

Kritik Tehlike Altındaki Endemik Bitki *Rhaponticoides mykalea* (Hub.-Mor.)'nın

***In vitro* Tohum Çimlenmesi Üzerine Araştırmalar**

Yelda EMEK ve Bengi ERDAĞ

Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü,

yelda@adu.edu.tr

Özet

Bu çalışmada kritik tehlike altında olan endemik bitki *Rhaponticoides mykalea* tohumlarının tohum canlılığı ve *in vitro* çimlenmesini etkileyen faktörler araştırılmıştır. Bitki tohumlarının çimlenmesine ilişkin ön bilgiler edinmek üzere bitkinin doğal yaşama ortamından alınmış toprakların bulunduğu saksılarda da çimlenme denemeleri gerçekleştirilmiştir.

Tohum canlılık testi sonunda bitki tohumlarının % 80 oranında canlı olduğu belirlenmiş ve bitki tohumlarının dormansi periyodlarının tamamlanması için 8 aylık bir zamana ihtiyaç duyduğu görülmüştür. Dormansi periyodu sonunda saksıda gerçekleştirilen denemelerde % 70 oranında çimlenme elde edilmiştir. *In vitro* çimlenme üzerine farklı *in vitro* ortamların, bitki büyüme düzenleyicilerinin, soğuk uygulamasının, potasyum nitratın, testanın çizilmesi ve asitle muamelenin, pH'ın, ışık-karanlık uygulamalarının ve farklı sıcaklık değerlerinin etkisi araştırılmıştır. Ancak *in vitro* teknikler kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde çimlenme yüzdesinin düşük olduğu saptanmıştır. En yüksek çimlenme yüzdesi pH 7.5 olan distile su ortamında 18 °C'de ve karanlıkta % 30 olarak belirlenmiştir. Ancak denemeler sırasında çimlenmiş olan tohumların radikula çıkışı sonrasında kontamine olarak ölmesi yüzeysel sterilizasyonla engellenemeyen içsel bir kontaminantın varlığına işaret etmiştir. Çalışma sonucunda *R. mykalea* bitkisinin *in vitro* teknikler kullanılarak çoğaltılması çalışmalarında başlangıç materyali olarak tohum kullanılmasının uygun bir araç olmadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Rhaponticoides mykalea*, *in vitro*, çimlenme

Researchs on In vitro Seed Germination of The Critically Endangered Endemic Plant

***Rhaponticoides mykalea* (Hub.-Mor.)**

Abstract

In this study, the factors affecting *in vitro* seed germination and viability of the seeds of critically endangered endemic plant *Rhaponticoides mykalea* were investigated. For achieving a prior knowledge about seed germination of the plant, seed germination experiments were carried out in pots containing the soil which was collected from the natural environment of the plant.

In result of the viability test of the seeds, it was found that the seeds have 80 % viable and need a period of 8 months to complete their dormancy periods. The experiment conducted in pots after the dormancy period showed a germination rate of 70 %. Effects of different *in vitro* media, plant growth regulators, the cold application, potassium nitrate, acid treatment and testa drawing, pH, light-dark applications and different temperature values on *in vitro* seed germination were investigated. However, in the experiments performed using *in vitro* techniques, germination percentage was observed as low. The highest germination percentage was obtained in distilled water adjusted to pH 7.5, and 18 °C in the dark conditions (30 %). However, death and contamination after emergence of radicle during the germination experiments of seeds was indicated the presence of an internal contaminant which can not be sterilised by external application. Thus was it concluded that using the seeds as starting material for *in vitro* propagation of *R. mykalea* plant was inappropriate.

Key words: *Rhaponticoides mykalea*, *in vitro*, germination

1.Giriş

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

Endemik bitkiler ancak kendi isteklerini sağlayabilecek belirli bölgelerde yayılış gösteren, bunun dışındaki bölgelere ise uyum sağlayamayan bitkilerdir. Bu nedenle, varlıklarını sürdürdükleri doğal habitatlarındaki değişimlere karşı oldukça duyarlıdır. Nadir, endemik ve tehdit altındaki türlerin tohum dağılımı ve çimlenme gibi farklı evreleri üzerine edinilen bilgiler, nadirlik fenomeninin kapsamlı biçimde anlaşılmasına katkı sağlayabilir ve türlerin koruma idaresi kararlarına yardım edebilir (Menges, 1986). Laboratuarda kontrollü koşullarda gerçekleştirilen *in vitro* çimlenme denemeleri ile türlerin tohum çimlenme özellikleri ile ilgili çarpıcı sonuçlara ulaşılabilir.

Çalışma materyalimiz *Asteraceae* familyasına ait *Rhaponticoides mykalea* (Hub.-Mor.) M. V. Agab. & Greuter türü, önceleri, sistemde *Centaurea* cinsi altında *Centaurea mykalea* Hub.-Mor. olarak sınıflandırılırken, günümüzde *Centaurea* seksiyonundan ayrılmış bulunmaktadır (Hellwig, 2004). Tür, köylüler arasında "deli enginar" olarak adlandırılmaktadır (Emek ve Erdağ, 2010).

Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı'na (Ekim vd., 2000) göre *R. mykalea*, CR (Critically Endangered- Çok Tehlikede) kategorisinde bulunmaktadır. CR kategorisi kıstasları göz önüne alındığında *R. mykalea*, Aydın- Isparta ve Muğla yörelerindeki çok dar alanlı yayılışı nedeniyle yok olma tehlikesi ile karşı karşıyadır. Oldukça sınırlı sayıda bireye sahip olan tür, turizm sektöründeki hızlı gelişmeler sayesinde devam eden şehirleşmenin giderek artması, tarla açma amacıyla doğal habitatın tahribatı, aşırı otlama ve bitkilerin kapitululmalarının yerel halk tarafından toplanıp yiyecek olarak kullanılması gibi faktörlerin etkisinde güçlü bir antropojenik baskı altındadır (Emek ve Erdağ, 2010). Bu durum zaten potansiyel olarak yok olma tehlikesi altında bulunan türün devamını iyice kısıtlamaktadır.

Yaptığımız literatür araştırması dahilinde *R. mykalea* bitkisinin çimlenme özelliklerinin belirlenmesine yönelik bir çalışmanın olmadığı belirlenmiştir. Bu çalışmada *R. mykalea*'nın *in vitro* tohum çimlenme istekleri ve bu tekniğin bitkinin çoğaltılmasında kullanım uygunluğunun belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyal

Çimlenme denemelerinde *R. mykalea* bitkisine ait kapitulumlardan çıkarılan tohumlar (akenler) başlangıç materyali olarak kullanılmıştır (Şekil 1). İçerisinde tohumları taşıyan akenler kapitulumdan çıkarıldıktan sonra çizgili, dolgun, aynı morfolojik özelliğe ve büyüklüğe sahip olgun akenler seçilerek denemelerde kullanılmıştır.



Şekil 1. Kuru kapitulumdan çıkarılan olgun bir akenin görüntüsü

2.2. Yöntem

Tohum Canlılık Testi

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

Saksıda Gerçekleştirilen Çimlenme Denemeleri

Tohumlar, toplandıktan hemen sonra ve laboratuvar koşullarında saklama sonrası (20-25 °C, % 50-60 nem) birer aylık periyotlarla doğal yaşama ortamından alınan toprağa ekilerek, saksı koşullarında çimlenme denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu denemeler ile tohumların çimlenme fizyolojilerine ilişkin fikir verebilecek sonuçlara ulaşmak amaçlanmıştır.

***In vitro* çimlenme**

Bu denemelerde sterilize edilmiş *R. mykalea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine farklı *in vitro* ortamların, gibberellik asit (GA_3) ve Kinetin (KIN) gibi bitki büyüme düzenleyicilerinin, soğuk uygulamasının, potasyum nitratın, testanın çizilmesi ve asitle muamelenin, pH'ın, ışık-karanlık uygulamalarının ve farklı sıcaklık değerlerinin etkisi araştırılmıştır. Çimlenme kriteri olarak "radikula çıkışı" esas alınmıştır. Çimlenme denemeleri her kavanoza 1'er tohum olacak şekilde 20 tekrarlı olarak yapılmıştır ve tüm denemeler 2 kez tekrar edilmiştir. Sonuçlar 6 hafta sonunda % olarak değerlendirilmiştir.

Tohumların Sterilizasyonu

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

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

***In vitro* Ortamlar**

Bu denemeler tohumlar toplandıktan hemen sonra ve -saksıda gerçekleştirilen çimlenme denemelerinden elde edilen veriler göz önünde bulundurularak- tohum toplanmasından 8 ay sonra olmak üzere iki farklı zamanda yapılmıştır. Çimlenme denemelerinde MS (Murashige ve Skoog, 1962) ve White (WH) (White, 1963) ortamları sıvı olarak hazırlanmış, distile su ortamı ise kontrol olarak kullanılmıştır. Denemeler 190 cc'lik dar uzun bilyeli kağıt köprülü kavanozlarda gerçekleştirilmiştir. Kültürler 24 ± 2 °C'de 16/8 saat fotoperiyotta tutulmuştur.

Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Bu denemelerde bir önceki denemenin en iyi sonucu olan distile su ortamı temel ortam olarak kullanılmıştır. Distile su ortamına bitki büyüme düzenleyicilerden KIN veya GA_3 tek başına (1, 2, 3 ve 4 mg/L) veya KIN: GA_3 kombinasyonları (KIN: GA_3 ; 1:1, 1:2, 1:3, 1:4; 2:1, 2:2, 2:3, 2:4; 3:1, 3:2, 3:3, 3:4; 4:1, 4:2, 4:3 ve 4:4 mg/L) halinde ilave edilmiştir. Ortam pH'ı 5.8'e ayarlanmıştır. Kültürler 24 ± 2 °C'de 16/8 fotoperiyot altında tutulmuştur.

Soğuk Uygulaması (Stratifikasyon)

Dormansi kırıcı metodlardan biri de tohumlara soğuk uygulamasıdır (Kocaçalışkan, 2008). Tohumlar + 4 °C'de 1 ve 2 ay boyunca tutulduktan sonra sterilize edilerek *in vitro* çimlenme denemeleri oluşturulmuştur. Sterilizasyon işlemi uygulanan

tohumlar pH'ı 5.8' e ayarlanmış distile su içeren kavanozlara aktarılmıştır. Kültürler 24 ± 2 °C'de 16/8 fotoperiyot altında tutulmuştur.

Potasyum Nitrat Uygulaması

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

Testanın Çizilmesi (Skarifikasyon) ve Asitle Muamele

Tohumların sert bir testaya sahip olması nedeniyle tohumların bir kısmı jilet yardımıyla çizilmiş, diğer bir kısmı ise 30 sn süre ile konsantre sülfürik asit (H_2SO_4) ile muamele edilmiştir. Daha sonra tohumlar pH'ı 5.8' e ayarlanmış distile su içeren kavanozlara aktarılmıştır. Kültürler 24 ± 2 °C'de ve 16/8 fotoperiyot altında tutulmuştur.

Işık-karanlık uygulaması

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

Farklı pH uygulaması

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

Farklı Sıcaklık Uygulaması

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

3. Bulgular ve Tartışma

Tohum Canlılık Testi

Tohumların çimlenebilmeleri için canlı olmaları gerekmekte ve bu canlılığının belirlenmesi için değişik testler uygulanabilmektedir. Bunlardan biri olan tetrazolium testi, tohumdaki respirasyon enzimlerinin aktivitesine bağlı olarak, canlı tohumları cansız tohumlardan ayıran biyokimyasal bir testtir. Testin uygulanması sırasında tohumların su almasıyla dehidrogenaz enziminin aktivitesi artar, bu da hidrojen iyonlarının salınımına yol açar. Salınan hidrojen iyonları renksiz tetrazolium tuz çözeltisini, formazan adı verilen kimyasal bileşiğe indirger. Formazan solunum yapan canlı hücreleri kırmızı renge boyar, cansız hücreler ise renk almaz. Tohumların canlılığına, tohumdaki dokuların boyanıp - boyanmamasına göre karar verilir (ISTA, 1966).

Araziden toplanan kapitulumlardan çıkarılan akenlere uygulanan tetrazolium testi sonucunda çok az boyanan ve koyu kırmızı renk alan embriyolar sırasıyla % 5 ve % 80 olarak belirlenmiştir. Tohumların % 15'inde ise herhangi bir renk oluşumu gözlenmemiştir. Leveck (1962) tarafından belirlenen yöntem dikkate alınarak az boyanan embriyoların canlı olmadığı varsayılmış tohum canlılığı % 80 olarak belirlenmiştir. Ayrıca sterilize edilmiş tohumlara uygulanan tetrazolium testi sonucunda tohum canlılığı yüzdesinin değişmediği görülmüş, sterilizasyon süresinin embriyoya zarar vermediği belirlenmiştir.

Saksıda Gerçekleştirilen Çimlenme Denemeleri

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

Ana bitkiden ayrılan tohumların hemen çimlenmedikleri ve bir dinlenme fazına girdikleri bilinmektedir (Mayer ve Poljakoff-Mayber, 1982; Taiz ve Zeiger, 1998). Primer dormansi olarak tanımlanan bu dinlenme hali, ılıman iklim kuşağında bulunan birçok bitki tohumunda görülür ve bu durumdaki tohumlar, çevresel uyarıya cevap vermez (Vegis, 1964; Schütz, 1997).

Saksı denemelerinde doğal ortamından toplanan ve laboratuvar koşullarında (20-25 °C, % 50-60 nem) saklanan olgun tohumlar ancak 8. ayın sonunda dormansi periyodlarını tamamlamışlar ve bu süre sonunda toprağa ekilen tohumlar % 70 oranında çimlenme göstermişlerdir. Bu şekilde kendini gösteren primer dormansi *Centaurea tchihatcheffi*'de 9 ay olarak belirlenmiştir (Çakırlar vd., 2005). Tohum canlılığının % 80 olduğu göz önüne alınırsa bu değer oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

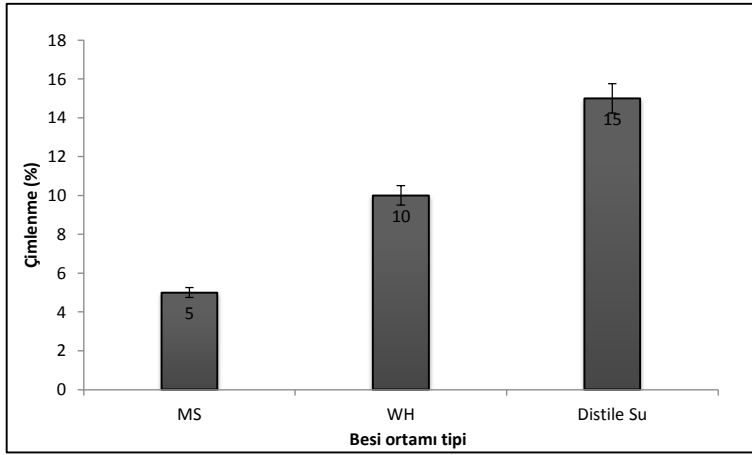
In vitro çimlenme

Tohumlara uygulanan sterilizasyon serilerinden en yüksek oranda steril kültür yüzdesi (% 40) 25 dakikalık NaOCl uygulaması ile elde edilmiştir. *In vitro* çimlenme denemelerinde bitki tohumlarının büyük oranda kontamine olması, steril başlangıç materyalinin elde edilmesinin sınırlayıcı bir faktör olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle daha önceden uygulanan sterilizasyon serilerine bir fungusit olan potasyum sorbat eklenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki fungusit uygulaması kontaminasyon yüzdesini azaltmıştır. % 10'luk potasyum sorbat çözeltisinde 1 saat boyunca tutulan tohumların, NaOCl ile 25 dakikalık sterilizasyonu sonrası % 80 oranında steril kültürler elde edilmiştir.

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

In vitro çimlenme denemelerinin ilkinde, *R. mykalea*'nın *in vitro* çimlenmesi için en uygun ortam araştırılmıştır. Bu deneme tohumlar toplandıktan hemen sonra ve saksı denemelerinin sonuçlarından elde edilen veriler göz önünde bulundurularak tohum toplanmasından 8 ay sonra olmak üzere 2 farklı zamanda oluşturulmuştur. Tohum toplanmasından hemen sonra gerçekleştirilen denemelerde hiçbir ortamda çimlenmenin olmaması tohum dormansisi savını desteklemektedir. İkinci denemede ise denenen tüm ortamlarda çimlenme gözlenmiştir. En yüksek çimlenme yüzdesi distile su ortamında elde edilmiştir (% 15 çimlenme oranı) ve bunu sırasıyla WH (% 10 çimlenme oranı) ve MS (% 5 çimlenme oranı) ortamları izlemiştir (Şekil 2 ve 3).

MS ve WH ortamları mineral besin maddeleri içerikleri bakımından birbirinden farklıdır, en yüksek mineral besin maddesi içeren ortam MS ortamıdır. Distile su ortamı ise herhangi bir mineral besin maddesi içermemektedir. Elde edilen çimlenme yüzdeleri tüm ortamlarda çok düşük olmasına rağmen, çimlenme yüzdesinin ortamların içerdiği mineral besleyicilerin miktarı ile ilişkili olduğu söylenebilir. Ortamlarda bulunan mineral besleyici içeriği arttıkça çimlenme oranında azalma gözlenmiştir. Yüksek mineral besleyici içeren ortamlarda çimlenme yüzdesinin az olmasının veya hiç olmamasının nedeni mineral besleyici oranındaki artışın negatif ozmotik potansiyele neden olmasındandır (Kauffman, 1969).



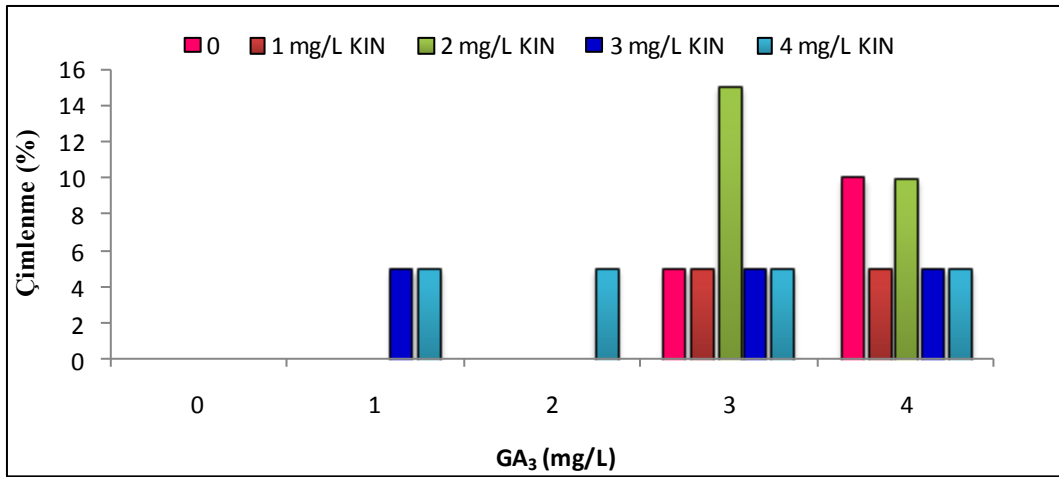
Şekil 2. Farklı *in vitro* ortamlarda tohum çimlenme yüzdeleri (8 ay saklama sonrası)



Şekil 3. Distile suda *in vitro* olarak çimlenmiş bir bitkiciğin görünümü

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

Dormansiyi kırmak amacı ile dormansi sürecinde olan tohumlar KIN ve/veya GA₃ ilaveli distile su ortamına aktarılmıştır. Bu uygulamalar sonucunda farklı oranlarda çimlenme elde edilmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. *R. mykalea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine GA₃ ve KIN'in etkisi

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

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

Eksojen olarak uygulanmış bitki büyüme düzenleyicilerinden giberellinler (özellikle giberellik asit GA₃ ve GA₄₊₇) ve sitokininlerin (özellikle KIN ve BA) birçok tohum türünde dormansiyi kırdığı bildirilmiştir (Dweikat ve Lyrene, 1989; Karam Al-Salem, 2001; Mehanna vd., 1985; Iglesias ve Babiano, 1997). Ancak bizim denemelerimizde *in vitro* ortamlara bitki büyüme düzenleyicilerinin ilavesi çimlenme yüzdesini artırıcı bir etki göstermemiştir. Bu nedenle denemelerin devam eden kısmında bu büyüme düzenleyicileri kullanılmamıştır.

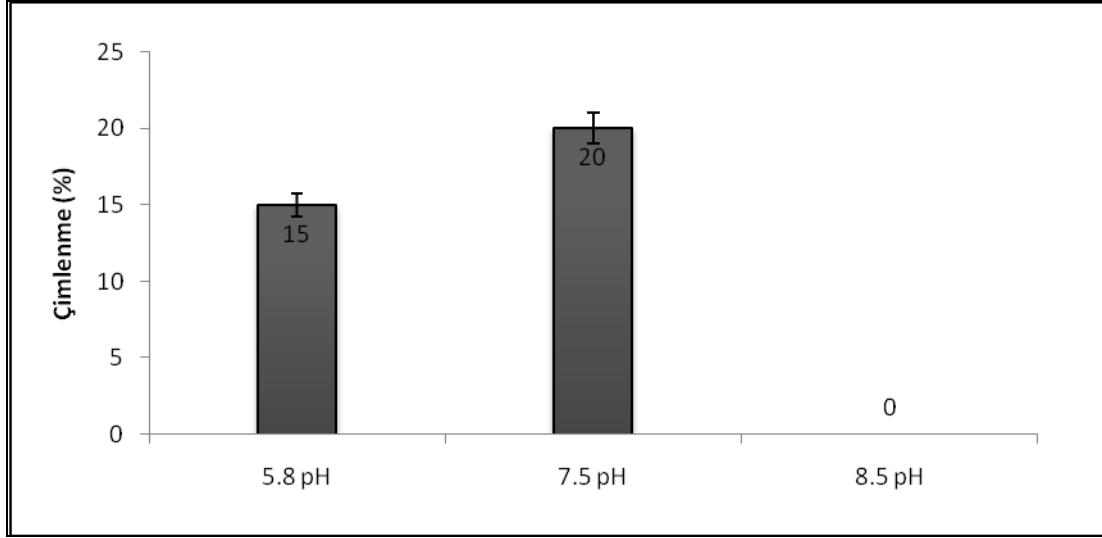
Dormansiyi kırıcı uygulamalardan biri de stratifikasyondur. Stratifikasyon sırasında tohumların hormon seviyelerinde (Taylorson ve Hendricks, 1977), metabolik yollarda (Bogatek ve Lewak, 1988) enzimatik yapı ve aktivitelerinde değişimler (Rychter ve Lewak, 1971; Podstolski vd., 1974) ile solunum hızında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

Bir tohum su ve gaz alış verişi olmadan çimlenemez. Bazı tohumlarda meyve veya tohum kabuğu bu alış verişi engelleyebilmektedir. Meyve veya tohum kabuğunun suya, erimiş gazlara, özellikle oksijene ve karbondioksite karşı geçirimsiz olması çimlenmeyi engelleyici bir faktördür. Ayrıca, meyve veya tohum kabuğunun embriyonun büyümesine engel olacak yeterlilikte olduğu kabul edilen mekanik bir kuvvete sahip olması ve bünyelerindeki kimyasal engelleyicilerin varlığı ile çimlenmeyi engelleyebilmektedir (Vardar, 1982; Özer vd., 1998; Eira ve Caldas, 2000). Potasyum nitrat (KNO₃) gibi kimyasalların dormansiyi kırarak çimlenmeyi teşvik ettiği de bilinmektedir (Kevseroğlu, 1993; Hartmann vd., 1997). Bu bilgilerin ışığı altında gerçekleştirilen testanın çizilmesi ve sülfürik asit (H₂SO₄) ile muamele denemelerinde çimlenme gözlenmemiştir. Saksıda gerçekleştirilen çimlenme denemelerinde çimlenme gözlenmiş olması, tohum kabuğunun sert olmasına rağmen suya veya oksijene karşı geçirimsiz olmadığını düşündürmektedir.

Yukarıda sözü edilen tüm uygulamalara rağmen, doğal ortamından hemen toplama sonrası kullanılan ve dormansi periyodunda olan tohumların dormansisi kırılmamıştır. Bu nedenle *R. mykalea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine ışığın-karanlığın etkisini araştırmak için gerçekleştirilen denemelerde, araziden toplandıktan sonra laboratuvar koşullarında 8 ay bekletilen tohumlar kullanılmıştır. Yaptığımız denemenin sonuçlarına göre *R. mykalea* tohumları karanlık koşullarda % 14 çimlenme yüzdesi gösterirken, aydınlıkta bu oran % 15 olarak belirlenmiş ve çimlenme yüzdeleri karşılaştırıldığında ışık ve karanlık uygulamaları arasında önemli bir farklılık bulunamamıştır.

Tohumların bir kısmı ışıktaki çimlenirken; bir kısmı karanlıkta çimlenmektedir. Bazı tohumlar ise bu anlamda nötr'dür (Yentür, 1982). Işığın şiddeti, dalga boyu ve süresi çimlenmeyi etkilemektedir (Benvenuti ve Macchia 1997; Densmore, 1997; Noranha vd., 1997; Leinonen ve Chantal, 1998). Bazı türlerin tohumları çimlenme için ışığa gereksinim göstermesine rağmen, bazı türlerde ışık çimlenmeyi engellemektedir (Devlin, 1975). *R. mykalea*'nın çimlenmesi üzerine ışığın etkisi bulunmaması tohumların bu konuda nötr olduğunu göstermektedir. Yapılan bir çalışmada *Centaurea zeybekii*'nin tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine ışık ve karanlık etkisi araştırılmış ve ışık- karanlık uygulamaları arasında önemli bir farklılık bulunamamıştır (Kurt ve Erdağ, 2009). Çelik ve Yücel (2008)'in CR kategorisinde bulunan *Centaurea hausknetchii*'nin tohumlarının çimlenmesi üzerine gerçekleştirdikleri bir çalışmada ise 16/8, 8/16 fotoperiyot ile karanlık koşullarda farklı oranlarda (sırasıyla % 69.2, % 58.5 ve % 42) çimlenme elde etmişler ve araştırmacılar ışığın çimlenme üzerine teşvik edici bir etkisi olduğunu belirtmişlerdir.

Denemelerimizde *R. mykalea* tohumlarının çimlenmesi üzerine pH'ın az da olsa bir etkiye sahip olduğu ve en yüksek çimlenme değerinin (% 20 çimlenme oranı) pH'sı 7.5'e ayarlanmış distile su ortamında elde edildiği görülmüştür (Şekil 5). Bu değerden daha yüksek pH'da ise çimlenme gözlenmemiştir.

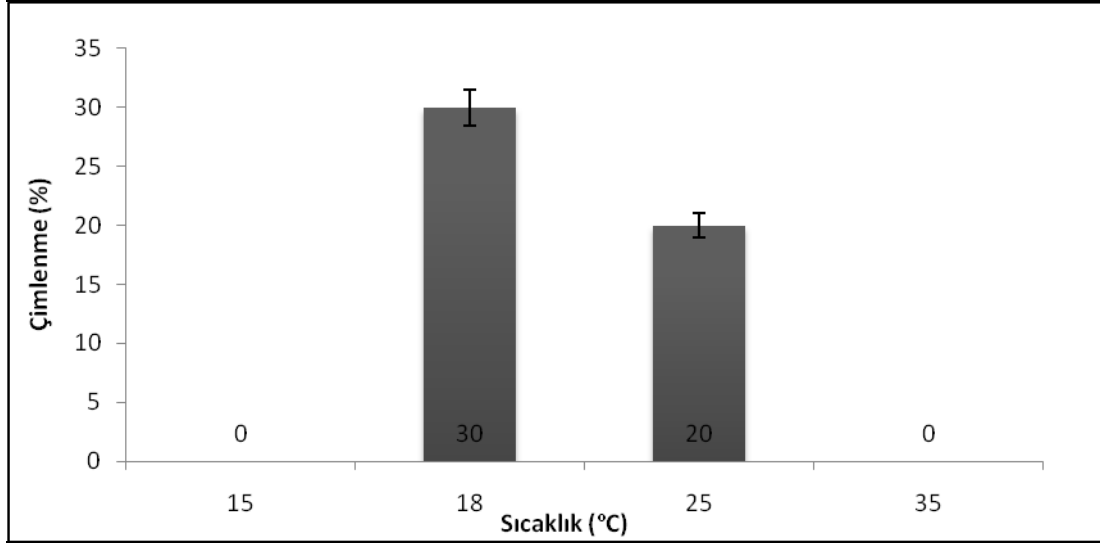


Şekil 5. *R. mykalea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine pH'ın etkisi

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

Tohum çimlenmesi üzerine sıcaklığın etkisini araştırmak için oluşturulan denemede sterilizasyona tabi tutulan tohumlar pH'ı 7.5'e ayarlanmış distile su ortamlarına aktarılmıştır. Kültürler farklı sıcaklıklarda ve karanlıkta tutulmuşlardır. Bu denemeler sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 6'da gösterilmektedir.

Düşük sıcaklık (15 °C) ve yüksek sıcaklıkta (30 °C) çimlenme gözlenmezken, 18 ve 25 °C'de çimlenme gözlenmiş, maksimum çimlenme ise 18 °C'de (% 30) gerçekleşmiştir. Elde edilen bulgulara göre sıcaklık çimlenme üzerinde etkili bir faktördür ve çimlenme için en uygun sıcaklık 18 °C olarak belirlenmiştir. *C. tchihatcheffii* ile yapılan bir çalışmada da sıcaklık çimlenme üzerine etkili bir faktör olarak bulunmuş ve çimlenme için en uygun sıcaklığın 25 ± 2 °C olduğu belirtilmiştir (Çakırlar vd., 2005). Kurt ve Erdağ (2009) tarafından yapılan bir başka araştırmada *C. zeybekii* tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine sıcaklık etkili bir faktör olarak bulunmuş ve maksimum çimlenme 25 °C'de % 80 olarak belirlenmiştir.



Şekil 6. *R. mykalea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine sıcaklığın etkisi

4.Sonuç ve Öneriler

Endemik bitkilerin çimlenme özellikleri ile ilgili bilgiler türlerin ne şekilde korunması hakkındaki kararların verilmesine yardımcı olabilmekte, özellikle kontrollü koşullarda gerçekleştirilen *in vitro* çimlenme denemeleri türlerin tohum çimlenme özellikleri ile ilgili çarpıcı sonuçlar ortaya koyabilmektedir. Bizim denemelerimizde tetrazolium testi sonuçlarına göre, bitkinin tohum canlılığı % 80 olarak belirlenmiştir. Bu sonuç bitki tohumlarının yüksek oranda canlı olduğunu göstermektedir. % 20'lik kayıp sentripetal gelişim gösteren kapitulum akenlerinin olasılıkla gelişimin başlangıç aşamasında olması ve ana bitkiden ayrılma nedeni ile gelişimlerinin kesintiye uğraması sonucu meydana gelen ölümlerden kaynaklanmaktadır.

Bitkinin dormansi periyodunun aşılması için 8 aylık bir periyoda ihtiyaç duyulmuş, bu sürenin altında denenen tüm uygulamalarda dormansi kırılmamıştır. 8 aylık dormansi periyodu sonunda saksıda gerçekleştirilen denemelerde % 70 oranında çimlenme görülürken, *in vitro* çimlenme denemelerinde en yüksek çimlenme yüzdesi pH 7.5'e ayarlanmış distile su ortamında 18 °C'de ve karanlıkta % 30 olarak belirlenmiştir. *In vitro* çimlenme denemelerinin sonunda, yüzeysel sterilizasyonu sağlanmış tohumlardan elde edilen bitkiciklerin zamanla kontamine olarak ölmesi tohum kaynaklı içsel bir kontaminantın varlığını göstermektedir. Ayrıca sterilizasyon uygulanmadan gerçekleştirilen saksı denemelerinde çimlenme yüzdesinin yüksekliği bitkinin doğal ortamında toprak kaynaklı bir mikroorganizma ve/veya mikroorganizmalar tarafından desteklenen bir çimlenme ilişkisini düşündürmektedir. Bu ilişki çimlenme sırasında tohumda yüzeysel sterilizasyon ile engellenemeyen içsel bir kontaminantın, doğal yaşama ortamında bulunan bir başka mikroorganizma tarafından ortadan kaldırılması şeklinde gerçekleşmiş olabilir.

Nadir, endemik ya da tehdit altında bulunan bitkilerin çoğaltılmasında *in vitro* çoğaltım teknikleri *ex situ* korumada yaygın bir araç olarak kullanılmaktadır. Bu tekniklerin uygulanması sırasında en uygun eksplant kaynağını daha önceden steril edilmiş tohumlardan elde edilen steril fideler oluşturmaktadır. Bu şekilde elde edilen eksplantların sterilizasyon işlemine ihtiyacı olmamakta ve yüzey sterilizasyonunun zararlı etkilerinden sakınılmaktadır. Çalışma sonucunda, *R. mykalea* bitkisinin *in vitro* teknikler kullanılarak çoğaltılması çalışmalarında başlangıç materyali olarak tohum kullanılmasının uygun bir araç olmadığı kanısına varılmıştır.

Teşekkür

FEF-07012 no'lu proje kapsamında finansal destekte bulunan Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürü bir borç biliriz.

5. Kaynaklar

1. Davis, P.H., "Flora of Turkey and The East Aegean Islands, Vol.8, Edinburgh University Press., Edinburgh, 1982.
2. Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N., Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler). Türkiye Tabiatını Koruma Derneği, Ankara, 2000.
3. Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Başer, K.H.C., Flora of Turkey and The East Aegean Islands (Supplement 2) Vol. 11, University Press, Edinburgh, 2000.
4. Menges, E.S., Predicting The Future of Rare Plant Populations: Demographic Monitoring and Modelling, Natural Areas Journal, 6, 13-25, 1986.
5. Hellwig, F.H., Centaureinae (Asteraceae) in The Mediterranean-history of Ecogeographical Radiation, Plant Syst. Evol., 246, 137-162, 2004.
6. Emek Y., Erdağ B., *Rhaponticoides mykalea* (Hub.-Mor.)'nın Kuşadası Populasyonu Üzerine Gözlemler, Res. Jour. of Biol. Sci., 3(2), 169-174, 2010.
7. ISTA., International Rules for Seed Testing, Proceed, Internat. Seed Test, Assoc., 31, 92-106, 1966.
8. Guri, A. Z., Patel, K.N., Compositions and Methods to Prevent Microbial Contamination of Plant Tissue Culture Media, US patent 5 750402, 1998.
9. Murashige, T., Skoog, F., A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures, Physiol. Plant., 15, 473-497, 1962.
10. White, P., The Cultivation of Animal and Plant Cells, Ronald Press, New York. 1963.
11. Kocaçalışkan, İ., Bitki Fizyolojisi, Nobel Yayın Dağıtım TİC. LTD. ŞTİ., s. 316, Ankara., 2008.
12. Vardar, Y., Bitkilerde Büyüme ve Gelişme Fizyolojisi. Karşıyaka, İzmir, 1982.
13. Schmidt, L., Dormancy and Pretreatment, Chap. 9, Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed, Danida Forest Seed Centre, Danimarka., 2000.
14. Leveck, H.H., The Tetrazolium Test for Seed Viability, Mississippi State University, Mississippi, 1962.
15. Harper, J.L., Lovel, P.H., Moore, K.G., The Shapes and Sizes of Seeds, Annu. Rev. Ecol. Syst., 1, 327-356, 1970.
16. Stebbins, G.L., Adaptive Radiation of Reproductive Characteristics of Angiosperms II, Seeds and Seedlings, Annu. Rev. Ecol. Syst., 2, 237-260, 1971.
17. Fenner, M., Seed Ecology, Chapman and Hall., London, 1985.
18. Meyer, S.E., Monsen, S.B., Habitat Correlated Variation in Mountain Big Sage Brush (*Artemisia tridentata* ssp. *vaseyana*) Seed Germination Patterns, Ecology, 72, 739-742, 1991.
19. Schütz, W., Milberg, P., Seed Dormancy in *Carex canescens*: Regional Differences and Ecological Consequences, Oikos, 78, 420-428, 1997.
20. Mayer, A.M., Poljakoff-Mayer, A. The Germination of Seeds, Pergamon Press, p. 211, Oxford, 1982.
21. Taiz, L., Zeiger, E. Plant Physiology, Sinauer Associates, Publishers, p. 792, Sunderland, 1998.
22. Vegis, A. 1964. Dormancy in Higher Plants. Annu. Rev. Plant Physiol., 15, 185-224.

23. Schütz, W., Primary Dormancy and Annual Dormancy, Cycles in Seeds of Six Temperate Wetland Sedges., *Aquatic Botany*, 59; 75-85, 1997.
24. Çakırlar, H., Çiçek, N., Doğru, A. *Centaurea tchihatcheffii* Fisch. Et Mey.'in Çimlenme Fizyolojisi, in: *Centaurea tchihatcheffii*. Boşgelmez, A. (eds), Bizim Büro Basımevi, pp. 309-324, Ankara, 2005.
25. Kauffman, M.R., Effects of Water Potential of Germination of Lettuce, Sunflower and Citrus Seeds, *Can. J. Bot.*, 49, 410-515, 1969.
26. Khan, M.A., Gulzar, S., Light, Salinity and Temperature Effects on The Seed Germination of Perennial Grasses, *Am. J. Bot.*, 90, 131-134, 2003.
27. Kurt, S., Erdağ, B. In vitro Germination and Axillary Shoot Propagation of *Centaurea zeybekii*, *Biologia*, 64(1), 97-101, 2009.
28. Baskin, C.C., Baskin, J.M., *Seeds*. Academic Press, Lexington, Kentucky, 2001.
29. Koger, C.H., Reddy, K.N., Poston, D.H., Factors Affecting Seed Germination, Seedling Emergence and Survival of Texasweed (*Caperonia palustris*), *Weed Science*, 52, 989-995, 2004.
30. Cardemil, L., Rainero, A. 1982. Changes of *Araucaria araucana* Seed Reserves During Germination and Early Seedling, *Can. J. Bot.*, 60, 1629-1639, 2004.
31. Khan, A.A., Cytokinins: Permissive Roles in Seed Germination. *Science*, 171, 853-859, 1971.
32. Walbot, V., Clutter, M., Sussex, I. Effects of Absciscic Acid on Germinating Bean Axes. *Plant Physiol.*, 56, 570-574, 1975.
33. Fountain, D.W., Bewley, J.D., Modulation of Pre-germination Protein Synthesis by Gibberellic Acid, Absciscic Acid, and Cytokinin. *Plant Physiol.*, 58, 530-536., 1976.
34. Dweikat, I.M., Lyrene, P.M., Response of Highbush Blueberry Seed Germination to Gibberellin A3 and 6N-benzyladenine. *Can. J. Bot.*, 67, 3391-3393, 1989.
35. Karam, N.S., Al-Salem, M.M., Breaking Dormancy in *Arbutus andrachne* L. Seeds by Stratification and Gibberellic Acid., *Seed Sci. Technol.*, 29 (1), 51-56, 2001.
36. Mehanna, H.T., Martin, G.C. Nishijima, C., Effects of Temperature, Chemical Treatments and Endogenous Hormone Content on Peach Seed Germination and Subsequent Seedling Growth. *Scientia Hort.*, 27, 63-73, 1985.
37. Iglesias, R.G., Babiano, M.J., Endogenous Absciscic Acid During The Germination of Chickpea Seed, *Physiol. Plant.*, 100, 500-504, 1997.
38. Taylorson, R.B. and Hendricks, S.B. Dormancy in Seeds, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 28, 331-354, 1977.
39. Bogatek, R. Lewak, S. Effect of Cyanide and Cold Treatment on Sugar Catabolism in Apple Seeds During Dormancy Removal, *Physiol. Plantarum*, 73, 406-411, 1988.
40. Rychter, A. and Lewak, S. Apple Embryos Peroxidases., *Phytochemistry*, 10, 2609-2613, 1971
41. Podstolski, A.P., Gajewska, B. Lewak, S. Electrophoretic Investigation of Phenol Oxidases in Stratified Apple Seeds, *Biol. Plant.*, 16, 163-166, 1974.
42. Alscher-Herman, R., Musgrave, M., Leopold, A.C., Khan, A.A., Respiratory Changes with Stratification of Pear Seeds, *Physiol. Plant.*, 52, 156-160, 1981.
43. Bewley, J.D., Black, M., *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination*, Springer-Verlag, Berlin, 1982.
44. Özer, Z., Kadioğlu, İ., Önen, H., Tursun, N., *Herboloji (Yabancı Ot Bilimi)*, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fak. Yay. No. 20, Tokat, 1998.

45. Eira, M.S., Caldas, L.S., Seed Dormancy and Germination as Concurrent Processes, *R. Bras. Fisiol.*, 12, 85-104, 2000.
46. Kevseroğlu, K., The Effects of Some Physical and Chemical Treatments on Germination of *Datura stramonium* Seeds, *Turk. J. Agric. Forest.*, 17, 727-735, 1993.
47. Hartmann, K., Krobb, C., Mollwo, A., Phytochrome-mediated Photocontrol of The Germination of The Scentless Mayweed, *Matricaria inodora* L., and Its Sensitization by Nitrate and Temperature, *J. Photochem. Photobiol. B., Biology*, 40, 240-252, 1997.
48. Yentür, S., Tohum Çimlenmesi., *Doğa Temel Bilimler*, 6, 175-186, 1982.
49. Benvenuti, S., Macchia, M., Light Environment, Phytochrome and Germination of *Datura stramonium* L. Seeds, *Environ. Exp. Bot.*, 38, 61-71, 1997.
50. Densmore, R.V., Effect of Day Length on Germination of Seeds Collected in Alaska, *Am. J. Bot.*, 84 (2), 274-278, 1997.
51. Noranha, A., Andersson, L., Milberg, P., Rate of Change in Dormancy Level and Light Requirement in Weed Seeds During Stratification, *Ann. Bot.*, 80, 795-801, 1997.
52. Leinonen, K., Cahantal, M., Regulation of *Picea abies* Seed Dormancy by Red and Far-red Light at Various Moisture Contents, *Scand. J. Forest Res.*, 13, 43-49, 1998.
53. Devlin, R., Dormancy, in *Plant Physiology*, Third Edition. D. Van Nostrand Company, pp, 551-564, 1975.
54. Çelik, S., Yücel, E., Conservation Strategy of Critical Endemic *Centaurea hausknetchii* Boiss. (Section: *Cyanoroides*) and Effects of Different Salt, Nitrate and Acid Concentrations on The Germination of Seeds, *Asian J. Chem.*, 20, No.5, 4051-4058, 2008.