklendirilmesi 26

GİRİŞ

Türkiye, florasında doğal olarak bulunan yaklaşık üçte biri endemik 12000'den fazla bitki taksonu ile bitki çeşitliliği bakımından dünyanın en önemli ülkeleri arasında yer almaktadır (Akçiçek ve Vural, 2007). Ancak tüm dünyada olduğu gibi Türkiye' de de bu bitki çeşitliliği hızlı nüfus artışı, kentleşme, endüstrileşme ve erozyon gibi bazı etkiler nedeniyle tehdit altındadır ve korunmasına yönelik çalışmalar oldukça önem kazanmıştır.

Bitki genetik kaynaklarının korunması çalışmaları ile bitkilerde bulunan mevcut çeşitliliğin (tohum ya da farklı aksamlarının) kullanımına kadar etkin biçimde saklanmasını hedeflemektedir. Bu amaçla günümüzde farklı koruma yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlardan *in situ* koruma doğal kaynakların kendi doğal yaşam alanlarında korunmasıdır. Bitki genetik kaynaklarının korunmasında kullanılan bir diğer yöntem ise *ex situ* korumadır. *Ex situ* koruma yöntemlerine tohum depolama, *in vitro* depolama, DNA depolama, çiçektozu depolama ve botanik bahçeleri örnek olarak verilebilir (Şehirali vd., 2015). *Ex situ* koruma yöntemlerine içerisinde bitki doku kültürleri son yıllarda özellikle tehdit altındaki endemik türlerin çoğaltılmasına ve korunmasına yönelik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Birçok nesli tükenmekte olan tür, bu teknikler sayesinde yabani popülasyon üzerine minimum düzeyde etki oluşturularak çok az bitki materyalinden hızlıca çoğaltılabilmekte ve korunabilmektedir (Erdağ ve Emek, 2005a, 2005b).

Asteraceae (Compositae) familyasından *Phalolepis* seksiyonunda yer alan *Centaurea amaena* Boiss. & Balansa IUCN kriterlerine göre CR B2ab (i, iii) kategorisinde endemik bir türdür (Atasagun vd., 2013; Atasagun ve Aksoy 2018). Bu tür çok yıllık bir bitki olup kromozom sayısı 2n=18'dir. Tür, Kayseri'nin batısındaki 38º 38'- 38º 41 'N boylamları ve 35º 30'-35º 35' S enlemleri arasında ve 1.170–2.300 m yükseklikte kurak

ortamda yetişmektedir. Yılanlı Dağı'nın taşlık yamaçlarında bulunmakta ve kaya bitki örtüsünün önemli bir üyesidir (Atasagun ve Aksoy, 2018). Tür Kayseri de iki lokalitede yaklaşık 0.55 km^2'lik bir alanda bulunmakta ve birey sayısı Atasagun ve Aksoy (2018) tarafından 5672 adet olarak kaydedilmiştir. Ayrıca *C. amaena,* içerdiği yüksek fenolik ve flovanoid madde miktarları ile güçlü bir antioksidant ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olup eczacılık, alternatif tıp ve doğal tedavi gibi birçok alanda doğal katkı maddesi olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptir (Albayrak vd., 2014).

Atasagun (2012) *Centaurea amaena*'nın Kayseri'de Erciyes ve Yılanlı Dağı arasında çok izole bir bölgede yayılış gösteren, nesli yok olma tehlikesi altında olan endemik bir tür olduğunu, yok olma tehlikesi altında olmasının başlıca nedeninin insan etkisi olduğunu, bölgedeki hayvan otlatmanın, taş ocağı faaliyetlerinin, Erciyes Dağı master planının, rakıma bağlı olarak mevsim şartlarının olumsuz etkilerinin ve ayrıca bitki tohumlarının Heteroptera takımından *Oxycaremus sp.* tarafından besin olarak kullanılmasının ve tohumların bu böcek tarafından tüketilmesinin yeni birey oluşturma ihtimalini azalttığını ve popülasyon gelişimini olumsuz etkilediğini bildirmektedir.

Centaurea amaena yok olma tehlikesi yaşayan bir tür olarak tanımlanmakta ve yok olmasını engellemek amacıyla türün çoğaltılması için bir takım önlemlerin alınması gerekmektedir. Bu nedenle bu tez çalışması kapsamında kritik endemik kategorisinde yer alan *Centaurea amaena*'nın çoğaltımına ilişkin doku kültürüyle alternatif bir çoğaltım prosedürün oluşturulması amaçlanmıştır.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Literatür Çalışması

Asteraceae (Compositae) familyasının en büyük cinsi olan *Centaurea* L. cinsi yeryüzünde 600 tür ile temsil edilmektedir (Eskin, 2011). Türkiye florasında ise 194 tür bulunmakta ve bunlardan 118 tür endemiktir ve bu yüksek endemizim oranı Türkiye'nin tür için gen merkezi olduğunu göstermektedir (Atasagun vd., 2013). Tek yıllık, iki yıllık veya çok yıllık olarak otsu veya çalı formunda bulunan bu bitkiler halk arasında, peygamber çiçeği, zerdali dikeni, çoban kaldıran, Timur dikeni, sarıbaş, gökbaş gibi Türkçe isimlerle anılmaktadır (Arif vd., 2004). *Centaurea* türleri antidiyabetik, antidiyareik, antiromatizmal, antienflamatuvar, stomaşik, diüretik, adet söktürücü, astrenjan, hipotansif, antipiretik, sitotoksik, antibakteriyal gibi birçok amaçla kullanılmaktadır (Eskin, 2011).

Centaurea amaena Boiss. & Balansa (gül düğmesi) ise *Centaurea* cinsi içerisinde *Phalolepis* seksiyonunda yer almaktadır. Tür ilk defa 1856'da Balansa tarafından toplanmış ve daha sonra Skrivanek tarafından Kayseri'de 1939 yılında tekrar toplanmıştır (Davis, 1975'ten Atasagun ve Aksoy, 2018'in aktarımı). Atasagun vd. (2013), türün IUCN kriterlerine göre CR B2ab (i, iii) kategorisinde endemik çok yıllık olduğunu bildirmektedir. Tür yok olma tehlikesi altında olup sadece Kayseri de yayılış göstermektedir. Atasagun (2012) tarafından gerçekleştirilen arazi çalışmalarında türün kayalık yamaçlarda ve kaya çatlaklarında yayılış gösterdiği tespit edilmiş ve Kayseri de iki lokalitede bulunduğu belirlenmiştir. Birinci lokalite Kayseri Yılanlı Dağı bölgesi yayılış alanı büyüklüğü 0.25 km^2 ve toplam birey sayısı 1347, ikinci lokalite ise Erciyes Dağı Perikartın bölgesi yayılış alanı 0.3 km^2 ve birey sayısı 4325 olarak bildirilmiştir.

Atasagun (2012) tarafından tür ile ilgili yapılan çalışmada türün Haziran-Ağustos aylarında çiçeklendiği, çok yıllık bir bitki olduğu, yaklaşık 18-55 cm boylandığı, kromozom sayısının 2n=18 olduğu ve tohum/ovül oranının %35 olduğu bu nedenle tohum veriminin düşük olduğu rapor edilmiştir.

Centaurea amaena Kayseri'de 2 lokalitede çok izole bir alanda bulunmakta ve bölgedeki yapılaşma, Erciyes master planı, bölgenin dağlık olması, hayvan otlatma, yakındaki taş ocağı faaliyetleri ayrıca rakıma bağlı olarak tohumların tam olgunlaşamaması ve bitki tohumlarının Heteroptera takımından *Oxycaremus sp.* tarafından besin olarak kullanılması türün birey oluşturma ihtimalini azaltmakta ve popülasyon gelişimini olumsuz etkilemektedir (Atasagun, 2012). Türün *in situ* korunmasına yönelik Atasagun ve Aksoy (2018) tarafından yürütülen çalışmada 200 tohum doğal yaşam alanlarına ekilmiş ancak ekilen tohumlarda çimlenme gerçekleşmemiştir.

Doku kültürü yöntemleri ile steril koşullarda yapay besin ortamlarında bitkinin herhangi bir parçasından çoğaltım gerçekleştirilmektedir. Dolayısıyla çoğaltımda kullanılan üretim materyali sayısı artmakta ve kitlesel üretime olanak sağlamaktadır. Doku kültürleri bitkilerin hızlı çoğaltımına imkan sağlarken hastalıksız bitki üretimi, sekonder metabolit üretimi, *in vitro* germplasm muhafazası ve bitki ıslahı uygulamalarında çok önemli kullanım alanlarına sahiptir. Son yıllarda bitki doku kültürleri özellikle tehdit altındaki endemik türlerin çoğaltılmasına ve korunmasına yönelik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Birçok nesli tükenmekte olan tür, bu teknikler sayesinde yabani populasyon üzerine minimum düzeyde etki oluşturularak çok az bitki materyalinden hızlıca çoğaltılabilmekte ve korunabilmektedir (Erdağ ve Emek, 2005a, 2005b).

Centaurea türlerinin doku kültürü yöntemleri ile çoğaltımına ilişkin literatürde çalışma olmasına rağmen *C. amaena*'nın doku kültürü yöntemleri ile çoğaltımı üzerine çalışmaya rastlanmamıştır. Bazı *Centaurea* türleri ve diğer endemik türlerle ilgili yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Hammatt ve Evans (1985), *Centaurea junoniana*'nın kök, yaprak, hipokotil ve kotiledonlarının organogenesis ile sürgün rejenerasyonu kapasitesini araştırmışlardır. Elde edilen sürgünleri köklendirilerek toprağa aktarmışlardır.

Pevalek-Kozlina (1998), nadir endemik *Centaurea ragusina* türünün *in vitro* çoğaltımını amaçladığı çalışmada sürgün uçlarını kullanmıştır. En yüksek çoğaltım oranının 1 µM BAP ve 2.9 µM giberellik asit içeren yarım MS ortamında elde etmiştir. İn vitro çoğalan sürgünleri 2.5 µM IBA içeren ortamda köklendirmiştir.

Cuenca vd. (1999), Doğu İspanya'da Valencia bölgesinde yayılış gösteren ve nesli son derece tehlikede olan endemik *Centaurea paui'n*in mikroçoğaltımını araştırmışlardır. Eksplant olarak bitkinin çiçek ekseni boğumlarını kullanmışlardır. En fazla sürgün oluşumu oranını 0.5 mg/l 6-benzyladenine ya da 2 mg/l kinetin eklenmiş MS ortamlarında gözlemlemişlerdir. En fazla sürgün uzunluğunu bitki büyüme düzenleyicilerin kullanılmadığı besin ortamlarında belirlemişlerdir. 2 mg/l IAA ve 2 mg/l IBA içeren besin ortamında 30 gün içerisinde %40 köklenme gözlemlemişlerdir.

Cuenca ve Amo-Marco (2000), nesli tehlikede endemik bir tür olan *Centaurea spachii'*nın *in vitro* koşullarda mikroçoğaltımını incelemişlerdir. Eksplant olarak çiçek ekseni boğumlarını kullanmışlardır. En yüksek çoğaltım oranını 1 mg/L BAP ilaveli ortamda belirlemişlerdir. En yüksek köklenme sonuçlarını %60 ile 2 mg/l indol-3-asetik asit ve 2 mg/l indol-3-bütirik asit kombinasyonu ile hazırlanmış MS ortamlarında elde etmişlerdir. Ayrıca bu kültür ortamında sürgünlerin %50 sinin 3 hafta sonunda köklendiğini gözlemlemişlerdir. Bitkilerin sera koşullarına aktarıldığında ise %80 oranında hayatta kaldıklarını kaydetmişlerdir.

Curkovic-Perica (2003), *Centaurea rupestris* türünün tohum eksplantında 1 µM 6-benzilaminopurin ve 2.9 µM giberellik asit içeren MS ortamından eksplant başına 11.88 adet sürgün elde etmişlerdir. Elde edilen sürgünler 3 µM İndol bütirik asit içeren yarım MS ortamında köklendirilerek dış koşullara aktarılmıştır.

Özel vd. (2006), *C. tchihatcheffii* türünde olgunlaşmamış zigotik embriyoları kullandıkları çalışmalarında en yüksek sürgün rejenerasyonunu 1 mg/L kinetin ve 0.25 mg/L NAA içeren ortamlarda elde ettiklerini bildirmişlerdir. Meydana gelen sürgünler 1 mg/L IBA içeren MS ortamında köklendirilerek dış koşullara alıştırılmıştır.

Göztaş (2008), endemik *Centaurea kotschyi* tohumlarının çimlenmesinde IAA, 2.4-D, GA_3, ve kinetin hormonlarının etkilerini araştırmış ve en yüksek çimlenme oranını %62.5 olarak 2 mg/L IAA içeren besin ortamlarında tespit etmiştir.

Erdağ ve Emek (2005)b, kritik olarak tehlike altında bir tür olan *Anthemis xylopoda'*da çimlenen tohumlardan gelişen sürgünleri kullanarak yürüttükleri çalışmada BA, KIN ve TDZ eklenmiş MS ortamlarını kullanmışlardır. En yüksek eksplant başına sürgün sayısını 7.83 adet ile 0.005 mg/L TDZ ilaveli MS besin ortamında elde etmişlerdir. Rejenere olmuş sürgünlerin 0.5 mg/L IBA ilaveli ½ MS ortamında köklendiğini bildirmişlerdir.

Kurt ve Erdağ (2009*), C. zeybekii*'de en fazla sürgün çoğaltımını 1 mg/L IBA içeren MS ortamından elde etmişlerdir. Elde edilen sürgünleri 0.5 mg/L IBA içeren MS ortamında köklendirmişler, ancak köklenme yüzdesinin çok düşük olduğunu bildirmişlerdir (%15).

Mallón vd. (2010), *Centaurea ultreiae* türünde sürgün ucu eksplantında 4.44 µM BAP içeren yarım MS besin ortamında 5.52 sürgün elde etmişlerdir. Sürgünler 10 M naftalinasetik asit içeren bir çözeltiye daldırarak %91 oranında kök sağladıklarını bildirmişlerdir.

Alaiwi vd. (2011), *Centaurea montana* ve *Centaurea cyanus* türlerinde *in vitro* çiçeklenme ve hücre kültürü üzerine protokol geliştirmek için yürüttükleri çalışmada, MS temel besin ortamının uygun hormonlarla kombine edildiğinde etkili sürgün rejenerasyonu ve *in vitro* çiçeklenme için kullanılabileceğini tespit etmişlerdir.

Erişen vd. (2011), endemik *Astragalus cariensis* bitkisinde kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu üzerine TDZ'nin etkisini araştırmışlardır. Çalışmada eksplant olarak yaprak ve yaprak sapı kullanılmıştır. En fazla sürgün rejenerasyonunu 0.4 mg/L TDZ ve 0.2 mg/L NAA ilaveli MS besin ortamlarında 15 adet/eksplant olarak belirlemişler ve köklenen bitkileri başarılı bir şekilde dış ortama aktarmışlardır.

Gorgorov vd. (2011), endemik *Centaurea caliacrae*, *Centaurea finazzeri* ve *Centaurea davidovii'*nin *in vitro* kültürlerini *ex situ* koruma aracı olarak kullanımını araştırmışlardır. 0.5 g/L BAP takviye edilen MS ortamında, sap eksplantlarından sürgün gelişimi belirlemişlerdir.

Çölgeçen vd. (2012), endemik *Centaurea tchihatcheffii* (Yanardöner) bitkisinin kallus oluşturma ve sekonder metabolit üretimini araştırmak amacıyla bir çalışma

yürütmüşlerdir. Pappusu kesilen tohumların 3 günde kesilmeyen tohumların ise 7 günde çimlendiğini gözlemlemişlerdir. En iyi kallus oluşumunu kotiledonlardan benziladenin ve kinetin içeren MS ortamlarında kaydetmişlerdir.

Yüzbaşıoğlu vd. (2012), *Centoaurea arifolia*'da nın yaprak eksplantlarını 1 mg/L BAP + 0.1 mg/L NAA ve 2 mg/L BAP + 0.2 mg/L NAA oksin ve sitokininlerini içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Üç hafta sonra aktif olarak büyüyen kalluslar elde edilmiş ve bu kalluslar üzerinde üç hafta sonra adventif sürgün rejenerasyonu gerçekleşmiştir. Rejenere olan sürgünler 1 mg/L IBA içeren MS ortamında köklendirilmiştir.

Amoo ve Van Staden (2013), Topolinlerin tek başına veya bir oksinle kombinasyonunda, 6-benzyladenine (BA)'e kıyasla endemik *Huernia hystrix'* in sürgün çoğaltımı ve sekonder metabolit üretimindeki rolünü incelemişlerdir. Araştırma sonucunda *m*T'nin BA'ya göre sürgün çoğaltımı ve fenolik üretiminde daha etkili olduğunu gözlemlemişlerdir. En yüksek rejenere olmuş sürgün sayısını 20 µM *m*T ve 10 µM NAA eklenmiş ortamlarda saptamışlardır ve yalnızca sitokinin içeren ortamlarla elde edilen sonuçlara nazaran 3 kat daha fazla sonuç alındığını bildirmişlerdir.

Albayrak vd. (2014), *Centaurea amaena*'nın yüksek fenolik ve flovanoid madde miktarları ile güçlü bir antioksidant aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Okay vd. (2014), Ankara- Gölbaşı'nda bulunan ve kritik endemik bitki *Centaurea tchihatcheffii* (Sevgi Çiçeği)'nin tohumla ve doku kültürü yöntemi ile çoğaltılmasını araştırmışlardır. En yüksek çimlenme oranını % 83.6 ve 85.2 ile sırasıyla 1 ve 2 mg/L giberellik asit içeren ortamlarda, eksplant başına en yüksek sürgün oluşumunu ise 0.5 mg/L IBA+0.5 mg/L BAP içeren besin ortamlarında elde etmişlerdir. 1 mg/L IBA ilaveli MS besin ortamında %86 oranında köklenme olduğunu gözlemlemişlerdir.

Aydoğan ve Erdağ (2015), farklı sitokininleri kullanarak *Centaurea zeybekii* türünde yaprak eksplantında yürüttükleri doku kültürü çalışmasında en yüksek kallus oluşturma oranını 0.005 mg/L ve 0.01 mg/L TDZ (% 100) içeren ortamlarda, eksplant başına en yüksek sürgün sayısını ise 6.2 sürgün ile 1 mg/L KIN içeren MS ortamında belirlemişlerdir. Köklenme açısından MS ve ½ MS ortamları arasında fark olmadığı ve 0.5 mg/L IBA ilaveli ortamda %15 köklenme oranı elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Traykova vd. (2015), *Centaurea pseudaxillaris* yaprak eksplantlarında en fazla sürgün rejenerasyonunu 1 mg/L BAP içeren MS ortamından elde etmişlerdir.

Valletta vd. (2016), İtalya – Lazio'daki Circeo Dağı'nda sınırlı alanda yayılış gösteren endemik *Centaurea cineraria* subsp. *circae*'nin *ex situ* gibi koruma stratejilerini araştırmışlardır. En fazla çimlenme oranının (%65) ve +20 ˚C gündüz/10 ˚C gece sıcaklığında 12 saat aydınlık 12 saat karanlık fotoperiyotta kaydetmişlerdir. Ayrıca 0.5 mg/LBAP ve 2 mg/L kinetin içeren MS ortamlarında boğum eksplantlarında %74 sürgün rejenerasyonu ve eksplant başına 5.67 adet sürgün elde etmişlerdir. Elde edilen sürgünlerin 0.5 mg/L IBA içeren ortamda %100 oranında köklendiğini ve bunların %74'ünün dış ortama aktarıldığında hayatta kaldığını rapor etmişlerdir.

Atalay vd. (2017), endemik bitki *Astragalus trojanus* Stev.'n'un nodal kültürlerle klonal çoğaltımını amaçladıkları çalışmada en fazla sürgün sayısını 0.5 mg/L BAP içeren WPM ortamında belirlemişlerdir. En yüksek köklenme yüzdesini 3 mg/L IBA içeren WPM ortamında; en fazla kök sayısını da 3 mg/L IAA içeren WPM ortamında gözlemlemişlerdir. Köklenen bitkicikleri dış ortama aktardıktan 15 hafta sonunda bitkilerin büyümelerini başarılı bir şekilde tamamladıklarını bildirmişlerdir.

Atalay ve Erişen (2017), kritik endemik *Centaurea lycaonica* türünün *in vitro* hızlı çoğaltım potansiyelini araştırmışlardır. Hızlı çoğaltım için nodal segmentler BAP, TDZ veya kinetin büyüme düzenleyicilerini (0.5, 1.0 veya 2.0 mg/L) içeren MS temel besin ortamında kültüre alınmıştır. Rejenerasyon çalışmaları için yaprak eksplantları, farklı büyüme düzenleyicileri (BAP, TDZ, Kinetin, NAA) içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Nod kültürlerinde en iyi sonuç (8.73 adet sürgün/eksplant) 0.5 mg/L BAP içeren MS ortamından elde edilmiştir. Rejenerasyon çalışmalarında ise yaprak eksplantında en iyi sonuç (32.27 adet sürgün/eksplant) 0.5 mg/L BAP +0.2 mg/L NAA içeren ortamda elde edilmiştir. TDZ ve TDZ-NAA kombinasyonlarında sadece kallus oluşmuştur. Sadece kinetin içeren ortamlarda eksplantların çoğunluğunun karardığı görülmüştür. Elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinde en uygun ortamın 2.0 mg/L IAA olduğu tespit edilmiştir.

Demirel vd. (2017), endemik *Centaurea fenzlii* ve *Centaurea derderifolia* türlerinin *in vivo* ve *in vitro* tohum çimlenmesini araştırmıştır. 16 saat aydınlık-8 saat karanlık fotoperyot ve 25°C sıcaklıktaki iklim odasında MS, B5, SH ve WH ortamlarında kültüre

alınan tohumlarda en fazla çimlenme oranının WH besin ortamında olduğunu bildirmişlerdir.

Türkoglu vd. (2018), Endemik *Centaurea fenzlii*'de yaprak eksplantlarında en fazla kallus oluşumunu 4.44 µM BAP+10.64 µM NAA, sürgün oluşumunu ise 8.88 µM BAP+2.685 µM NAA içeren ortamlardan elde etmişlerdir. *C. fenzlii*'de köklenme oranının düşük olduğunu tespit etmişlerdir.

2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

2.1. Bitki Materyali

Çalışmada materyal olarak kullanılan tür, Dr. Bayram ATASAGUN tarafından Kayseri Yılanlı Dağı'ndan sınırlı sayıda toplanan, endemik *Centaurea amaena* Boiss & Balansa'dır. Tohumlar kullanılıncaya kadar +4˚C 'de bekletilmiştir.

2.2. Çalışmada Kullanılan Besin Ortamları ve Bitki Büyüme Düzenleyiciler

MSO besin ortamı: Murashige ve Skoog (1962) makro-mikro elementleri ve vitaminlerini içeren 30 g/L sukroz ilaveli 7 g/L agar ile katılaştırılmış ortam (Tablo 2.1.).

MS1 besin ortamı: ½ MS makro-mikro elementleri ve vitaminlerini içeren 30 g/L sukroz ilaveli 7 g/L agar ile katılaştırılmış ortam.

Bitki büyüme düzenleyiciler (BBD) ve saklanma koşulları: Çalışmada sitokinin olarak TDZ (Thidiazuron), BAP (6- benzilaminopurin) ve *m*T (*meta*-Topolin); oksin olarak ise NAA (α-naftalinasetik asit) ve IBA (Indole-3 bütirik asit) kullanılmıştır. Bu büyüme düzenleyiciler uygun solüsyonlarda çözündükten sonra uygun sıcaklık koşullarında saklanmıştır (Tablo 2.2.).

2.3. Genel Doku Kültürü Şartları

Besin ortamları, saf su ve çalışmada kullanılan tüm alet-ekipmanlar (petri kutuları/magentalar, beher, ekimde kullanılan pens ve bisturi vb.) otoklav kullanılarak 121 °C'de 20 dakika sürede steril edilmiştir. Tüm çalışmalar hepa filtrelere sahip yatay hava akışlı steril kabin içinde gerçekleştirilmiştir.

Besin ortamı bileşenleri (MS, sukroz ve agar) hassas terazide (Ohaus) tartılmıştır. Ortam pH'ları dijital pH metre ile 5.5 ile 5.8 arasında ayarlanmıştır. PH ayarlamasında 1N NaOH veya 1 N HCI kullanılmıştır. Tüm kültürler 16:8 saat aydınlık:karanlık fotoperiyot, 22±2°C ve 3000 lüks ışık yoğunluğu koşullarında kültür kabininde büyütülmüştür.

Tablo 2.1. MS besin ortamının içeriği

İçerik	**Miktar (mg/L)**
Makro elementler	
$CaCl_2$	332.02
KH_2PO_4	170.00
KNO_3	1900.00
$MgSO_4$	180.54
NH_4NO_3	1650.00
NaH_2PO_4	--
$(NH_4)2SO_4$	--
$(NH_4)H_2PO_4$	--
Mikro elementler	
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
FeNaEDTA	36.70
H_3BO_3	6.20
KI	0.83
$MnSO_4.H_2O$	16.90
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$ZnSO_4.7H_2O$	8.60
Vitaminler	
Glycine	2.00
Myo-inositol	100.00
Nikotinik asit	0.50
Pyridoksin HCL	0.50
Thiamine HCL	0.10

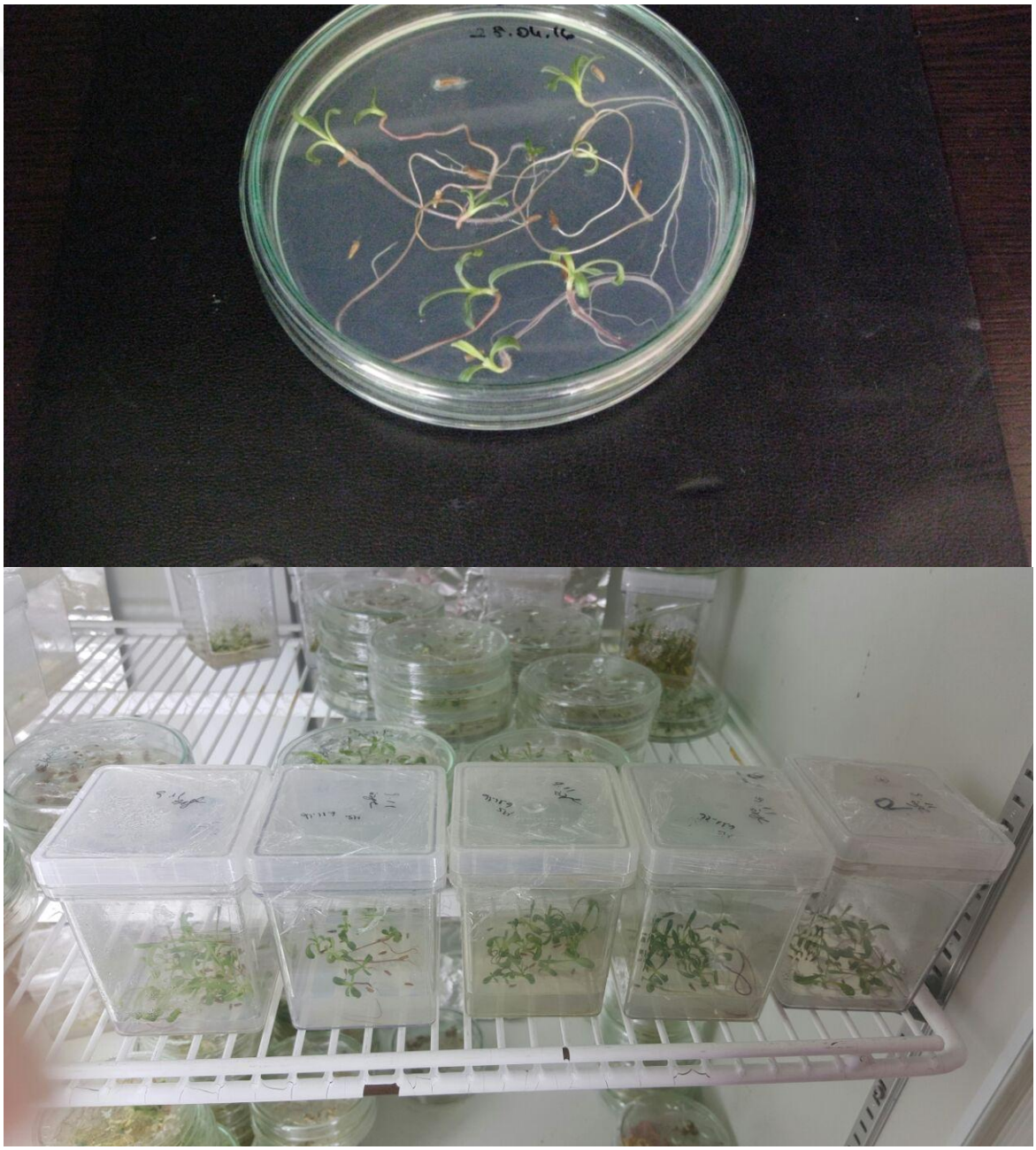
https://www.duchefa-biochemie.com/product/category/id/16/name/plant-tissue-culture-media, Murashige ve Skoog, 1962

Tablo 2.1. BBD saklanma koşulları ve çözücüleri

Bitki Büyüme Düzenleyici		**Saklama koşulları**	**Çözücüler**
Sitokininler	BAP	+4	1N NaOH
	*m*T	-20	1N NaOH/filtre sterilizasyonu
	TDZ	-20	DMSO/filtre sterilizasyonu
Oksinler	IBA	+4	1N NaOH
	NAA	+4	1N NaOH

2.4. Aken Sterilizasyonu

Türe ait akenler, yüzey sterilizasyonu için ilk olarak steril saf su ile %50 seyreltilmiş H_2SO_4 (Sülfürik asit)'de 1 dakika bekletilmiş, ardından saf su ile durulanarak yine saf su ile %50 seyreltilmiş ticari çamaşır suyunda (ACE) 10 dakika boyunca manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Bu işlem sonunda tohumlar 3 kez en az 5'er dakika steril saf su ile durulanmıştır. Steril edilen tohumlar MSO besin ortamlarına her Magenta kabına (Sigma-Aldrich,77x77x97) ya da petri kabına 15-20 adet olacak şekilde ekilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Çimlenen *Centaurea amaena* tohumları

2.5. *In vitro* Kültürlerin Oluşturulması

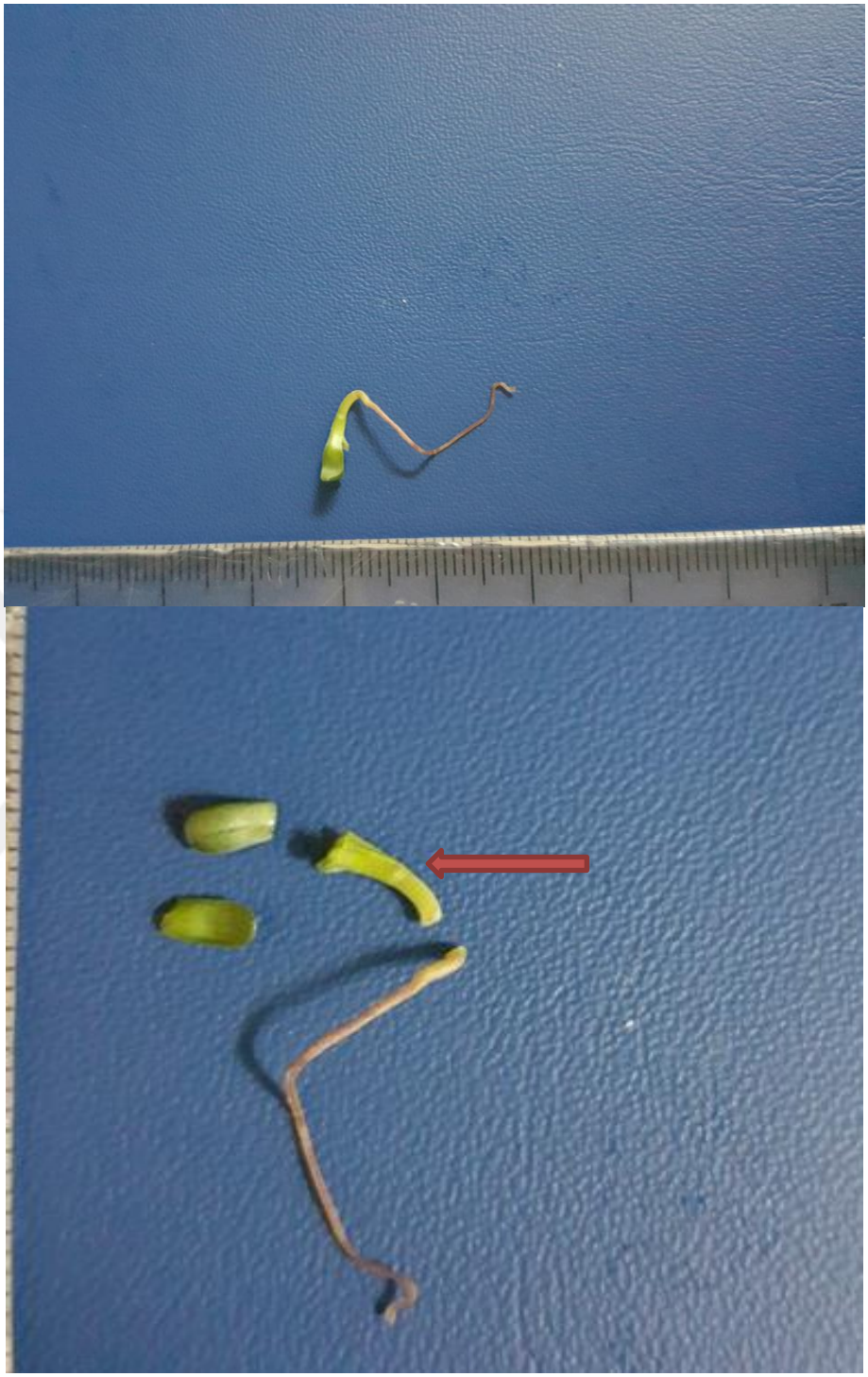
In vitro sürgün rejenerasyonu amacıyla MSO besin ortamlarına ekilen tohumların 15-30 gün sonunda oluşan fidelerin yaprak, kotiledon ve kotiledon boğum kısımları eksplant olarak kullanılmıştır (Şekil 2). Eksplantlar TDZ (0.3, 0.6 ve 1.2 mg/L), BAP (1, 2 ve 4 mg/L), *m*T (0.5, 1, 2 ve 4 mg/L) sitokininlerinin farklı konsantrasyonlarını veya 0.5 mg/L NAA ile kombinasyonlarını içeren MSO besin ortamında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 7-8 hafta sonra kotiledon ve yaprak eksplantlarında kallus ve sürgün oluşturma oranı ile eksplant başına sürgün sayısı, kotiledon boğum eksplantında ise sürgün oluşturma oranı ve eksplant başına sürgün sayısı parametreleri belirlenmiştir.

2.6. Köklendirme

İn vitro elde edilen sürgünler 0.5, 1 veya 2 mg/L IBA ilaveli MS1 besin ortamında Magenta kapları içerisinde köklenmeye alınmıştır. Köklenen sürgünler sayılarak köklenme oranları belirlenmiştir.

2.7.Verilerin Değerlendirilmesi

Yaprak ve kotiledonun eksplant olarak kullanıldığı denemeler 4 tekerrürlü ve her tekerrürde 10 eksplant, kotiledon boğumların eksplant olarak kullanıldığı denemeler 4 tekerrürlü ve her tekerrürde 6 eksplant ve köklendirme denemeleri 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 6 eksplant olacak şekilde yürütülmüştür. Yüzde olarak hesaplanan değerler varyans analizinden önce “arcsin” transformasyonuna tabi tutulmuştur (Snedecor ve Cochran, 1967). Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre yürütülmüş olup elde edilen verilerde varyans analizi SPSS bilgisayar programı yardımıyla yapılmış ve uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.



Şekil 2. Kotiledon boğum eksplantı izolasyonu

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Kotiledon ve Yaprak Eksplantlarında Adventif Sürgün Rejenerasyonu

C. amaena'da organogenesis ile bitki rejenerasyonu elde etmek amacıyla steril fidelerden elde edilen kotiledon ve yapraklar eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Eksplantlar yalnız BAP, TDZ ve *m*T farklı konsantrasyonları veya bunların 0.5 mg/L NAA ile kombinasyonlarını içeren 20 farklı ortamda kültüre alınmıştır. Denemelerde kallus oluşum oranı, sürgün oluşturma oranı ve eksplant başına sürgün sayısı değerleri belirlenmiştir. Elde edilen ortalamalarla yapılan varyans analizi sonuçları Tablo 3.1.'de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. Farklı büyüme düzenleyicilerin *C. amaena*'da yaprak ve kotiledon eksplantlarında kallus oluşum oluşum oranı, sürgün oluşum oranı ve eksplant başına sürgün sayısına etkisine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	F değeri		
		Kallus Oluşturma Oranı	Sürgün Oluşturma Oranı	Eksplant Başına Sürgün Sayısı
Ekplant	1	1.835	2.364	0.172
Ortam	19	40.656**	57.866**	83.105**
Ekplant * Ortam	19	1.324	4.221**	11.555**
Hata	120	--	--	--
Genel	159	--	--	--

** %1 düzeyinde önemli * %5 düzeyinde önemli

Varyans analizi sonucunda kallus oluşum oranında ortamlar istatistiksel olarak %1 düzeyinde önemli, eksplant*ortam interaksiyonu ve eksplantlar istatistiksel olarak önemsiz; sürgün oluşum oranında ortamlar ve eksplant*ortam interaksiyonu istatistiksel olarak %1 düzeyinde önemli, eksplantlar ise istatistiksel olarak önemsiz; eksplant

başına sürgün sayısında ise ortamlar ve eksplant*ortam interaksiyonunu istatistiksel olarak %1 düzeyinde önemli eksplantlar ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Tablo 3.1).

Kallus oluşturma oranına ilişkin ortalamaların yer aldığı Tablo 3.2 incelendiğinde kotiledon eksplantında kallus oluşturma oranı %52.50-100 arasında, yaprak eksplantında ise %50-100 arasında değişim gösterdiği görülmektedir. İki eksplantın ortalamasına ait veriler incelendiğinde en yüksek kallus oluşum oranı 2 mg/L BAP, 4 mg/L BAP, 1 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA, 2 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA, 4 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA, 0.5 mg/L *m*T + 0.5 mg/L NAA, 1 mg/L + 0.5 mg/L NAA, 2 mg/L *m*T + 0.5 mg/L NAA, 4 mg/L *m*T + 0.5 mg/L NAA, 0.3 mg/L TDZ, 0.6 mg/L TDZ, 1.2 mg/L TDZ, 0.3 mg/L TDZ + 0.5 mg/L NAA, 0.6 mg/L TDZ + 0.5 mg/L NAA, 1.2 mg/L TDZ + 0.5 mg/L NAA içeren ortamlarından elde edilirken, en düşük 51.25 ve 56.25 ile 0.5 ve 2 mg/L *m*T içeren ortamlardan elde edilmiştir. Sadece *m*T içeren ortamlarda genel olarak kallus oluşum oranı düşük bulunmuştur. TDZ içeren tüm ortamlarda ise kallus oluşumu %100 olarak tespit edilmiştir.

Sürgün oluşturma oranlarına ait ortalama değerler incelendiğinde ise sürgün oluşturma oranlarının kotiledon eksplantında büyüme ortamlarına göre farklılık göstermekle birlikte % 0-57.5 arasında ve yaprak eksplantında ise %0-62.5 arasında kaydedildiği görülmektedir (Tablo 3.3). Kotiledon eksplantında en yüksek sürgün oluşturma oranı %57.50 ile 1 mg/L *m*T + 0.5 mg/L NAA içeren besin ortamından elde edilirken bu ortam ile bütün *m*T içeren ortamlar, 1 mg/L BAP ve 1 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA içeren ortamlar ile aynı istatistiksel grupta yer almıştır.

Yaprak eksplantında ise en yüksek sürgün oluşum oranı %62.50 ile 1 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA içeren ortamdan elde edilmiş olup 2 mg/L BAP, 4 mg/L BAP, 0.5 mg/L *m*T, 4 mg/L *m*T ve bunların 0.5 mg/L NAA ile kombinasyonları aynı istatistiksel grupta yer almıştır. TDZ içeren ortamlarda ise sadece kallus oluşumu gerçekleşmiş olup hiç sürgün gelişmemiştir. İki eksplantın ortalamasına ilişkin veriler incelendiğinde ise en yüksek sürgün oluşumu 1 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA, 0.5 mg/L *m*T, 4 mg/L *m*T, 1 mg/L *m*T + 0.5 mg/L NAA ve 4 mg/L *m*T + 0.5 mg/L NAA içeren ortamlarda tespit edilmiştir.

Tablo 3.2. Farklı büyüme düzenleyicilerin *C. amaena'*da yaprak ve kotiledon eksplantlarında kallus oluşum oranına etkisi

Kallus Oluşturma Oranı (%)				**Transformasyon Değerleri**		
Ortamlar	**Eksplantlar**			**Eksplantlar**		
	Kotiledon	**Yaprak**	**Ortalama**	**Kotiledon**	**Yaprak**	**Ortalama**
1 mg/LBAP	82.50	85.00	**83.75**	68.79	73.40	**71.09 b**
2 mg/L BAP	95.00	100.00	**97.50**	80.78	90.00	**85.39 a**
4 mg/L BAP	100.00	87.50	**93.75**	90.00	75.06	**82.53 a**
1 mg/LBAP +NAA	100.00	100.00	**100.00**	90.00	90.00	**90.00 a**
2 mg/L BAP+NAA	100.00	100.00	**100.00**	90.00	90.00	**90.00 a**
4 mg/L BAP+NAA	100.00	100.00	**100.00**	90.00	90.00	**90.00 a**
0.5 mg/L mT	52.50	50.00	**51.25**	46.44	45.00	**45.72 d**
1 mg/L *m*T	70.00	72.50	**71.25**	57.47	58.61	**58.04 c**
2 mg/L *m*T	60.00	52.50	**56.25**	51.05	46.44	**48.75 d**
4 mg/L *m*T	70.00	67.50	**68.75**	56.95	55.44	**56.19 c**
0.5 mg/L mT NAA	100.00	95.00	**97.50**	90.00	83.36	**86.68 a**
1 mg/L *m*T+NAA	100.00	87.50	**93.75**	90.00	75.06	**82.53 a**
2 mg/L *m*T+NAA	100.00	100.00	**100.00**	90.00	90.00	**90.00 a**
4 mg/L *m*T+NAA	100.00	100.00	**100.00**	90.00	90.00	**90.00 a**
0.3 mg/L TDZ	100.00	100.00	**100.00**	90.00	90.00	**90.00 a**
0.6 mg/L TDZ	100.00	100.00	**100.00**	90.00	90.00	**90.00 a**
1.2 mg/L TDZ	100.00	100.00	**100.00**	90.00	90.00	**90.00 a**
0.3 mg/L TDZ+ NAA	100.00	100.00	**100.00**	90.00	90.00	**90.00 a**
0.6 mg/L TDZ+NAA	100.00	100.00	**100.00**	90.00	90.00	**90.00 a**
1.2 mg/L TDZ+NAA	100.00	100.00	**100.00**	90.00	90.00	**90.00 a**
Ortalama	**91.50**	**89.88**	**--**	**81.07**	**79.62**	**--**

Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık %5 düzeyinde önemlidir.
NAA besin ortamına 0.5 mg/L olacak şekilde eklenmiştir

Tablo 3.3. Farklı büyüme düzenleyicilerin *C. amaena*'da yaprak ve kotiledon eksplantlarında sürgün oluşum oranına etkisi

Sürgün Oluşturma Oranı (%)				**Transformasyon Değerleri**		
Ortamlar	**Eksplantlar**			**Eksplantlar**		
	Kotiledon	**Yaprak**	**Ortalama**	**Kotiledon**	**Yaprak**	**Ortalama**
1 mg/LBAP	40.00	40.00	**40.00**	39.17 ab	39.17 bcd	**39.17cd**
2 mg/L BAP	30.00	50.00	**40.00**	32.53 bc	45.06 ab	**38.80 cd**
4 mg/L BAP	22.50	47.50	**35.00**	24.53 cd	43.56 ab	**34.05 de**
1 mg/LBAP +NAA	45.00	62.50	**53.75**	42.05 ab	52.34 a	**47.20 ab**
2 mg/L BAP+NAA	25.00	42.50	**33.75**	26.26 cd	40.61 a-d	**33.434 de**
4 mg/L BAP+NAA	15.00	45.00	**30.00**	19.55 d	41.83 abc	**30.69 e**
0.5 mg/L mT	40.00	47.50	**43.75**	39.11 ab	43.71 ab	**41.41 abc**
1 mg/L *m*T	55.00	27.50	**41.25**	47.95 a	31.55 cd	**39.75 bcd**
2 mg/L *m*T	37.50	25.00	**31.25**	37.66 ab	29.89 d	**33.78 de**
4 mg/L *m*T	55.00	50.00	**52.50**	47.88 a	45.00 ab	**46.44 abc**
0.5 mg/L *m*T+NAA	55.00	25.00	**40.00**	47.95 a	29.89 d	**38.92 cd**
1 mg/L *m*T+NAA	57.50	55.00	**56.25**	49.39 a	47.88 ab	**48.64 a**
2 mg/L *m*T+NAA	40.00	27.50	**33.75**	39.17 ab	31.55 cd	**35.36 ed**
4 mg/L *m*T+NAA	47.50	57.50	**52.50**	43.50 ab	49.39 ab	**46.44 abc**
0.3 mg/L TDZ	0	0	**0**	0 e	0 e	**0 f**
0.6 mg/L TDZ	0	0	**0**	0 e	0 e	**0 f**
1.2 mg/L TDZ	0	0	**0**	0 e	0 e	**0 f**
0.3 mg/L TDZ+NAA	0	0	**0**	0 e	0 e	**0 f**
0.6 mg/L TDZ+NAA	0	0	**0**	0 e	0 e	**0 f**
1.2 mg/L TDZ+NAA	0	0	**0**	0 e	0 e	**0 f**
Ortalama	**28.25**	**30.125**	**--**	**26.84**	**28.57**	**--**

Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık %5 düzeyinde önemlidir.
NAA besin ortamına 0.5 mg/L olacak şekilde eklenmiştir

Tablo 3.4. Farklı büyüme düzenleyicilerin *C. amaena*'da yaprak ve kotiledon eksplantlarında eksplant başına sürgün sayısına etkisi

Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)			
Ortamlar	**Eksplantlar**		
	Kotiledon	**Yaprak**	**Ortalama**
1 mg/LBAP	2.427 ef	1.775 gh	2.101 ef
2 mg/L BAP	3.125 cd	3.997 ab	3.561 b
4 mg/L BAP	1.825 f	3.082 cd	2.454 de
1 mg/LBAP +0.5 mg/L NAA	2.052 f	3.930 ab	2.991 c
2 mg/L BAP+0.5 mg/L NAA	1.125 g	2.770 c-f	1.947 f
4 mg/L BAP+0.5 mg/L NAA	1.042 g	2.875 cde	1.959 f
0.5 mg/L mT	3.265 bcd	1.415 h	2.340 def
1 mg/L *m*T	4.152 a	3.375 bc	3.764 ab
2 mg/L *m*T	3.227 cd	2.832 cde	3.030 c
4 mg/L *m*T	3.965a	4.132 a	4.049 a
0.5 mgL *m*T+0.5 mg/L NAA	2.902 de	2.290 efg	2.596 cd
1 mg/L *m*T+0.5 mg/L NAA	3.927 ab	3.117 cd	3.522 b
2 mg/L *m*T+0.5 mg/L NAA	3.970 a	2.082 fgh	3.026 c
4 mg/L *m*T+0.5 mg/L NAA	3.657 abc	2.392 d-g	3.025 c
0.3 mg/L TDZ	0 h	0 ı	0 g
0.6 mg/L TDZ	0 h	0 ı	0 g
1.2 mg/L TDZ	0 h	0 ı	0 g
0.3 mg/L TDZ+0.5 mg/L NAA	0 h	0 ı	0 g
0.6 mg/L TDZ+0.5 mg/L NAA	0 h	0 ı	0 g
1.2 mg/L TDZ+0.5 mg/L NAA	0 h	0 ı	0 g
Ortalama	**2.033**	**2.003**	

Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık %5 düzeyinde önemlidir.

En yüksek eksplant başına sürgün sayısı kotiledon eksplantında sırasıyla 4.152, 3.970, 3. 965, 3.927 ve 3.657 adet ile 1 mg/L *m*T, 2 mg/L *m*T + 0.5 mg/L NAA, 4 mg/L *m*T, 1 mg/L *m*T + 0.5 mg/L NAA ve 4 mg/L *m*T ve 4 *m*T + 0.5 mg/L NAA içeren ortamlardan elde edilirken, TDZ içeren ortamlarda hiç sürgün oluşumu gözlenmemiştir (Tablo 3.4).

BAP içeren ortamlarda ise eksplant başına sürgün sayısı 1.042- 3.215 adet arasında değişim göstermiştir. Yaprak eksplantına ait veriler incelendiğinde ise en yüksek eksplant başına sürgün sayısı sırasıyla 4.132, 3.997 ve 3.930 adet ile 4 mg/L *m*T, 2 mg/L BAP ve 1 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA içeren ortamlarda tespit edilmiştir. Benzer şekilde yaprak eksplantında da TDZ içeren ortamlarda sürgün oluşumu gerçekleşmemiştir. Eksplantların ortalamasında ise en yüksek eksplant başına sürgün sayısı 1 mg/L *m*T ve 4 mg/L *m*T içeren ortamlarda kaydedilmiştir.



Şekil 3. Yaprak (a) ve kotiledon (b) eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu

3.2. Kotiledon Boğum Eksplantlarında Sürgün Rejenerasyonu

Çoklu sürgün oluşumunun amaçlandığı denemelerde kotiledon boğum eksplant olarak kullanılmıştır. İzole edilen kotiledon boğum eksplantları ya farklı 0.3-1.2 mg/L TDZ, 1-4 mg/L BAP veya 0.5-4 mg/L *m*T konsantrasyonları ya da bunların 0.5 mg/L NAA kombinasyonlarını içeren MSO besin ortamında Magenta kapları içerisinde kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcında 6-7 hafta sonra sürgün oluşturan eksplant sayısı ve eksplant başına sürgün sayısı parametreleri belirlenmiştir. Tablo 3.5'te varyans analizi sonuçları incelendiğinde sürgün oluşturma oranı ve eksplant başına sürgün sayısı parametrelerine ortamların etkisi %1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Sürgün oluşturma oranına ait ortalama değerler ve arcsinüs transformasyon değerleri Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.5. Farklı büyüme düzenleyicilerin *C. amaena*'da kotiledon boğum eksplantında sürgün oluşum oranı ve eksplant başına sürgün saysına etkisine ait varyans analizi tablosu

Varyasyon kaynakları	**Serbestlik Derecesi**	**F değeri**	
		Sürgün Oluşturma Oranı	**Eksplant Başına Sürgün Sayısı**
Ortam	19	10.917**	83.341**
Hata	60	--	--
Genel	79	--	--

** %1 düzeyinde önemli * %5 düzeyinde önemli

Kotiledon boğum eksplantında sürgün oluşturma oranı %12.502 - 87.500 arasında değişim göstermiştir (Tablo 3.6). En düşük sürgün oluşturma oranları 0.3 veya 0.6 mg/L TDZ ve 0.5 mg/L NAA ilaveli ortamlardan elde edilmiştir. BAP içeren ortamlarda sürgün oluşturma oranı %83.330-87.500, *m*T içeren ortamlarda ise %58.330-87.497 arasında değişim göstermiştir. 4 mg/L *m*T+0.5 mg/L NAA içeren ortam dışında kalan BAP ve *m*T içeren ortamlar istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır. TDZ içeren ortamlarda ise sürgün oluşum oranı %12.502-41.667 arasında değişim göstermiş olup diğer ortamlardan düşük olmuştur.

Tablo 3.6. Farklı büyüme düzenleyicilerin *C. amaena*' da kotiledon boğum eksplantında sürgün oluşum oranı üzerine etkisi

Ortamlar	Sürgün Oluşturma Oranı (%)	Transformasyon Değerleri
1 mg/LBAP	87.500	75.160 a
2 mg/L BAP	87.497	71.927 ab
4 mg/L BAP	83.332	69.136 abc
1 mg/LBAP + 0.5 mg/L NAA	83.330	65.903 abc
2 mg/L BAP+ 0.5 mg/L NAA	83.332	69.136 abc
4 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA	87.500	75.160 a
0.5 mg/L *m*T	87.497	71.927 ab
1 mg/L *m*T	87.497	71.927 ab
2 mg/L *m*T	83.330	65.903 abc
4 mg/L *m*T	70.827	57.524 a-d
0.5 mg/L mT + 0.5 mg/L NAA	66.660	54.732 b-e
1 mg/L *m*T+0.5 mg/L NAA	74.995	60.317 abc
2 mg/L *m*T+0.5 mg/L NAA	83.330	65.903 abc
4 mg/L *m*T+0.5 mg/L NAA	58.330	49.866 cde
0.3 mg/L TDZ	29.165	28.881 fg
0.6 mg/L TDZ	37.497	37.697 ef
1.2 mg/L TDZ	41.667	39.774 def
0.3 mg/L TDZ+0.5 mg/L NAA	12.502	18.073 g
0.6 mg/L TDZ+0.5 mg/L NAA	12.502	18.073 g
1.2 mg/L TDZ+0.5 mg/L NAA	25.000	26.090 fg

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık %5 düzeyinde önemlidir

Tablo 3.7. Farklı büyüme düzenleyicilerin *C. amaena*' da kotiledon boğum eksplantında eksplant başına sürgün sayısına etkisi

Ortamlar	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)
1 mg/LBAP	2.867 ef
2 mg/L BAP	3.582 de
4 mg/L BAP	2.445 f
1 mg/LBAP + 0.5 mg/L NAA	3.000 ef
2 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA	2.750 f
4 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA	2.685 f
0.5 mg/L mT	5.375 c
1 mg/L *m*T	5.165 c
2 mg/L *m*T	6.250 b
4 mg/L *m*T	9.975 a
0.5 mg/L mT + 0.5 mg/L NAA	2.750 f
1 mg/L *m*T + 0.5 mg/L NAA	4.137 d
2 mg/L *m*T + 0.5 mg/L NAA	2.750 f
4 mg/L *m*T + 0.5 mg/L NAA	3.000 ef
0.3 mg/L TDZ	0.875 g
0.6 mg/L TDZ	1.375 g
1.2 mg/L TDZ	1.083 g
0.3 mg/L TDZ + 0.5 mg/L NAA	0.750 g
0.6 mg/L TDZ + 0.5 mg/L NAA	0.750 g
1.2 mg/L TDZ + 0.5 mg/L NAA	0.833 g

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık %5 düzeyinde önemlidir

Kotiledon boğum eksplantında eksplant başına elde edilen sürgün sayıları 0.750 ile 9.975 arasında değişim göstermiş olup, en yüksek eksplant başına sürgün sayısı 4 mg/L *m*T, en düşük ise TDZ içeren ortamlardan elde edilmiştir (Şekil 4). BAP içeren ortamlar kendi aralarında değerlendirildiğinde en fazla eksplant başına sürgün sayısı 3.582 adet ile 2 mg/L BAP içeren ortamda belirlenmiştir. Sadece *m*T içeren ortamlarda ise artan *m*T dozlarına bağlı olarak eksplant başına sürgün sayısının arttığı, *m*T-NAA kombinasyonlarında ise sadece *m*T içeren ortamlara göre eksplant başına sürgün

sayısında bir düşüş kaydedilmemiştir. TDZ içeren ortamlarda eksplant başına sürgün sayısı 0.750-1.375 adet arasında ve oldukça düşük tespit edilmiştir.

3. 3. Köklendirme

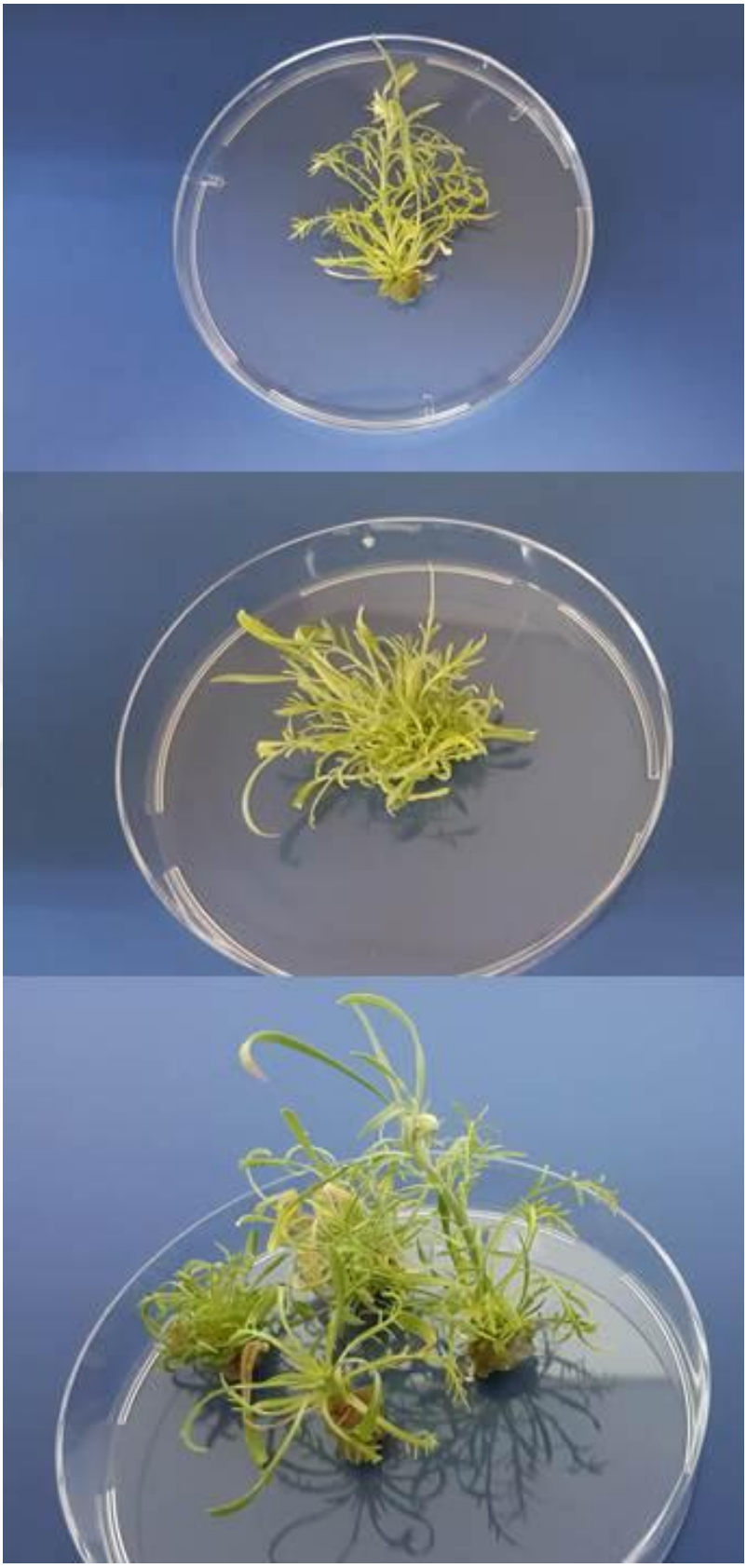
Gelişen sürgünleri köklendirmek amacıyla 0.5, 1 veya 2 mg/L IBA ilaveli MS1 besin ortamı kullanılmıştır. Köklenen sürgünler sayılarak köklenme oranları belirlenmiştir (Şekil 5). Yapılan varyans analizi sonucunda uygulanan oksin dozların köklenme oranı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Tablo 3.8). Köklenme oranı 0.5 mg/L IBA, 1 mg/L IBA ve 2 mg/L IBA içeren ortamlarda sırasıyla %33.33, %38.89 ve %50.00 olarak belirlenmiştir (Tablo 3.9).

Tablo 3.8. Farklı IBA konsantrasyonlarının *C. amaena*'da sürgünlerin köklenme oranına etkisine ait varyans analizi

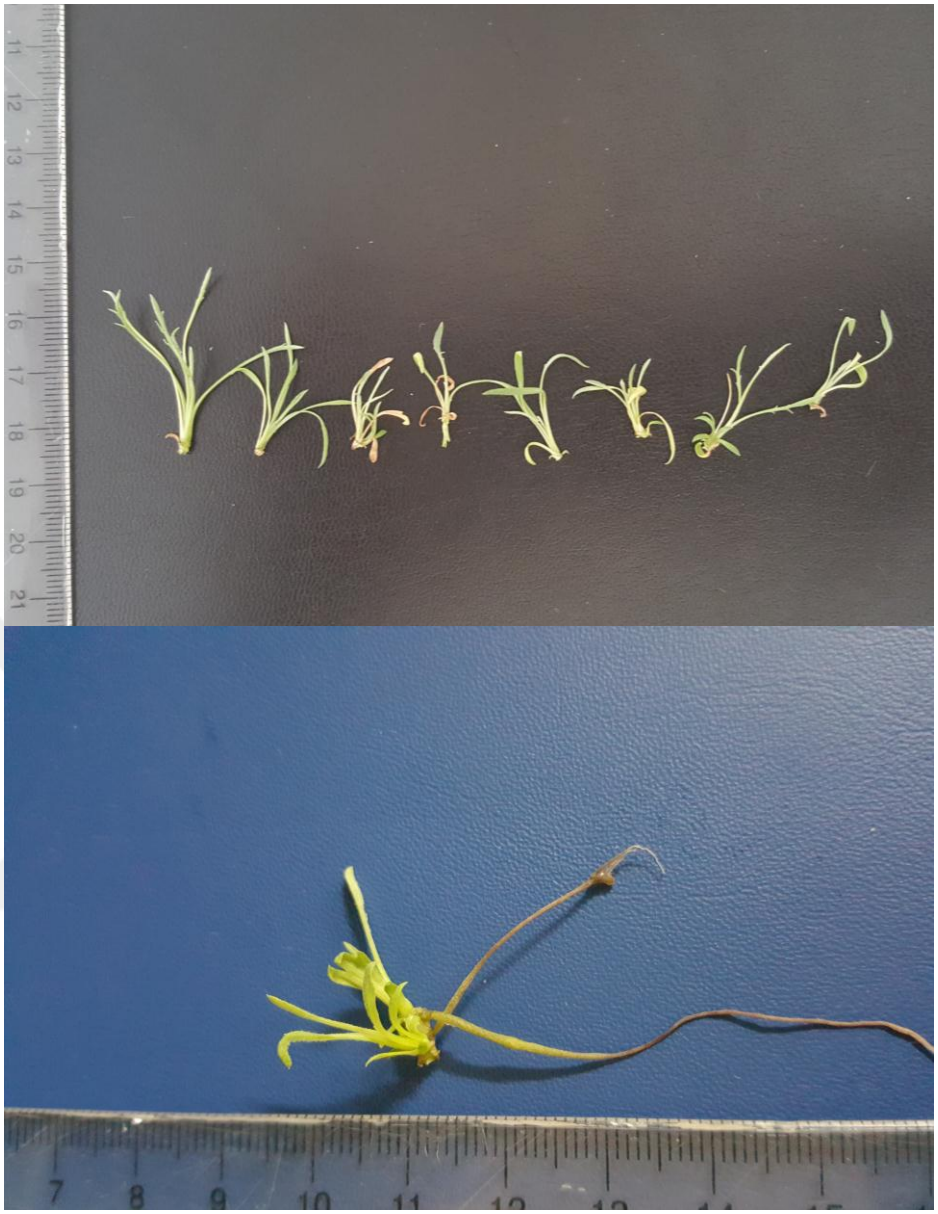
Varyasyon kaynakları	**Serbestlik Derecesi**	**F değeri**
		Kök Oluşturma Oranı
Ortam	2	1.750
Hata	6	
Genel	8	

Tablo 3.9. Farklı IBA konsantrasyonlarının *C. amaena*'da sürgünlerin köklenme oranına etkisi

Ortamlar	**Kök Oluşturma Oranı (%)**	**Transformasyon Değerleri**
0.5 mg/L IBA	33.33	35.26
1 mg/L IBA	38.89	38.51
2 mg/L IBA	50.00	45.00



Şekil 4. Kotiledon boğumlarda sürgün çoğaltımı



Şekil 5. Sürgünlerin köklendirilmesi

4. BÖLÜM
TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1.Tartışma

Centaurea cinsinde meyveler "aken" olarak adlandırılmaktadır. *Centaurea amaena'da* akenler öncelikle %50 sülfürik asitte 1 dakika bekletilmiş daha sonra durulanarak %50 çamaşır suyunda 10 dakika steril edilmiştir. Bu yöntem ile %100 sterilizasyon başarısı elde edilirken çimlenme oranı ortalama %85 olarak kaydedilmiştir. Daha önce *Centaurea* cinsinde yapılan çalışmalarda *C. lycaonica'*da %50 çamaşır suyu ile sterilizasyon sonucunda %12-20, *C. arifola'*da sülfürik asit uygulaması ve daha sonra %4.5 (w/v) sodyum hipoklorit uygulamasından sonra %25 çimlenme oranı elde edilmiştir. Yüzbaşıoğlu vd. (2012) *C. arifola'*da, Atalay ve Erişen (2017) *C. lycaonica* ve Özel vd. (2006), *C. tchihatcheffii'*de çimlenme oranının çok düşük olduğunu bildirirken bu çalışmaya benzer şekilde *C. zeybekii'*de %80 çimlenme oranı elde edilmiştir (Kurt ve Erdağ, 2009).

C. amaena'da organogenesis ile bitki rejenerasyonu elde etmek amacıyla steril fidelerden izole edilen kotiledon ve yaprak eksplantları farklı BAP, TDZ ve *m*T konsantrasyon ve NAA kombinasyonlarını içeren 20 farklı ortamda kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 6-7 hafta sonra *C. amaena*'da kallus ve sürgün oluşum oranları ile eksplant başına sürgün sayıları belirlenmiştir. Deneme sonucunda kallus oluşum oranları %52.20-100 değişim göstermiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda kallus oluşum oranı üzerine eksplant tipinin istatistiksel olarak bir etkisi bulunmamakla birlikte kullanılan BBD konsantrasyon ve kombinasyonlarının etkisi önemli bulunmuştur ($P<0.01$). En fazla kallus oluşum oranları BAP, BAP-NAA, *m*T -NAA, TDZ ve TDZ-NAA uygulamalarında elde edilmiştir. Benzer şekilde Atalay ve Erişen (2017) *C. lycaonica* 'da kallus oluşumunun BBD'lere göre değiştiğini; BAP-NAA ve TDZ-NAA kombinasyonlarında kallus oluşumunun yüksek olduğunu bildirmektedir.

Ayrıca *C. lycaonica* elde ettikleri kallusların morfolojilerinde de BBD tip ve kombinasyonuna göre farklılık olduğunu belirlemişlerdir.

Sürgün oluşturma oranı ve eksplant başına sürgün sayısı parametrelerinde ortam ve ortam*eksplant interaksiyonu istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.01$). Sürgün oluşum oranı kotiledon eksplantında %0-57.50 arasında, yaprak eksplantında ise %0-62.50 arasında değişim göstermiştir. Her iki eksplantta da TDZ içeren ortamlarda kallus oluşurken sürgün oluşumu gözlenmemiştir. Benzer şekilde Atalay ve Erişen (2017) *C. lycaonica* ve Aydoğan ve Erdağ (2015) *Centaurea zeybekii'* de TDZ içeren ortamlarda kallus oluşmasına rağmen sürgün rejenerasyonu elde edememişlerdir. Kazeroonian vd. (2018), sitokinin tipinin rejenerasyon tipini etkilediğini ve *Chrysanthemum morifolium*'da TDZ'nin sürgün rejenerasyonundan çok kallus oluşumunu teşvik ettiğini bildirmişlerdir. Dewir vd. (2018) ise TDZ'nin rejenerasyonda bir takım anormalliklere neden olabileceğini ve düşük konsantrasyonlarda TDZ kullanımı ve kısa süreli TDZ çözeltisine batırma gibi yöntemlerin TDZ'nin neden olduğu anormallikleri bertaraf etmek için etkili yöntemler olduğunu ifade etmektedir. Ancak TDZ'nin bir çok bitki türünde sürgün rejenerasyonunda etkili güçlü bir sentetik sitokinin benzeri madde olduğu da farklı araştırıcılar tarafından bildirilmektedir (Erişen vd., 2011; Yorgancılar ve Erişen, 2011).

En fazla eksplant başına sürgün sayısı kotiledon eksplantında 1 mg/L *m*T, 4 mg/L *m*T, 1-2-4 mg/L *m*T + 0.5 NAA, yaprak eksplantında ise 4 mg/L *m*T, 2 mg/L BAP ve 1 mg/L BAP+0.5 NAA içeren ortamlarda belirlenmiştir. En fazla adventif sürgün rejenerasyonu elde edilen BBD tipi ve konsantrasyonu eksplantlara göre farklılık göstermiştir. Benzer şekilde Uzun (2012) korungada ve Erişen vd. (2011) *Astragalus cariensis'*te yürüttükleri çalışmalarda eksplant tipine göre BBD konsantrasyon ve kombinasyonlarının farklılık gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Magyar-Tabori vd. (2010), bir kültürün başarısının uygulanan sitokininlerin tür ve konsantrasyonundan etkilendiğini ve bunun nedeninin ise sitokininlerin alımı, taşınması ve metabolizmasının çeşitlere göre değişmesi ve eksplantların sahip olduğu endojen sitokininleri ile etkileşimi olduğunu ifade etmektedir.

Kotiledon boğum eksplantından aksiller sürgün rejenerasyonunun amaçlandığı denemelerde sürgün rejenerasyonu oluşum oranı ve eksplant başına sürgün sayısı

üzerine ortamların etkisi önemli bulunmuştur (P<0.01). Kotiledon boğum eksplantında sürgün oluşum oranı %12.50- 87.50 arasında değişim göstermiş olup, en yüksek sürgün rejenerasyonu oluşum oranı BAP, BAP-NAA, *m*T ve *m*T+NAA içeren ortamlardan elde edilmiştir. Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı 9.975 adet ile 4 mg/L *m*T içeren ortamdan elde edilmiştir. Sadece metatopolin içeren ortamlarda eksplant başına sürgün rejenerasyonunun BAP ve TDZ'den daha yüksek olduğu belirlenmiştir. BAP içeren ortamlar kendi aralarında değerlendirildiğinde ise en fazla eksplant başına sürgün sayısı 3.582 adet ile 2 mg/L BAP içeren ortamdan elde edilmiştir. Daha önce *Centaurea ultreiae'*da sürgün uçları (Mallón vd., 2010) ve *Centaurea lycaonica'*da ise boğumlarda yapılan çalışmalarda (Atalay ve Erişen 2017) aksiler sürgün rejenerasyonunda BAP'ın uygun bir sitokinin olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada da benzer şekilde sitokinin kaynağı olarak BAP, TDZ'den daha etkili bulunmuş ancak en etkili sitokinin *m*T olarak belirlenmiştir. *Centaurea* türleri ile yapılan çalışmalarda *m*T'nin sitokinin kaynağı olarak kullanıldığı çalışmalara rastlanılmamıştır ancak kasava ve pelargonium gibi bitkilerde yapılan çalışmalarda *m*T'nin *in vitro* sürgün oluşumunu ve sürgünlerin kalitesini arttırdığı bildirilmektedir (Wojtania, 2010; Kőszeghi vd., 2014; Chauhan ve Taylor, 2018). Fajinmi vd., (2014), *m*T 'nin bu etkinliğinin nedenini *m*T 'nin yan zincirindeki hidroksil grubundan O-glukoside metabolitlerin (toksik olmayan ve kolayca dönüştürülebilir sitokinin depolama formu) üretilmesine izin veren kimyasal yapısına ve bunun bitki dokularında hızlı translokasyonuna bağlamaktadır. Bu çalışmada sadece *m*T içeren ortamlarda artan *mT* dozlarına bağlı olarak eksplant başına sürgün sayısının arttığı görülmektedir. Benzer şekilde *Pyrus communis'*te de artan *m*T dozlarına bağlı olarak rejenerasyonun arttığı bildirilmektedir (Dimitrova vd., 2016).

Kotiledon boğum eksplantında *m*T -NAA kombinasyonlarında ise sadece *m*T içeren ortamlara göre eksplant başına sürgün sayısında bir düşüş gözlenmiştir. Ancak *Coleonema album*'da ve *Huernia hystrix'de* bu çalışmaya zıt olarak *m*T-NAA kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısını artırdığı bildirilmektedir (Fajinmi et al 2014; Amoo ve Van Staden 2013). Bu farklılıklar oksinlerin bitki türüne ve doku tipine bağlı olarak sitokininlerle sinerjistik, antagonistik ve ilave etkileşime girmesinden kaynaklanmış olabilir (Coenen ve Lomax 1997).

Rejenere olan sürgünler 0.5, 1 veya 2 mg/L IBA içeren MS1 besin ortamında köklendirilmiştir. Kök oluşturan sürgün yüzdesi sırasıyla %33.33. %38.88 ve %50

olarak belirlenmiştir. IBA' nın *C. rupestris. C. arifola* türlerinde de rejenere edilmiş sürgünlerin köklenmesini teşvik etmek için iyi bir oksin olduğu Yüzbaşıoğlu vd. (2012) ve Curkovic-Perica (2003) tarafından da bildirilmektedir.

4.2. Sonuç ve Öneriler

Bazı endemik ve tehlike altındaki *Centaurea* cinsine ait türlerin korunmasına yönelik mikroçoğaltım protokolleri üzerine çalışmalar bulunmakla birlikte Türkiye'nin kritik tehlike altında ve endemik bitkilerden olan *Centaurea amaena*'nın *in vitro* çoğaltılması ile ilgili yayınlanmış herhangi bir literatür bilgisine rastlanılmamıştır. Bu çalışma ile kritik tehlike altında endemik *C. amaena*'nın doku kültü ile çoğaltımı amaçlanmıştır.

Araştırma sonucunda elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- *C. amaena* da kotiledon ve yaprak eksplantlarında eksplant başına 4 adet, kotiledon boğumlardan ise eksplant başına yaklaşık 10 adet sürgün elde edilmiştir.

- *C. amaena*'da yaprak, kotiledon ve kotiledon boğumlarda sürgün rejenerasyonu üzerine BAP ve *m*T'nin TDZ'ye göre daha etkili bir sitokinin kaynağı olduğu gözlenmiştir.

- TDZ daha çok kallus oluşumuna neden olmuştur.

- Sürgün oluşum oranı ve eksplant başına sürgün sayısı ekplant tipi ve büyümeyi düzenleyici tip ve konsantrasyonundan önemli ölçüde etkilenmiştir.

Araştırma sonucunda doku kültürünün *C. amaena*'nın çoğaltılmasında alternatif bir yöntem olabileceği sonucuna varılmıştır. Yapılan literatür taramasında türün yüksek fenolik ve flavonoid içeriği ile yüksek antimikrobial ve antioksidant etkiye sahip olduğu bu nedenle doku kültürü ile elde edilen materyalde doğal popülasyona baskı oluşturmadan antimikrobial etkinin incelenmesi yönünde çalışmalara devam edilmesi önerilmektedir.

KAYNAKÇA

1. Akçiçek, E., Vural, M. 2007. Kumalar dağı (Afyonkarahisar)'nın endemik ve nadir bitkileri. **Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, 9(2): 78-86.
2. Alaiwi, W. A., Sairam, R. V., Josekutty, P. C., Potlakayala, S. D., Karelia, D,. Goldman, S. L., 2012. *In vitro* regeneration. flowering and cell culture of *Centaurea* species. **African Journal of Biotechnology**, **11**(9). 2296-2302**.**
3. Albayrak, S., Aksoy. A., Atasagun. B., 2014. *Centaurea amaena* Boiss'in fenolik bileşik ve biyoaktivite yönünden incelenmesi. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi. 23-27 Haziran 2014.
4. Amoo, S. O., Van Staden, J., 2013. Influence of plant growth regulators on shoot proliferation and secondary metabolite production in micropropagated *Huernia* hystrix. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 112**(2). 249-256.
5. Arif, R., Küpeli. R., Ergun. F., 2004. The Biological activity of *Centaurea* L. Species. **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 17**:4. 149-164.
6. Atalay, E., Erisen, S. 2017. High frequency regeneration of critically endangered endemic plant *Centaurea lycaonica*. **Fresenius Environmental Bulletin, 26**(11), 6356-6363.
7. Atalay, E., Erkoyuncu, M. T., Erişen, S., Yorgancılar, M., 2017. Endemik *Astragalus trojanus* Stev'in Nodal Kültür ile Mikroçoğaltımı. **YYÜ TAR BİL DERG (YYU J AGR SCI), 27**(2). 268-275.
8. Atasagun B., 2012. *Centaurea amaena* Boiss. & Balansa'nın autekolojisi ve koruma biyolojisi. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. Kayseri. 112 s.
9. Atasagun B., Aksoy A., Martin E., Uzun O., 2013. Morphological. anatomical. palynological. karyological and autecological characters of *Centaurea amaena* Boiss. & Balansa [Sect. Phalolepis (*Centaurea*/Asteraceae)]. **Plant Syst Evol, 299**:1761–1767.
10. Atasagun, B., & Aksoy, A. 2018. Autecology and conservation biology of *Centaurea amaena* (Asteraceae).**JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences, 28**(1).

11. Aydoğan, S.K., Erdağ, B., 2015. Callus induction and adventitious shoot regeneration of *Centura zeybekii* endangered endemic plant**. Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi**. 4:2. 1-8.
12. Chauhan, R. D., Taylor, N. J. 2018. Meta-topolin stimulates de novo shoot organogenesis and plant regeneration in cassava.**Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 132**(1), 219-224.
13. Coenen, C., Lomax, T. L. 1997. Auxin—cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools.**Trends in plant science, 2(9),** 351-356.
14. Cuenca. S., Amo-Marco. J. B., 2000. *In vitro* propagation of *Centaurea spachii* from inflorescence stems. **Plant growth regulation, 30**(2). 99-103.
15. Cuenca. S., Amo-Marco. J. B., Parra. R., 1999. Micropropagation from inflorescence stems of the Spanish endemic plant *Centaurea paui* Loscos ex Willk.(Compositae). **Plant Cell Reports, 18**(7-8). 674-679
16. Curkovic-Perica. M., 2003. *In vitro* propagation of *Centaurea rupestris* L. Acta **Biologia Cracoviensia**. 45:2. 127-130.
17. Çölgeçen, H., Koca, U., Yagci, C., Toker, G., Toker, M. C., & Vural, M. 2012. Callus induction and secondary metabolite production studies in *Centaurea tchihatcheffii* Fisch. & CA Mey. FABAD **Journal of Pharmaceutical Sciences, 37**(1), 9
18. Demirel, S., Türkoğlu, N., Özdemir, F. A., 2017. Comparison of germination abilities of *Centaurea* sp. under in vivo and in vitro conditions. **Progress in Nutrition, 19**(1-S), 105-111.
19. Dewir, Y. H., Naidoo, Y., da Silva, J. A. T. 2018. Thidiazuron-induced abnormalities in plant tissue cultures. **Plant Cell Reports, 37**(11), 1451-1470.
20. Dimitrova, N., Nacheva, L., Berova, M. 2016. Effect of meta-topolin on the shoot multiplication of pear rootstock OHF-333 (*Pyrus communis* L.). **Hortorum Cultus—Acta Scientiarum Polonorum, 15,** 43-53.
21. Erdağ, B., Emek Y., 2005b. *In vitro* micropropagation of *Anthemis xylopoda* O. Schwarz. a critically endangered species from Turkey. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 8 (5): 691-695.
22. Erdağ, B., Emek. Y,. 2005a. *In vitro* adventitious shoot regeneration of *Liquidambar orientalis* Miller. **Journal of Biological Sciences, 5**(6): 805-808.

23. Erişen. S., Atalay. E., Yorgancilar. M., 2011. The effect of thidiazuron on the *in vitro* shoot development of endemic *Astragalus cariensis* in Turkey. **Turkish Journal of Botany, 35**(5). 521-526.

24. Eskin. B., 2011. *Centaurea kılaea Boiss.* ve *C. consanguinea* DC (Compositae/Asteraceae) endemik türlerinin aotekolojik özelliklerinin karşılaştırılması. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. İstanbul. 169 s.

25. Fajinmi, O. O., Amoo, S. O., Finnie, J. F., & Van Staden, J. 2014. Optimization of in vitro propagation of *Coleonema album*, a highly utilized medicinal and ornamental plant. **South African Journal of Botany, 94:** 9-13.

26. Gorgorov. R., Stanilova. M., Bancheva. S., 2011. *In vitro* cultures of Balkan and Bulgarian endemic *Centaurea* species. **Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies.** 15.

27. Göztaş. T., 2008. Bazı Bitkisel Hormonların *Centaurea kotschyi* (Boiss. & Heldr.) Hayek var. Kotschyi Bitkisinin Tohum Çimlenmesi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması. Selçuk Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Konya. 37 s.

28. Hammatt, N., Evans, P. K. 1985. The *in vitro* propagation of an endangered species: *Centaurea junoniana* Svent.(Compositae). **Journal of Horticultural Science, 60**(1), 93-97.

29. Kazeroonian, R., Mousavi. A., Jari. S. K., Tohidfar. M., 2018. Factors Influencing *in vitro* Organogenesis of *Chrysanthemum morifolium* cv.'Resomee Splendid'. **Iranian journal of biotechnology,** 16(2).

30. Kőszeghi, S., Bereczki, C., Balog, A., & Benedek, K. 2014. Comparing the effects of benzyladenine and meta-Topolin on sweet basil (*Ocimum basilicum*) micropropagation. **Notulae Scientia Biologicae, 6**(4), 422-427.

31. Kurt S., Erdağ. B., 2009. *In vitro* germination and axillary shoot propagation of *Centaurea zeybekii*. **Biologia, 64**:1. 97-101.

32. Magyar-Tábori, K., Dobránszki, J., da Silva, J. A. T., Bulley, S. M., Hudák, I. 2010. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 101(**3), 251-267.

33. Mallón. R., Rodríguez-Oubiña. J., González. M. L., 2010. *In vitro* propagation of the endangered plant *Centaurea ultreiae*: assessment of genetic stability by

cytological studies. flow cytometry and RAPD analysis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 101**(1). 31-39.

34. Murashige. T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. **Physiologia Plantarum, 15**: 473–497.
35. Okay, Y., Ellialtıoğlu, Ş., Demir, K., Tıpırdamaz, R., Savcı, A.E., Özler, H., Gümüş, C., Günöz, A., 2014. Sentorya (*Centaurea tchihatchefii* Fish. &Mey.) Endemik Bitkisinin Çoğaltımı Üzerinde Çalışmalar. **Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi, 7**(1). 42-48.
36. Özel, Ç.A., Khawar, K.M., Mirici, S., Ozcan S., Arslan, O., 2006. Factors affecting *in vitro* plant regeneration of the critically endangered Mediterranean knapweed (*Centaurea tchihatcheffii* Fisch et. Mey). **Naturwissenschaften, 93**:511–517.
37. Pevalek-Kozlina, B. 1998. In vitro germination of *Centaurea ragusina* L., a crotian endemic species. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 40;** 21-24.
38. Şehirali, S., Özgen, M., Karagöz, A., Sürek, M., Adak S., Güvenç, İ., Tan, A., Burak, M., Kaymak, Ç., 2015. Bitki Genetik Kaynaklarının Korunma Ve Kullanımı. http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/7e8e17134dd7083_ek.pdf (Erişim Tarihi: 25.07.2019)
39. Snedecor , G.W., Cochran, W.G. 1967. Statisticak Methods. The Iowa State University Press, Iowa, USA.
40. Traykova, B., Bancheva, S., Gorgorov, R., Delcheva, M., Stanilova, M., 2015. *Ex situ* and *in situ* conservation of *Centaurea pseudaxillaris*. **Biotechnologies & Applied Biology,** SE/Online: 137-145.
41. Türkoglu, N., Ozdemir, F.A., Keskin, N., Khawar, K.M., 2018. Efficient protocol for multiple micro-shoot regeneration from endanger, endemic and ornamental plant *Centaurea fenzlii* reichardt**. Fresenius Environmental Bulletin, 27**(2), 1076-1080.
42. Uzun S., 2012. Korunganın (*Onobrychis viciifolia* Scop.) hipokotil ve kotiledon eksplantlarından adventif sürgün rejenerastonu. **Türk Doğa ve Fen Dergisi, 1**: 126-130.
43. Valletta, A., Santamaria, A.R., Fabrini, G., Tocci, N., Filho, V.C., Wagner, T., Brasili, E., Pasqua, G., 2016. Strategies for *ex situ* conservation of *Centaurea*

cineraria subsp. circae (Asteraceae). an endemic plant from Lazio (Italy). **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 150**(2). 323-332.

44. Wojtania, A. 2010. Effect of meta-topolin in vitro propagation of *Pelargonium x hortorum* and *Pelargonium x hederaefolium* cultivars. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 79**(2), 101-106.
45. Yorgancilar, M., Erisen, S. 2011. The effect of thidiazuron (TDZ) on shoot regeneration of *Astragalus schizopterus*. **Journal of Animal and Plant Sciences, 21**(3), 519-524.
46. Yüzbaşıoğlu, E., Dalyan. E., Bona, M., Ö,. G., 2012. *İn vitro* propagation of endemic plant *Centaurea arifola* Boiss, Taxa. **IUFS Journal of Biology, 71**:(2) 121-127.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı:	Özge EKİNCİ
Uyruğu:	Türkiye (T.C)
Doğum Tarihi ve Yeri:	18.12.1989 – Sivas
Medeni Durum:	Bekar
e-mail:	ozgeekinci00@gmail.com
Yazışma Adresi:	Emek mah. Buhara cd. Ateşler apt. 36/4 Merkez/Sivas

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Tarla Bitkileri	2019
Lisans	Erciyes Üniversitesi. Tarla Bitkileri	2014
Lise	Halil Rıfat Paşa Lisesi. Sivas	2007

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2015-2016	Timac Agro Avrasya	1 Yıl
2016-2018	Doğa Koleji	2 Yıl

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

Ekinci, O., Uzun, S., Özaktan, H., Atasagun, B., 2017. In vitro propagation of endemic *Centaurea amaena* Boiss. & Balansa**.** International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies, Nevşehir, Türkiye. 15- 7 May 2017. cilt.1. ss.376