

PAPAVER RHOEAS TOHUMLARININ *IN VİTRO* ORTAMDA ÇİMLENMESİ ÜZERİNE FARKLI UYGULAMALARIN ETKİLERİ

Betül AKIN

Dumlupınar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Merkez Kampüs, 43270,
Kütahya, e-mail: b_akin@dpu.edu.tr.

Geliş Tarihi:07.09.2011 Kabul Tarihi:14.10.2011

ÖZET

Bu araştırmada, çimlenme problemi olan ve tıbbi öneme sahip olan *Papaver rhoeas* tohumlarının doku kültürü (*in vitro*) ortamında çimlendirilmesi için en uygun ortam pH'ı, sükröz ve agar dozunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Tohumların çimlendirilmesi saf su ortamında ve *in vitro* ortamda bitki büyüme kabiniinde gerçekleştirilmiştir. Yaptığımız çalışmanın sonucunda, *Papaver rhoeas* tohumlarının saf suda çimlenme oranının çok düşük olduğu ve tohumların dormant olduğu (çimlenme yüzdesi ~ % 10) tespit edilmiştir. *In vitro* ortamda yapılan çimlendirme denemesinde ise en uygun ortam pH'ı 5.8 olarak belirlenmiştir. % 3 oranında kullanılan sükröz ve % 0.7 oranında kullanılan agar ortamında en yüksek çimlenme elde edilmiştir. Sonuç olarak, *Papaver rhoeas* tohumları *in vitro* ortamda başarılı bir şekilde çimlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Agar, çimlenme, *in vitro*, *Papaver rhoeas*, pH, sükröz.

THE EFFECTS OF DIFFERENT TREATMENTS ON *IN VITRO* SEED GERMINATION OF *PAPAVER RHOEAS*

ABSTRACT

In this research, the most suitable pH level, sucrose and agar doses for *in vitro* germination of *Papaver rhoeas* which has got germination problem and medical importance were determined. The germination of seeds carried out in distilled water and *in vitro* condition at plant growth cabinet. As a result of our study, *Papaver rhoeas* seeds germination rate in distilled water is very low and seeds are dormant (germination percentage ~ 10 %) were detected. The most suitable pH level, *in vitro* germination treatment was determined as 5.8. 3 % sucrose and 0.7 % agar led to highest germination rate. Consequently, *Papaver rhoeas* seeds was successfully germinated *in vitro* culture.

Keywords: Agar, germination, *in vitro*, *Papaver rhoeas*, pH, sucrose.

1. GİRİŞ

Bitkiler ekosistemin temel bileşenlerindendir. İnsan yaşamı için gerekli olan yiyeceği ve diğer temel materyalleri ekosistemden sağlamaktadır. Dünyadaki insan nüfusunun hızla artmasıyla birlikte bitki örtüsü üzerindeki tahrip, ekonomik, sosyal, kültürel nedenlerden dolayı artmıştır ve dünya yüzeyindeki doğal kaynaklar hızlı bir şekilde tüketilmeye başlanmıştır. Dünyadaki insan nüfusunun artışına paralel olarak, ekosistem üzerindeki baskı artmış ve bundan dolayı doğal gen kaynaklarımız olan bitkileri korumak büyük bir problem haline almıştır. Son yüzyılda ekosistemdeki bitki türlerinin yok oluşu hız kazanmıştır [1].

Papaver rhoeas L. (Gelincik) Papaveraceae familyasından Dünya'da çok geniş bir yayılma alanına sahip 30-90 cm boyunda bir yıllık otsu bir yabancı ot türüdür. Gövdesi dik ve tüylü, yapraklar tabanda rozet, yukarıda almaçlı, düzensiz tüysü parçalıdır. Çiçekler tek terminal, kırmızı taban kısmı siyah, ilkbahar yaz aylarında açar. Çiçekler döküldükten sonra kalan meyveleri tüsüz ve fiçı biçiminde çok tohumlu bir kapsüldür [2, 3]. Bu bitkinin ekstraktları halk arasında tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. *Papaver rhoeas* bitkisi fenolik bileşikler

içermektedir. Bitkinin göstermiş olduğu bazı farmakolojik etkiler, bitkinin içerdiği bu değerli bileşenlere dayandırılabilir. Gelinciğin kurutulmuş çiçeklerinden ve taze yapraklarında yararlanır. Alkoloitler, renk maddeleri, müsilaaj; çiçek dışındaki toprak üstü kısımlar readin alkaloidi, az miktarda morfin ve narkotin, roeadin, roeajenin, tebain, oripavin, kodein içerir [3, 4, 5, 6]. Bitkinin tıbbi özelliklerine baktığımızda çiçekler yatıştırıcı, uyutucu, öksürük kesici, şurubu ise korkan ve aşırı heyecanlanan çocukları sakinleştirmek için içirilir, ayrıca serinletici içecek olarak ve şeker hastalarında şekeri düşürmek için; sarılıkta gargara veya öksürük için içilir. Ağrı kesici, antibakteriyel, antioksidan, ateş düşürücü, ter söktürücü, balgam söktürücü, uyuşturucu, teskin edici olarak kullanılır. Bitkinin yaprak ve kapsülleri uykusuzluk, kalp çarpıntısı ve mide ağrılarına karşı kullanılır. Bitkinin yeşil yaprakları ayrıca, kavru olarak veya salata olarak tüketilir [3, 7, 8].

Tohum oluşumu, bitkinin hayatı süresince önemli bir evreyi oluşturmaktadır. Tohumlar çimlenebilmek için, değişen çevre şartlarının sonucu olarak belirli gereksinimlere ihtiyaç duyarlar [9, 10]. Nitekim bitkinin tohumdan yayılarak üremesi genellikle etkili ve ucuz bir yöntem olmasına rağmen, yabani olarak yetişen türler için çimlenme gereksinimleri genellikle bilinmemektedir. Birçok bitki türü besin açısından zengin ve aynı zamanda bitki hormonu ile desteklenen besin ortamında, steril *in vitro* şartlarda gelişim göstermektedirler [11, 12]. Ancak bazı türlerde başarılı tohum çimlenmesi için bu teknikler gerekli olmamakta ve kullanıldığı taktirde kaynak israfına neden olmaktadır. Bu yüzden her türün kendi ihtiyacına göre, uygun tekniğin seçilmesi gerekmektedir [13].

Papaver rhoear L. bitkisinin tohumları, kuvvetli bir dormansiye sahiptir ve dormansi kolaylıkla kırılmamaktadır [14]. Dormansi birçok yabancı ot tohum popülasyonunun sahip olduğu genel bir özelliktir ve bu da yabancı otların çıkış oranını engellemektedir [15]. Doğada bulunan birçok bitkinin ata formlarında bulunan çeşitli dormansi mekanizmaları, bu bitkilerin kültüre alınmasıyla ortadan kaldırılabilmektedir, fakat elverişli olmayan çevre şartlarında dormansi tekrar ortaya çıkmaktadır. Buna karşılık yabancı ot tohumlarının, çimlenmeden uzun yıllar toprakta canlı kalmasını sağlayan bir dormansi mekanizması bulunmaktadır [16]. Bundan dolayı, *Papaver rhoear* türünde çimlenmenin uyarılması ve artırılması yönündeki çalışmalara ihtiyaç vardır [17].

Çalışmamızın amacı, çimlenme problemi olan ve tıbbi kullanıma sahip olan *Papaver rhoear* tohumlarının *in vitro* ortamda çimlendirilmesi için uygun bir prosedür oluşturulması ve bu çalışmanın aynı tür üzerine gelecekte yapılacak çalışmalara katkı sağlamaktır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Çalışma Alanı

Çalışma materyalimiz olan *Papaver rhoear* tohumları, Kütahya ili ve çevresinden Haziran-Ağustos ayları arasında toplanmıştır. Toplanan tohumların içerisinde sağlıklı olanlar seçilmiş, deneylerde kullanılmaya kadar küçük zarflar içerisinde laboratuvar şartlarında karanlık ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

2.2. Tohumların Yüze Sterilizasyonu

Tohumlar, Babaoğlu vd. (2001)'nin tohum sterilizasyonu için önerdiği şekilde birkaç damla Tween-20 eklenmiş % 10'luk NaOCl çözeltisi içerisinde 15 dakika süreyle tutularak dezenfekte edilmiş, daha sonra üç kez beşer dakika süreyle otoklavlanmış steril saf su ile durulanmıştır [18].

2.3. Tohum Çimlendirme

2.3.1. Saf su ortamında çimlendirme

Tohumlardan dolgun, sağlam görünüşlü, benzer büyüklükte olanlar seçilmiştir. *Papaver rhoear* türünün tohumları, çift katlı kurutma kağıdı yerleştirilmiş ve steril saf su ile ıslatılmış petri kaplarına ekilmiştir. Petri kapları (9 cm çaplı) tohum ekiminden önce 115 °C'de etüvde sterilize edilip tabanına iki katlı filtre kağıdı yerleştirilmiştir. Tohumlar 30 gün boyunca çimlendirme dolabında inkübe edilmişlerdir. Kabinin iklim şartları 25/18 °C sıcaklık; 16/8 saat fotoperiyot ve % 70 nem olarak ayarlanmıştır.

2.3. 2. *In vitro* çimlendirme

Denemelerde esas olarak MS besin ortamı reçetesindeki makro ve mikro element tuzları ile organik maddeler kullanılmıştır. Bu temel besin ortamının içindeki maddeler ve miktarları ile ilgili bilgiler Çizelge 2.1'de verilmiştir [19, 20]. Steril edilmiş tohumlar çimlendirme amacıyla agarlı MS besin ortamına alınmıştır. Hazırlanan besin ortamları cam kavanoz veya magenda kaplarına aktarılmıştır. Kapların ağzı kapatılarak 15 dakika süreyle 121 °C'de otoklavda sterilize edilmiştir. Çalışmamızda 3 farklı agar konsantrasyonunun (% 0.6, 0.7, 0.8), 3 farklı sükröz konsantrasyonu (% 1, 2, 3) ile 5 farklı pH seviyesinin (5.6, 5.7, 5.8, 6.0, 6.5) tohum çimlenmesi üzerindeki etkisini araştırılmıştır. Her deneme üç kez tekrarlanmıştır. Yüzde çimlenme durumu ekimi takiben yedinci günden başlanarak 6. hafta sonuna kadar çimlenen tohumların sayımı yapılmıştır. Sonuçlar maksimum çimlenmenin bulunduğu 4. hafta sonunda bulunan değerlerdir. Kültür kapları yukarıda belirtildiği şekilde ve şartlarda iklim kabinine yerleştirilmiştir. Radikulanın tohum kabuğundan 2 mm uzamış olması çimlenme için yeterli kriter olarak kabul edilmiştir. Tohumlarda çimlenme oranı % olarak ifade edilmiştir.

2.4. İstatistiksel Analizler

Denemeler sonunda elde edilen tüm verilerin ortalamaları ve standart hataları SPSS 18.0 paket programı ile yapılmıştır. Yapılan muamelelerin etkileri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiştir. Uygulama sonuçlarının ortalamaları arasındaki farklar 0.05 önem düzeyinde Duncan testi ile karşılaştırılmıştır. Her uygulamada 50 adet tohum kullanılmıştır. Denemeler üç tekerrürlü olarak yapılmıştır [21].

Çizelge 2.1. MS besin ortamında bulunan besin maddeleri ve oranları (mg/l) [19, 20].

İnorganik maddeler		MS
Amonyum nitrat	NH ₄ NO ₃	1650
Kalsiyum klorür	CaCl ₂ .2H ₂ O	440
Magnezyum sülfat	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
Potasyum dihidrojen fosfat	KH ₂ PO ₄	170
Potasyum nitrat	KNO ₃	1900
Borik asit	H ₃ BO ₃	6,2
Kobalt klorür	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Bakır sülfat	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Mangan sülfat	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
Potasyum iyodür	KI	0,83
Sodyum molibdat	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
Çinko sülfat	ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6
Sodyum EDTA	Na ₂ EDTA	37,3
Demir sülfat	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Organik maddeler		
Glisin		2
Myo-inositol		100
Nikotinik asit		0,5
Piridoksin.HCl		0,5
Thiamin. HCl		0,1
Sakkaroz		30 g/l

3. BULGULAR

3.1. *Papaver rhoear* Tohumlarının Çimlenmesi Üzerine Çeşitli Uygulamaların Etkisi

Saf su ortamında yapılan çimlendirmede *P. rhoear* tohumlarında 14 gün boyunca maksimum çimlenme oranı, çimlendirmenin 10. gününde 9,27 olarak elde edilmiş ve bunu takiben çimlenmede herhangi bir değişiklik görülmemiştir (Çizelge 3.1). *Papaver rhoear* tohumlarının normal şartlarda çimlenme oranının çok düşük olduğu ve tohumların kuvvetli şekilde dormansiye sahip olduğu ortaya konulmuştur.

Çizelge 3.1. Saf su ortamında *Papaver rhoear* tohumlarının çimlenme yüzdesi (%).

Çimlenme süresi (gün)	Çimlenme %
1	0
2	0
3	2,46 ± 0,09
4	6,07 ± 0,09
5	6,78 ± 0,06
6	8,03 ± 0,07
7	9,13 ± 0,07
8	9,23 ± 0,04
9	9,23 ± 0,07
10	9,27 ± 0,03
11	9,27 ± 0,03
12	9,27 ± 0,03
13	9,27 ± 0,03
14	9,27 ± 0,03

± Standart hata (SE).

In vitro ortamda yapılan çimlendirme çalışmasında, agar'ın farklı konsantrasyonlarının tohum çimlenme %'si ve tohum çimlenme süresi (gün) üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla üç farklı konsantrasyonda agar (% 0.6, 0.7, 0.8) içeren besin ortamı hazırlanmıştır. Test edilen agar konsantrasyonları arasında hem çimlenme %'si hem de çimlenme süresi (gün) bakımından farklılıklar gözlenmiştir (Çizelge 3.2). En iyi çimlenme yüzdesi % 88,33 ile % 0.7 agar içeren besin ortamında elde edilmiştir. Çimlenme süreleri bakımından ise % 0.6 ile % 0.7 agar konsantrasyonu arasında fark istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur.

Sükroz'un farklı konsantrasyonlarının tohum çimlenme %'si ve tohum çimlenme süresi (gün) üzerindeki etkisine baktığımızda, her üç sükroz konsantrasyonu (% 1, 2, 3) arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olduğu ortaya konulmuştur. En iyi çimlenme yüzdesi % 3 sükroz konsantrasyonunda % 100 olarak elde edilmiştir. Gene bu sükroz konsantrasyonunda çimlenme süresinin daha kısa olduğu (5,25) olduğu görülmüştür. % 1 sükroz konsantrasyonunda ise çimlenme oranının nispeten düştüğü tespit edilmiştir (Çizelge 3.2).

Beş farklı pH seviyesinde kültüre alınan *Papaver rhoear* tohumlarında pH 5.8'de % 89,67 ile en yüksek çimlenme yüzdesi elde edilmiştir. pH seviyesi arttıkça çimlenmenin de olumsuz yönde etkilendiği tespit edilmiştir. pH 5.8'de çimlenme süresinin de nispeten kısa olduğu ve bunun istatistiki olarak önemli olduğu görülmüştür (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. *Papaver rhoear* türünün tohum çimlenme yüzdesi (%) üzerine farklı uygulamaların etkisi.

Uygulamalar	Konsantrasyon	Çimlenme %	Çimlenme süresi (gün)
Agar	% 0,6	68,03 ± 0,61 b*	4,88 ± 0,04 b
	% 0,7	88,33 ± 0,88 a	5,00 ± 0,06 b
	% 0,8	55,4 ± 0,78 c	5,28 ± 0,04 a
Sükroz	% 1	88,00 ± 0,61 c	5,75 ± 0,03 a
	% 2	95,27 ± 0,62 b	5,52 ± 0,06 b
	% 3	100,00 ± 0,00 a	5,25 ± 0,03 c
pH	5,6	59,97 ± 0,84 c	5,02 ± 0,06 b
	5,7	67,9 ± 0,61 b	4,62 ± 0,06 c
	5,8	89,67 ± 0,88 a	4,00 ± 0,06 d
	6,0	66,07 ± 0,79 b	5,02 ± 0,04 b
	6,5	35,23 ± 0,65 d	5,28 ± 0,04 a

* Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (Duncan; $p < 0.05$).

± Standart hata (SE).

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışma, MS besin ortamında bulunan agar ve sükroz konsantrasyonu ile ortamın pH seviyesinin yabancı ot olup kuvvetli tohum dormansisine sahip olan ve aynı zamanda tıbbi etkili *Papaver rhoear* tohumlarının çimlenmesi üzerindeki etkisini belirlemek ve ilerideki yapılacak doku kültürü çalışmaları için optimum seviyeyi saptamak amacıyla yapılmıştır.

Şifalı otlar binlerce yıldır kullanılmaktadır. Tıbbi tedavide ise bitkisel alternatiflere ilgi yeniden ortaya çıkmıştır. Şifalı otlar ve bunlardan elde edilen ilaçların kullanımı 60.000 yıl öncesine dayanmaktadır ve bunlar bizim sağlığımızın tamamlayıcı bir parçasıdır [22]. Dormansi ise birçok yabancı ot populasyonunun sahip olduğu genel bir özelliktir. Doğada bulunan birçok bitkinin dormansi mekanizmaları, bu bitkilerin kültüre alınmasıyla ortadan kaldırılabilmektedir. Fakat çevre şartları uygun olmadığında dormansi tekrar ortaya çıkmaktadır. Buna karşın yabancı ot tohumları güçlü bir dormansi mekanizmasına sahiptir ve bu mekanizma yabancı ot tohumlarının toprakta çimlenmeden yıllarca canlı kalmasını sağlamaktadır. Böylece, gelişmede etkili çevre koşullarının uygun olmadığı zamanlarda gelişmeyi engelleyerek, bitki ve organlarının fazla etkilenmemesini sağlayarak bitkiyi yaşatır ve dolayısıyla neslin devamını sağlar. Bu sayede birçok bitki olumsuz etki yapan soğuk kış ayları ile sıcak ve kurak yaz aylarında zarar görmemektedir [23]. Bu yüzden deneysel çalışmaların laboratuvar şartlarında yapılabilmesi için yabancı otları istenen zamanda çimlendirmeye ihtiyaç vardır. Bunun için de, bu çalışmaların önünde engel teşkil eden dormansi probleminin aşılması gerekmektedir.

Bu bahsettiğimiz sebeplerden dolayı çalışmamızda Kütahya ve çevresinde tahıl tarlalarında yaygın olarak bulunan *Papaver rhoear* bitki türünün *in vitro* ortamda üretimine olanak sağlayacak en uygun çimlendirme prosedürünün belirlenmesi amaçlanmıştır. Doku kültür tekniklerinin doğru uygulanmasının ilk aşaması, doğru ortamın seçilmesidir. Çalışmamızda agarın farklı konsantrasyonlarından % 0,7 agar'da en iyi çimlenme oranı elde edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, *Helianthus annuus* bitkisinin iki çeşitinde (Gabor, Progres) etkili bir sürgün rejenerasyonu sağlamak için 4.4 µM BAP, 5.4 µM NAA ve farklı konsantrasyonlarda agar içeren MS besin ortamında kotiledon eksplantından, sürgün rejenerasyonu elde edilmeye çalışılmıştır. Agar'ın üç farklı konsantrasyonu (% 0.4, % 0.6, % 0.8) denenmiş olup, en yüksek sürgün sayısı % 0.6 agar (6.6) ortamında elde edildiği belirtilmiştir. Ancak artan agar konsantrasyonunun vitrifikasyon yüzdesini önemli oranda düşürdüğü bildirilmiştir [24]. Besin ortamındaki agar yoğunluğunun artmasıyla görülen çoğalma hızındaki azalış, artan agar

yoğunluğu ile ortamın fiziksel durumunun değişerek katılaşması buna bağlı olarak besinlerin ve büyüme düzenleyicilerin doku tarafından alınımının engellenmesinin sonucu olduğu belirtilmiştir [25]. Sükroz'un farklı konsantrasyonlarının *Papaver rhoëas* tohumlarının çimlenmesi üzerindeki etkisine bakıldığında, en iyi sonuç % 3 sükroz'da tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada, *Nymphaea alba L.* bitkisinde 5 farklı sükroz konsantrasyonu (30, 25, 20, 15, 10 g/l) uygulanmış, en iyi çimlenme yüzdesi 25 g/l sükroz içeren MS besin ortamında elde edilmiştir [26]. Bu sonuç bizim elde ettiğimiz sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Çalışmamızda MS besin ortamında dört farklı pH seviyesinde (5.7, 5.8, 6.0, 6.5) tohum çimlenme oranları karşılaştırılmıştır. Buna göre en iyi sonuç pH 5.8 'de elde edilmiştir. Onay (1996) tarafından yapılan başka bir çalışmada, *Pistacia vera* (Antepfıstığı) bitkisi nodal segmentlerinin farklı pH (5.6, 5.7, 5.8, 6.0, 6.5, 7.0) seviyelerinde, sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu üzerindeki etkisine bakılmış, en etkili uygulamaların pH 5.8 ve pH 5.7 olduğu belirtilmiştir [27].

Sonuç olarak, ülkemizin mevcut bitki potansiyelinin, çeşitli endüstri sahalarında kullanımı, dünyada bu konuda yapılan çalışmalar genel hatlarıyla değerlendirildiğinde büyük bir öneme sahip olduğu anlaşılmaktadır [28]. Tüm dünyada olduğu gibi, ülkemizde de son yıllarda doğal bitkisel zenginliklerimizin yavaş yavaş tükenmesi, tıbbi öneme sahip yabancı bitkilerin kültürünün yapılması bir zorunluluk halini almıştır. Yaptığımız bu çalışma ile *Papaver rhoëas* tohumlarının *in vitro* ortamda, farklı besin ortamlarında çimlendirilmesi başarıyla gerçekleştirilmiştir ve çalışmamızın bundan sonra bu tür ile ilgili olarak yapılacak doku kültürü çalışmalarına temel oluşturacağı düşünmekteyiz.

5. KAYNAKÇA

- [1] A. Hamilton, P. Hamilton, "Plant Conservation: An ecosystem approach", Earthscan Publications Limited, ISBN: 9781844070824, 351 p. (2006).
- [2] A. Ocak, "Eskişehir Çatacık Florası I", Eskişehir Büyükşehir Belediyesi Yayını, 346 s (2007).
- [3] E. Yücel, "Türkiye'de Yetişen Tıbbi Bitkiler 1", 406 sayfa, Eskişehir (2007).
- [4] G. Sariyar, "Biodiversity in the alkaloids of Turkish *Papaver* species", Pure Appl. Chem., 74 (4), 557-574 (2002).
- [5] E. Yücel, A. Tülükoğlu, "Gediz (Kütahya) çevresinde halk ilacı olarak kullanılan bitkiler", 9 (36), 12-14 (2000).
- [6] D. A. Kostic, S. S. Mitic, M. N. Mitic, A. R. Zarubica, J. M. Velickovic, A. S. Dordevic, A. S. Randelovic, "Phenolic contents, antioxidant and antimicrobial activity of *Papaver rhoëas* L. extracts from Southeast Serbia", Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4 (17), 1727-1732 (2010).
- [7] Ş. S. İşbilir, "Yaprakları salata-baharat olarak tüketilen bazı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi", Doktora tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 132 p (2008).
- [8] C. Cimpoi, "Analysis of some natural antioxidants by thin-layer chromatography and high performance thin-layer chromatography", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies", 29: 1125-1142 (2006).
- [9] S. E. Meyer, S. B. Monsen, "Habitat-correlated variation in mountain big sagebush (*Artemisia tridentata* ssp. *vaseyana*) seed germination patterns", Ecology, 72: 739-742 (1991).
- [10] W. Schütz, P. Milberg, "Seed dormancy in *Carex canescens*. Regional differences and ecological consequences", Oikos, 78: 420-428 (1997).

- [11] M. F. Fay, "Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods", *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 28:1-4 (1992).
- [12] E. E. Benson (Editor), "Plant conservation biotechnology, Chapter 15 (V. C. Pence)", London, UK: CRC Press, 227-242 p (1999).
- [13] E. E. Benson, J. E. Danaher, I. M. Pimbley, C. T. Anderson, J. E. Wake, S. Daley, L. K. Adams, "In vitro micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant", *Biodiversity and Conservation*, 9, 711-726 (2000).
- [14] C. C. Baskin, P., Milberg, L., Andersson, J. M., Baskin, "Non-deep simple morphophysiological dormancy in seeds of the weedy facultative winter annual *Papaver rhoëas*", *Weed Research*, 42, 94-202 (2002).
- [15] Benech-Arnold, R. L., Sanchez, R. A., Forcella, F., Kruk, B. C., Ghersa, C. M., 2000, Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil, *Field Crops Research*, 67, 105-122.
- [16] Bewley, J. D., 1997, Seed germination and dormancy, *The Plant Cell*, 9, 1055-1066.
- [17] B. Akın, "Dormansi kırıcı yöntemlerin yabancı ot tohumları üzerinde etkileri", Yüksek Lisans Tezi, 62 s. (2004).
- [18] M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan, "Bitki biyoteknolojisi, I. Doku kültürü ve uygulamaları", Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 374 s. (2002).
- [19] T. Murashige and F. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", *Physiol. Plant.* 15: 473-497 (1962).
- [20] İ. Kocaçalışkan, , Bitki doku kültürleri, Bizim Büro Basımevi, Ankara, 3. Baskı, 136 p. (2008).
- [21] K. Özdamar, "SPSS ile Biyoistatistik". Kaan Kitapevi, Yayın No: 3-4, ISBN: 975-6787-03-1, 452 s. (2001).
- [22] M. Savory-Posselius, "Herbology, home health care management & practice", Volume 16 (6), 456-463 (2004).
- [23] R. L. Benech-Arnold, R. A. Sanchez, F. Forcella, B. C. Kruk, C. M. Ghersa, "Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil", *Field Crops Research*, 67, 105-122 (2000).
- [24] M. Abdoli, A. Moieni, H. Dehghani, "Effects of cultivar and agar concentration on in vitro shoot organogenesis and hyperhydricity in sunflower (*Helianthus annuus* L.)", *Pak. J. Bot.*, 39 (1), 31-35 (2007).
- [25] C. H. Bornam, and T. C. Vogelmann, "Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification in vitro in *Picea abies*", *Physiol. Plant.* 61: 505-512 (1984).
- [26] S. Sumlu, H. H. Atar, K. M. Khawar, "Breaking seed dormancy of water lily (*Nymphaea alba* L.) under *in vitro* conditions", *Biotechnol. & Biotechnol. EQ*, 1582-1586 (2010).
- [27] A. Onay, "In vitro organogenesis and embryogenesis of Pistachio, *Pistacia vera* L.", Institute of Cell and Molecular Biology, University of Edinburgh, Doktora tezi, 198 p. (1996).
- [28] M. Avcı, "Çeşitlilik ve endemizm açısından Türkiye'nin bitki örtüsü", *Coğrafya Dergisi*, 13 : 27-55 (2005).

