

**SCORZONERA AHMET-DURANIİ S. MAKBUL & COSKUNCELEBI
(ASTERACEAE)'DE İN VİTRO ORGANOGENEZ**

Cansu SÜRÜCÜ

**Bülent Ecevit Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalında
Yüksek Lisans Tezi
Olarak Hazırlanmıştır**

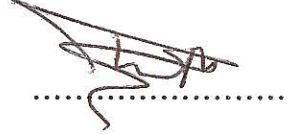
ZONGULDAK

Ekim 2012

KABUL:

Cansu SÜRÜCÜ tarafından hazırlanan “SCORZONERA AHMET-DURANII S. MAKBUL & COSKUNCELEBI (ASTERACEAE)’ DE *İN VİTRO* ORGANOGENEZ” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek, Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.
15/10/2012

Başkan: Doç. Dr. Hatice ÇÖLGEÇEN (BEÜ)



Üye : Doç. Dr. Güray UYAR (BEÜ)



Üye : Doç. Dr. Serdar MAKBUL (RTEÜ)



ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. .../.../2012



Prof. Dr. Özden ÖZEL GÜVEN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”



Cansu SÜRÜCÜ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***SCORZONERA AHMET-DURANII* S. MAKBUL & COSKUNCELEBI (ASTERACEAE)'DE *İN VİTRO* ORGANOGENEZ**

Cansu SÜRÜCÜ

Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hatice ÇÖLGEÇEN

Ekim 2012, 50 sayfa

Bu çalışmada, ülkemizin Güney Batı Toroslarında yetişen *Scorzonera* L. cinsine ait yeni keşfedilmiş olan endemik *Scorzonera ahmet-duranii* S. Makbul & Coskuncelebi materyal olarak kullanılmıştır. Sadece tip lokalitesinden bilinen *S. ahmet-duranii* orman kesimi içerisindeki dar bir alanda yayılış göstermektedir. Bu nedenle türün neslinin devamlılığı tehlike altındadır. Ayrıca *Scorzonera* cinsine ait türler, sahip oldukları sekonder metabolitler sayesinde halk arasında bazı hastalıkların tedavisinde şifalı bitkiler olarak kullanılmaktadır. Çalışmada *S. ahmet-duranii*'nin *in vitro* organogenezini amaçlanmıştır. Doku kültürü ortamı olarak çeşitli konsantrasyonlarda Kinetin ve Naftalen asetik asit (NAA) içeren modifiye edilmiş MS ortamı kullanılmıştır. Kallus oluşturma yüzdesi bakımından en başarılı eksplant kaynağı hipokotildir (%90). Apikal meristem, kotiledon ve hipokotil eksplantlarının modifiye edilmiş MS besin ortamına ekilmesi sonucunda organogenez yoluyla sürgün oluşumu gözlenmiştir.

ÖZET (devam ediyor)

Anahtar Kelimeler: *Scorzonera*, *Scorzonera ahmet-duranii*, Asteraceae, organogenez, bitki
rejenerasyon

Bilim Kodu: 401.03.00

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

***IN VITRO* ORGANOGENESIS OF
SCORZONERA AHMET-DURANII S. MAKBUL & COSKUNCELEBI
(ASTERACEAE)**

Cansu SÜRÜCÜ

**Bulent Ecevit University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology**

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Hatice ÇÖLGEÇEN

October 2012, 50 Pages

In this study, the newly discovered endemic *Scorzonera ahmet-duranii* S. Makbul & Coskuncelebi which grows in the South West Taurus in our country used as material. Just type locality known *S. ahmet-duranii* distributed in a narrow space within the forest. For this reason, the continuity of this species under threat. In addition, species in the genus *Scorzonera* used medicinal plants due to their secondary metabolites, in the treatment of certain diseases among the people. In this study, aimed at *in vitro* organogenesis of *S.ahmet-duranii*. Various concentrations of Kinetin and Naphthalene acetic acid (NAA) containing Modified MS medium was used in tissue culture. In terms of percentage of callus creation, the most successful explant source is hypocotyl. Hypokotyl generation rate is 90%. The cultivation of apical meristems, cotyledon and hypocotyl explants in modified MS nutrient media shoot formation via organogenesis was observed.

ABSTRACT (continued)

Key Words: *Scorzonera*, *Scorzonera ahmet-duranii*, Asteraceae, organogenesis, plant regeneration

Science Code: 401.03.00

TEŞEKKÜR

Tez alıőmam sűresince araőtırmalarımın her aőamasında yardımlarını ve ilgisini esirgemeyerek beni yűnlendiren danıőman hocam Sayın Do. Dr. Hatice ÇÖLGEÇEN'e (BEÜ) ,

alıőmamda kullandıėım bitkinin toplanması aőamalarını yűrűten ve benimle her tűrlű bilgi birikimini paylaőan Sayın Doç. Dr. Serdar MAKBUL'e (RTEÜ) ve Prof. Dr. Kamil Coőkunçelebi'ye (KTÜ),

Laboratuvar çalıőmalarım boyunca yardımlarını ve arkadaőlıėını esirgemeyen Uzman Biyolog Yasin HAZER'e ve Biyolog Yeőim KORKMAZ'a (BEÜ),

Hayatımın her aőamasında gűvenlerinden bűyűk destek aldıėım ve her konuda bana yardımcı olan annem Gűnűl SŪRŪCŪ'ye ve babam Rűstem SŪRŪCŪ'ye teőekkűrlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
BÖLÜM 1 GİRİŞ	1
1.1 ASTERACEAE FAMILYASININ GENEL ÖZELLİKLERİ.....	1
1.1.1 <i>Scorzonera</i> Cinsinin Özellikleri	2
1.1.2 <i>Scorzonera ahmet-durani</i> S. Makbul & Coskuncelebi.....	4
1.2 BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ	5
1.2.1 Besin Ortamında Bulunan Maddeler	6
1.2.2 Bitki Doku Kültüründe Organogenez.....	8
BÖLÜM 2 KAYNAK ARAŞTIRMASI	13
2.1 SCORZONERA CİNSİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR	13
2.1.1 <i>Scorzonera</i> Cinsinde Yapılan Doku Kültürü Çalışmaları.....	14
BÖLÜM 3 MATERYAL VE METOT	15
3.1 MATERYAL	15
3.2 METOT.....	16
3.2.1 Besin Ortamlarının Hazırlanması	16

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
3.2.2 pH Ayarı	21
3.2.3 Sterilizasyon	22
3.2.4 Ortamların Dökülmesi	23
3.2.5 Tohum ve Eksplantların Ekimi	24
3.2.6 İnkübasyon.....	27
3.2.7 Köklendirme	27
3.2.8 Dış Ortama Alıştırma.....	28
3.2.9 İSTATİSTİK.....	29
BÖLÜM 4 ARAŞTIRMA BULGULARI	31
4.1 SCORZONERA AHMET-DURANIİ AKENLERİNİN ÇİMLENDİRİLMESİ	31
4.2 KALLUS OLUŞUMU	31
4.3 SÜRGÜN OLUŞUMU	34
4.4 ALT KÜLTÜR	37
4.5 KÖK OLUŞUMU	37
4.6 DIŞ ORTAMA ALIŞTIRMA	38
BÖLÜM 5 TARTIŞMA VE SONUÇ	41
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 <i>S. ahmet-duranii</i> S. Makbul & Coskuncelebi	5
3.1 <i>S. ahmet-duranii</i> bitkisinin toplandığı lokasyon.	15
3.2 <i>S. ahmet-duranii</i> akeni.	23
3.3 Laminar kabinde <i>in vitro</i> eksplant ekimi.....	24
3.4 <i>S. ahmet-duranii</i> fidesinin apikal meristem eksplantları.....	25
3.5 <i>S. ahmet-duranii</i> fidesinin kotiledon eksplantları.	25
3.6 <i>S. ahmet-duranii</i> fidesinin hipokotil eksplantları.	26
3.7 <i>S. ahmet-duranii</i> fidesinin ilk yaprak eksplantları.	26
3.8 <i>S. ahmet-duranii</i> fidesinin kök eksplantları.	27
4.1 <i>S. ahmet-duranii</i> fidesinin apikal meristem eksplantlarından oluşan kalluslar.....	31
4.2 <i>S. ahmet-duranii</i> fidesinin kotiledon eksplantlarından oluşan kalluslar.	32
4.3 <i>S. ahmet-duranii</i> fidesinin hipokotil eksplantlarından oluşan kalluslar.	32
4.4 <i>S. ahmet-duranii</i> fidesinin ilk yaprak eksplantlarından oluşan kalluslar.	32
4.5 <i>S. ahmet-duranii</i> fidesinin kök eksplantlarından oluşan kalluslar.	33
4.6 <i>S. ahmet-duranii</i> apikal meristem eksplantlarından indirekt sürgün oluşumu.	35
4.7 <i>S. ahmet-duranii</i> kotiledon eksplantlarından indirekt sürgün oluşumu.	35
4.8 <i>S. ahmet-duranii</i> hipokotil eksplantlarından indirekt sürgün oluşumu.	36
4.9 <i>S. ahmet-duranii</i> kotiledon eksplantından direkt sürgün oluşumu.....	36
4.10 <i>S. ahmet-duranii</i> apikal meristem eksplantından elde edilen sürgünün köklendirilmesi.	38
4.11 Steril toprakta ve %55 nem oranında yaşayan 1 aylık genç klon fide.	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 MS tohum çimlendirme ortamında kullanılan majör tuzlar.	17
3.2 MS tohum ortamında kullanılan minör tuzlar.	17
3.3 MS tohum ortamında kullanılacak demir stoğu.	18
3.4 MS tohum ortamında kullanılacak vitamin stoğu.	18
3.5 Modifiye edilmiş MS ortamında kullanılan majör tuzlar.	19
3.6 Modifiye edilmiş MS ortamında kullanılan vitamin stoğu.	20
3.7 Organogenez için hazırlanan modifiye edilmiş MS ortamı içeriği.	21
3.8 Organogenez ile elde edilen aseptik fidelerin köklendirme ortamları.	28
4.1 Modifiye edilmiş MS ortamındaki <i>S. ahmet-duranii</i> eksplantlarının kallus oluşumu yüzdeleri.....	34
4.2 Modifiye edilmiş MS ortamındaki <i>S. ahmet-duranii</i> eksplantlarından sürgün oluşum yüzdeleri.....	37

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

cm	: Santimetre
g	: Gram
K	: Kinetin
mg	: Miligram
mm	: Mililitre
NAA	: Naftelenasetik asit
MS	: Murashige-Skoog (1962)
IUCN	: International Union for Conservation of Nature (Dünya Korunma Birliği)
CR	: Critically Endangered (Kritik olarak tehlike altında)
NH ₄ ⁺	: Amonyum
NO ₃ ⁻	: Nitrat
Fe-EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
α	: Alfa
°C	: Derece
IBA	: Indolbütirikasit
2,4-D	: 2,4 Diklorofenoksiasetikasit
2,4,5-T	: 2,4,5 Triklorofenol
BAP	: 6 Benzilaminopürin
RUB	: Recep Tayyip Erdoğan Üni., Fen-Edeb. Fak. Biyoloji Böl. Herbaryumu
NaOH	: Sodyumhidroksit
HCl	: Hidrojenklorür
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences (Sosyal bilimler için istatistik paket)
μ M	: Mikromolar

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Scorzonera L. cinsinde bulunan bitkilerin zengin kimyasal içeriklere sahip olması; idrar söktürücü, bağırsak düzenleyici, ateş düşürücü, ağrı kesici, yara tedavi edici, antiromatizmal ve antihelmintik etkilere sahip olması; ülser, neoplazi, akciğer ödemi, meme iltihabı gibi rahatsızlıkların ve bazı bakteriyel ve viral enfeksiyonların tedavisinde kullanılması çalışmamızda kullandığımız bitkinin ülkemiz açısından potansiyel değeri yüksek bir bitki olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmada kullandığımız *Scorzonera ahmet-duranii* S. Makbul & Coskuncelebi bilim dünyasına yeni bir endemik tür olarak tanıtılmıştır (Makbul vd. 2012). Ülkemizin Güney Batı Toros'larında sadece C2 Muğla ili Sandras Dağında yayılış göstermektedir. *S. ahmet-duranii* sadece tip lokalitesinde bilinmektedir ve popülasyon orman kesim alanı içerisindeki dar bir alanda yayılış göstermektedir. Orman yangınları ve orman tarımı popülasyonun gelişimini baskılamaktadır. Türün devamlılığı tehlike altındadır. Bu nedenle tür IUCN'e göre (2001) "Critically Endangered (CR)" tehlike kategorisindeki türler arasındadır.

Yapılan literatür incelemelerine göre *Scorzonera* taksonlarının *in vitro* doku kültürü üretilmesi üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu alanda bir ilk olan çalışmamız bundan sonra cins üzerinde yapılacak diğer çalışmalara ışık tutacaktır.

1.1 ASTERACEAE FAMILYASININ GENEL ÖZELLİKLERİ

Asteraceae familyası dünyada 1700 cins ve 25000 tür ile temsil edilen, yeryüzünde en geniş yayılış alanına sahip, çiçekli bitkilerin en zengin familyasıdır (Funk et al. 2009). Ülkemizde ise 133 cins ve 1156 türü bulunmaktadır (Seçmen vd. 2004). Bu familyada bulunan bitkilerin çoğu otsudur. Nadiren ağaç ve tırmanıcı olanları da vardır.

Yapraklar alternat veya oppozit dizilimli, nadiren dairesel, basit veya birleşiktir. Çiçek durumu kapitulumdur. Kapitulumun taban kısmında ovülasyondan meydana gelmiş bir veya çok serili involukrum bulunur. Çiçekler erdişi veya tek eşeyli; aktinomorf veya zigomorftur. Çiçeklerde kaliks, pappus, halka ya da pul biçimindedir veya hiç yoktur. Korolla tüpsü (tubulat) ya da dilsidir (ligulat). Tüpsü korolla uçta belirgin 5 dişlidir. Dilsli korolla 3-5 dişlidir veya dişler belirgin değildir. Stamenler 5 tane, anterleri birleşik, filamentleri serbest durumdadır (singenezik). Ovaryum alt durumlu, tek lokuluslu ve 2 karpelden meydana gelmiştir. Meyve akendir, ucunda bazen bir papus veya kaliks kalıntısı taşır (Baytop A 1983; Seçmen vd. 2004; Tanker vd. 2007).

1.1.1 *Scorzonera* Cinsinin Özellikleri

Asteraceae familyasının bir üyesi olan *Scorzonera* cinsi ismini İspanyolca'da siyah kabuk anlamına gelen “escorza nera” sözcüklerinden almıştır (Stephens 1994). *Scorzonera* cinsi Avrasya ve Afrika'nın kurak bölgelerinde yaygın olmasına rağmen eski Akdeniz kökenlidir ve yaklaşık 180 tür içermektedir (Lack 2007). *Scorzonera* cinsinin ilk ayrıntılı teşhisi Candolle (1805) tarafından yapılmıştır. Daha sonra bu teşhiste Boisseir (1875) tarafından önemli değişiklikler yapılmıştır. En son, cinsin tamamlanmış teşhisi Lipschitz'in “Fragmenta monographiae generis *Scorzonera*” (1939) eserinde verilmiştir. Bu eser daha sonra birçok modern bölgesel floralar tarafından da kabul edilmiştir (Chamberlain 1975; Chater 1976; Rechinger 1977).

Cinsin avrupa'da yayılış gösteren 28 türü bulunmaktadır (Chater 1976). 2000'li yıllara gelindiğinde yeni taksonların da keşfiyle *Scorzonera* cinsinin Avrasya ve Afrika'nın kurak bölgelerinde yayılış gösteren toplam 180 türü bulunduğu belirtilmiştir (Lack 2007). Avrupa'da 30 kadar ve İran'da yaklaşık 70 türü yetişmektedir (Doğan ve Duran 2010).

Scorzonera cinsi ülkemizin değişik bölgelerine adapte olmuş çok sayıda tür ile temsil edilmektedir. Bu cins sistematik açıdan Türkiye Florası'ndaki zor ve problemlili cinslerden birisidir. Türkiye florası'da 39 türle temsil edilen *Scorzonera* cinsi ile ilgili günümüze kadar birçok sistematik çalışma yapılmıştır.

Bu çalışmalar neticesinde *S. pisidica* Hub.-Mor. (Chamberlain 1975), *S. latifolia* (Fisch. Et C. A. Mey.) DC. var. *angustifolia* Prilipko ex Lipsch. (Güner 2000), *S. sandrasica* Hartvig & Strid (Hartvig and Strid 1987), *S. longiana* Sümbül (Sümbül 1991), *S. adilii* A. Duran (Duran 2002), *S. ulrichii* Parolly & N. Kilian (Kilian and Parolly 2002), *S. karabelensis* Parolly & N. Kilian (Parolly and Kilian 2003), *S. yildirimlii* A. Duran & Hamzaoğlu (Duran ve Hamzaoğlu 2004), *S. ketzkhovellii* Grossh. (Hamzaoğlu vd. 2010), *S. tuzgolensis* A. Duran, B. Doğan ve S. Makbul (Doğan vd. 2011) *S. kurtii* Yıld. (Yıldırım 2011) ve *S. ahmet-duranii* (Makbul vd. 2012) gibi taksonlar Türkiye florasına yeni katılmışlardır. Günümüzde bazı sinonim çalışmalarının ve yeni türlerle ilgili sistematik çalışmaların devam ettiği de bilinmektedir. Bu veriler ışığında şu an itibari ile *Scorzonera* Türkiye’de 57 takson ile temsil edilmektedir (Makbul vd. 2012).

Bu cinse ait bitkiler tek, iki veya çok yıllıktırlar. Genellikle otsudur nadiren yarı çalimsı veya gövdeli taksonları içerirler. Kökler kalın, silindirik veya yumru şeklindedir. Yapraklar, bazal ya da gövdede basit linear olarak dizilir; ovat veya lanseolat tipte ve derin lobludur. Kapitulum homogram, ligulat şeklinde tek ya da birkaç tanedir. İnvolukrum ovat veya silindirik şeklindedir. Reseptakulum tüsüzdür ve genellikle yuvarlaktır. Çiçekleri beyaz, sarı, mor veya menekşe renklidir. Meyve akendir. Akenler silindirik, düz ya da oluklu, bazen lamellat-rugolose, tüylü veya tüsüz, saplı ya da sapsızdır. Pappus üç sıralıdır. Pappus tüyleri plumose, bazen de scabrittir (Chamberlain 1975).

Scorzonera cinsinin taksonomideki yeri (Cronquist 1968);

Divisio : Spermatophyta
Subdivisio : Angiospermae
Classis : Magnoliopsida
Subclassis : Asteridae
Ordo : Asterales
Family : Asteraceae
Subfamily : Liguliflorae
Tribus : Lactuceae
Subtribus : Scorzonerinae
Genus : *Scorzonera*

1.1.2 *Scorzonera ahmet-duranii* S. Makbul & Coskuncelebi

S. ahmet-duranii bitkisi Türkiye için endemik bir bitkidir. Ülkemizin Güney Batı Toros'larından bilinen bitki sadece C2 Muğla ili Sandras Dağında yayılış göstermektedir. 1655 m yükseklikte yetişen *S. ahmet-duranii* sadece tip lokalitesinden bilinmesi ve dar bir alanda yayılış göstermesinden dolayı IUCN kırmızı listesine göre Critically Endangered (CR) tehlike kategorisinde yer almaktadır. Ayrıca popülasyonun dar bir alanda dağılım göstermesi, orman kesim alanları içerisinde yer alması ile orman yangınları bitkinin geleceğini etkileyen diğer önemli unsurlardır.

Bitki yarı gövdeli (subskeyp) veya gövdeli (caulescent), çok yıllık, 15-17 cm; kök 5-6,74 mm çapında, silindirik; gövde dik (erect), tek tek, çoğunlukla tabanda kısa kıvrık (crisped-pubescent) veya uzun yatık yumuşak (villous) tüylü, genellikle alt kısımlarda dallanmış ve her bir dal tek kapitulumlu, gövdenin tabanında çok yıllık yaprak kalıntıları mevcut. Gövde yaprakları basit, çoğunlukla sapsız (sessil), 6-11 x 0,5-1,3 cm, linear veya lanseolat, yeşil, gittikçe daralan, tabana yakın gövdeyi yarı sarı (semiamplexicaul), kenarları dalgalı (undulat), tüylü (crisped-pubescent), ucu akut veya akuminat; taban yaprakları gövde yapraklarına benzer, yeşil. Kapitulum her bir bitkide 1-2, dilsel (lingulat), çiçekli kapitulum 2,5-3,5 x 0,5-0,7 cm, meyveli kapitulum 3-4 x 0,8-1,2 cm; iç fillarilerin sayısı 8, 20-35 x 7-11 mm, linear veya lanseolat, dış yüzeyi iç yüzeyi tüysüz, uç kısımları akut, kenarları zarımsı 0,86 mm; dış fillarilerin sayısı 8, 11-14 x 5-7 mm, ovat, dış yüzey tüylü (pubescent), iç yüzey tüysüz, uç kısımları akut, kenarları zarımsı. Çiçekler sarı, lingulalar 16 x 2,5 mm, tüp kısmı yaklaşık 5 mm; lingulanın iç fillariye oranı yaklaşık 3/5. Akenler 12-16 x 2-3 mm, açık kahverengi, az oraksı (falcat), sırt çizgili (ridge), yüzeyi pürüzsüz, tüysüz; pappus krem veya çok açık kahverengi, 13-15 mm, tabana yakın ince uzun sık (plumoz), üst kısımlarda kısa sakalsı (barbellat) tüylü. Çiçeklenme Haziran-Temmuz, meyve dönemi Temmuz. 1600 m arası yükseklikte bulunur (Şekil 1.1) (Makbul vd. 2012).



Şekil 1.1 *S. ahmet-durani* S. Makbul & Coskuncelebi.

1.2 BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir. Bitki rejenerasyonu, kültürü yapılan hücrelerin özellikleri itibariyle üç kısımda incelenebilir;

1. Meristematik hücreleri ihtiva eden somatik dokulardan rejenerasyon,
2. Meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon ve
3. Mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden rejenerasyon.

Birinci tip rejenerasyonda uç ve yan meristemlerden bitkiler çoğaltılır. Buna meristem kültürü yoluyla klonal çoğaltım denilir. Elde edilen hücreler, tamamen donör (verici) bitkiye benzerler. İkinci tip rejenerasyon; doğrudan bir bitki parçasının (eksplant denilir) kesilmiş yüzeylerindeki belirli somatik hücrelerin bir kısmının genellikle besin ortamına ilave edilen

bitki büyüme düzenleyicilerinin (özellikle oksin ve sitokinler) etkisiyle bölünerek ve organize olarak, organları ve daha sonra da bitkiyi (direkt organogenesis) veya bir somatik hücrenin sürekli bölünerek embriyo ve daha sonra da tam bir bitkiyi oluşturması (direkt somatik embriyogenesis) şeklinde olabilir. Ayrıca her iki durum, belirli bir kallus, protokallus veya hücre süspansiyonu oluşumu devresinden sonra da ortaya çıkabilir (indirekt rejenerasyon). Son olarak normal kromozom sayısının yarısını ihtiva eden hücrelerden de direkt veya dolaylı yollarla bitki rejenerasyonu olabilir. Bu durumda donör bitkinin kromozom sayısının yarısına sahip, genellikle steril olan haploid bitkiler elde edilebilir (Babaoğlu vd. 2001).

1.2.1 Besin Ortamında Bulunan Maddeler

1.2.1.1 Makro Elementler

Temel besin ortamı içindeki en önemli komponentlerden birisi azottur. Bazı besin ortamlarında yüksek oranda, değişik formlarda (NH_4^+ , NO_3^-), bazı ortamlarda çok düşük oranda azot bulunur veya hiç bulunmaz. Fakat azot besin ortamlarında NO_3^- formunda daha fazla bulunur. Bitki kültürleri ilk önce ortamdan genellikle NH_4^+ formunda azotu alırlar ve daha sonra pH düşüncü NO_3^- formunda kullanmaya başlarlar. Besin ortamlarında kullanılan diğer önemli makro elementler arasında ise fosfor, sodyum, magnezyum, kükürt ve kalsiyum sayılabilir.

1.2.1.2 Mikro Elementler

En çok kullanılan mikro elementler sırasıyla demir, manganez, çinko, bor, bakır, molibden, kobalt ve iyottur. Bunun yanı sıra demirin bitki hücreleri tarafından daha kolay alınabilmesi için Fe-EDTA formu da kullanılabilir.

1.2.1.3 Vitaminler

Vitaminler enzim reaksiyonlarında katalitik etkiye sahiptirler. Bitki kültürleri için en gerekli vitaminler thiamin (B1) ve daha sonra sırasıyla nikotinik asit (B3) ve pridoksindir (B6). Myo-

inositol ve d-biotin (H)'de öncelikle gerekli vitaminler içerisinde değerlendirilmektedir. Diğer vitaminler arasında ise d-pantotenik asit (B5), askorbik asit (C), α -tokoferol (E), folik asit (M), retinol (A), riboflavin (B2) ve kolekalsiferol (D3) zaman zaman özel uygulamalarda besin ortamlarına ilave edilmektedir.

1.2.1.4 Şekerler

Kültüre alınan bitki hücre ve dokuları yeterli miktarda karbohidrat sentezi yapamadıklarından enerji kaynağı olarak çeşitli şekerler kullanılmaktadır. Bunlar arasında en fazla kullanılanı sakkarozdur. Besin ortamlarında sıklıkla kullanılan diğer şekerler, glikoz, maltoz, rafinoz ve fruktozdur.

1.2.1.5 Jel Yapıcı Maddeler

Jel yapıcı maddeler besin ortamını yarı-katı hale getirmek için kullanılan komponentler arasındadır. Bunlar genellikle kırmızı deniz alglerinden çıkarılan çeşitli polisakkarit bileşimidir. En çok kullanılanlar; agar, agaroz, Sea-krem agaroz, aljinat, jelatin ve nişastadır. Agar ve agaroz gibi maddeler 100 °C civarında su ile jel oluştururlar ve 45 °C civarında katılaşmaya başlarlar.

1.2.1.6 Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Besin ortamının çoğu durumlarda vazgeçilmez komponentleri arasındadırlar. Organik veya sentetik yollarla üretilebilirler. Temel olarak; oksinler, sitokininler, gibberellinler, absisik asit, etilen, aminoasitler, yapısı tam olarak açıklanamayan maddeler (Hindistan cevizi sütü, maya özü, kazein hidrolizat vb.), organik asitler, antibiyotikler, biyositler ve toksik madde tutucular olarak sınıflandırılabilirler. Uygun olmayan konsantrasyonlarda besin ortamlarına ilave edildiklerinde genellikle hiçbir etki ortaya çıkarmazlar. Oksinler; fotoperiyodizm, köklendirme, apikal dominans, yan sürgünlerin gelişiminin engellenmesi ve hücre gelişiminde etkilidirler.

Oksinler, doku kültürlerinde tek başına kullanıldıklarında kallus uyarımını, hücre süspansiyonlarının elde edilmesini ve somatik embriyo oluşumunu, sürgün rejenerasyonunu (organogenesis) ve somatik embriyo oluşumunun uyarılmasını sağlayabilirler. Oksinler, elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinde oldukça faydalıdır. Temel hormon formu IAA (indol-3-asetik asit)'tir.

Sentetik oksinler arasında NAA, IBA, 2,4-D, 2,4,5-T sayılabilir. Sentetik oksinler ticari uygulamalarda meyve dökümünün engellenmesi ve çeliklerin köklendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Sitokininler, çoğunlukla kök ucu meristemi ve genç yapraklarda üretilir. Hücre bölünmesinde, yeniden farklılaşmada, bitki rejenerasyonunda, sürgün çoğaltımında etkilidir. Antioksidan etki göstererek yaşlanmayı da geciktirir. Sürgünlerde köklenmeyi ve embriyogenesisi engellerler. En çok kullanılan sitokinler adenin türevleridir. Bunlar içinde BAP (6-Benzilaminopürin) en çok kullanılanıdır (Babaoğlu vd. 2001).

1.2.2 Bitki Doku Kültüründe Organogenez

Bitkiyi meydana getiren canlı hücrelerden herhangi birisi tekrar bölünerek ve farklılaşarak yeni bir bitkiyi meydana getirebilme kapasitesine sahiptir. Buna totipotensi denir. Bu kapasite kullanılarak protoplastların, hücrelerin, dokuların ve organların kültürleri yapılarak *in vitro* rejenerasyonu gerçekleştirilebilmektedir. Organogenez, dokulara ve kallusta hücrelere baskı uygulayarak değişikliklerin meydana gelmesi, sürgün veya kök primordiyumu olarak adlandırılan tek kutuplu yeni dokuların ve vasküler sistemin oluştuğu bir olaydır. *In vitro* olarak yetiştirilen bitki dokuları farklılaşabilmekte ve yeni organlar oluşabilmektedir. Bu tür organlara örnek olarak kök, sürgün ve çiçekler verilebilir. *In vitro* kontrollü sürgün gelişiminin ilk kayıtları White (1939) tarafından yapılmıştır. Bu araştırmacı, sıvı besin ortamına gömülmüş *Nicotiana glauca x Nicotiana langsdorfii* melezlerinden elde edilen kallus üzerinde sürgünlerin oluştuğunu gözlemiştir. Aynı yıl, kallustan kök oluşumunun ilk gözlemleri Nobecourt (1939) tarafından havuç kallusları kullanılarak yapılmıştır. Takip eden yıllarda White'ın bulguları Skoog (1944) tarafından da doğrulanmış ve geliştirilmiştir. Bu araştırmacı, oksinin kök oluşumunu uyardığını ve sürgün oluşumunu engellediğini göstermiştir.

Bunun yanında Skoog (1944) oksinin sürgün oluşumundaki engelleyici etkisinin, ortamdaki sakaroz ve inorganik fosfatların miktarını artırarak kısmen de olsa ortadan kaldıracabileceğini göstermiştir. Skoog and Tsui (1948), adenin sülfatın sürgün oluşumunu hızlandırdığı ve oksinin engelleyici etkisini yok etmekte aktif olduğunu göstermiştir. Aynı araştırmacılar, bu sonuca ek olarak organ oluşumunun ilerlemesinin bu eklenen maddelerin konsantrasyonu ve oranı ile ilgili olduğunu kaydetmişlerdir. Benzer sonuçlar diğer laboratuvarlarda da kaydedilmiş ve takip eden yıllarda *in vitro* koşullarda organ oluşturan türlerin sayısının hızla artmasına yol açmıştır. 1956 yılında Miller ve arkadaşları tarafından Kinetin'in keşfedilmesi, Skoog and Miller (1957)'in klasik buluşunu ortaya çıkarmıştır. Tütün kallusu ile yapılan çalışmalar, oksinin sitokinine göre ortamda yüksek oranı kök oluşumunu, tersi ise sürgün oluşumunu ve arada olan oranlar ise kallus gelişimini desteklediğini göstermiştir. Yüzlerce bitki türünde bu yaklaşım sonucunda *in vitro* sürgünler ve kökler oluşmuştur (Babaoğlu vd. 2001).

În vitro organogenesis üzerine yapılan araştırmaların büyük bir kısmında, etkin bir organ oluşumunun yerine getirilmesi için gerekli olan şartlardan en önemli olanları;

1. Uygun eksplantın seçilmesi
2. Büyümede aktif maddeleri içeren uygun bir besin ortamının seçilmesi
3. Fiziksel çevre koşullarının kontrolüdür.

Organogenesisde başarı elde etmenin en önemli koşullarından birisi, uygun bir eksplant kaynağının seçilmesidir. Başta genotipik varyasyon olmak üzere, çeşitli faktörler kültüre alınan eksplantın davranışını etkileyebilir. Bu faktörler; a) doku kaynağı olarak kullanılan organ, b) organın ontogenetik ve fizyolojik yaşı, c) eksplantın bitkiden alındığı dönem, d) eksplantın büyüklüğü ve e) eksplantın alındığı bitkinin diğer genel özellikleridir. Normal şartlarda, herhangi bir bitki parçası organogenesis çalışmalarında eksplant olarak kullanılabilir. Fakat yaygın olarak kullanılan eksplantlar; gövde, kök, yaprak, çiçek durumu, fide organları ve tohum embriyosudur. Bu tür eksplantlar, direkt olarak veya indirekt olarak organ ve embriyo oluştururlar. Bazı türlerde kullanılacak diğer bir eksplant kaynağı da ince hücre katmanlarıdır (thin cell layers). Örneğin, 3-5 hücre içeren epidermal ve subepidermal katmanlar gibi. Bu hücre katmanlarından direkt olarak çiçek tomurcuğu, vejetatif tomurcuk, kök ve kallus oluşturmak mümkündür (Babaoğlu vd. 2001).

Herhangi bir organizasyon göstermemiş hücreler yığına kallus denir. Kallus aseptik şartlar altında düzenli zaman aralıkları ile alt kültür yapıp yeni ortamlara aktararak uzun süre korunabilir. Fakat dış görünüşüne rağmen değişmez bir doku değildir. Kallusun uzun süre alt kültüre alınması bazı yapısal değişikliklere yol açmaktadır. Bunlardan en sık karşılaşılan durumlar şunlardır:

1. Bitkinin gelişmesi için artık eksojen bitki büyüme düzenleyicilerine ihtiyaç duymamaları ve neticede “hormon-otonom” bir kallusun meydana gelmesi (habituation).
2. Organik potansiyelin yani yeni adventif sürgün veya kök meydana getirme yeteneğinin azalması veya tamamen ortadan kalkması.
3. Kallus dokusunun yapısında bazı değişikliklerin kendiliğinden ortaya çıkması, örneğin nispeten küçük hücrelerden meydana gelmiş sık yapılı bir kallus veya daha büyük ve şeffaf hücrelerden oluşmuş gevşek yapılı bir kallusun meydana gelmesidir.

Aynı bitki türünden alınan eksplantlar organogenesis oluşturma kapasitesi bakımından büyük farklılıklar gösterebilirler. Bunun yanında kallus homojen olmayıp kültürde yaş ile birlikte çeşitli değişikliklere maruz kalmaktadır. Bu nedenle, organogenesis çalışmalarında eksplant kaynağı seçilirken, söz konusu bu faktörlerin dikkate alınması gerekir. Bu husus, sitolojik bakımdan benzer olan hücrelerin biyokimyasal yeterliliklerinde büyük farklar olduğu anlaşıldığı zaman daha da önemli bir hale gelmektedir.

In vitro organ gelişiminin indirekt organogenesis ve direkt organogenesis olmak üzere iki modeli vardır. İndirekt organogenesisde, meristematik bir merkezin oluşumundan ve takip eden sürgün veya kök oluşumundan önce, alınan eksplant dokusu organize olmamış kallus kümesinin oluşturulması için uyarılır. Direk organogenesisde ise kallus gelişimi hiç görülmez.

Kallus dokusundan sürgün gelişimi eksplantın çevresinde hücre dizilerinin oluşması ile başlar. Hücre dizileri ve eksplant arasındaki bölgelerde bazı trake elementleri ortaya çıkar. Kültürden bir hafta sonra trake elementlerinin yanında hücre bölünme bölgeleri gözlenmeye başlar. Bu bölgenin içinde özellikle kallusun alt yarısında takip eden günlerde meristematik merkezler oluşur.

Bu merkezler daha sonraki günlerde gözle görülebilir sürgün taslağını oluştururlar. En önce oluşan sürgünler ortama temas eden kallus yüzeylerinin geniş çıkıntılarını üzerinde görülür. Tomurcuklar iki hafta sonra ortaya çıkar ve bariz yapraklı vejetatif sürgünler 18-21 günlük dokularda gözlenebilir (Babaoğlu vd. 2001).

BÖLÜM 2

KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 SCORZONERA CİNSİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Özellikle Avrupa'da yetişen *Scorzonera* türlerinden bazılarının pişirilerek sebze olarak tüketildiği bilinmektedir (Stephens 1994). Bunun yanı sıra ülkemizde de bu cinse ait bazı bitkilerin kök ve yaprak kısımlarının yendiği bildirilmiştir (Turan vd. 2003; Ertürk ve Demirbağ 2003).

Scorzonera cinsi bitkilerinin halk arasında tedavi amaçlı olarak kullanıldığını belirten çalışmalar da mevcuttur. *S. hispanica*'nın idrar söktürücü, ateş düşürücü, ağrı kesici olarak kullanılmasının yanı sıra bazı akciğer hastalıklarında tedavi edici özelliği olduğu bildirilmiştir. Ülkemizde Osmanlı İmparatorluğu zamanlarında bu bitkinin yılan sokmalarına karşı kullanıldığı bilinmektedir (Baytop T 1999, Zidorn 2000, Tsevegsuren et al. 2007). *S. humilis* yara tedavi edici ve bağırsak düzenleyici olarak kullanılmaktadır (Zidorn 2001; Zidorn 2003). *S. divaricata* ülser ve neoplazi gibi hastalıklarda tedavi edici özelliğe sahiptir aynı zamanda panzehir etkisi de gösterdiği bilinmektedir. *S. pseudodivaricata* idrar söktürücü ateş düşürücü etkiye sahiptir ve bunun yanında ishal, akciğer ödemi ve parazitik rahatsızlıklarda tedavi edici olarak kullanılmaktadır (Tsevegsuren et al. 2007). *S. radiata* Moğolistan halk tıbbında, zehirli ülser tedavisinde, bazı bakteriyel ve viral enfeksiyonların tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir. *S. austriaca* kökleri Tibet halk tıbbında meme iltihabı ve çiban tedavisinde kullanılmaktadır (Jiang et al. 2007). *S. latifolia*'nın köklerinden elde edilen sakızın Türk halk tıbbında ağrı kesici etkisi olduğu bildirilmiştir. Bunun yanı sıra bu bitkinin kısırlığa ve bazı helmantik canlıların yol açtığı rahatsızlıklara karşı da kullanıldığı bilinmektedir (Baytop T 1999; Turan vd. 2003). *S. tomentosa* köklerinden elde edilen lateksin Türk halk tıbbında yara iyileştirici olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Ayrıca kısırlık tedavisinde kullanılmaktadır (Sezik vd. 1997; Sarı vd. 2007). *S. eriophora*'nın, astım, mide ağrıları ve boğazda oluşan enfeksiyonların tedavisinde kullanıldığı belirtilmiştir (Ezer ve Arısan 2006).

Scorzonera türlerinin yerel bölgelerde tedavi amaçla kullanılması, bu bitkilerin kimyasal içeriklerinin aydınlatılması gerektiğini gündeme getirmiş ve 1990'lı yılların sonundan itibaren bu cinse ait bitkilerden çeşitli yollarla dihidro izokumarinler ve türevleri (Paraschos et al. 2001, Çitoğlu vd. 2010), kumarin türevleri (Tsevegsuren et al. 2007), bibenzil türevleri (Zidorn 2001; Zidorn 2002; Zidorn 2003), flavonoidler (Tsevegsuren et al. 2007), flavanoid glikozitleri (Menichini et al.1994), lignanlar (Zidorn 2003), lignan glikozitleri (Khobrakova et al. 2003), neolignan glikozitleri (Tolstikhina and Semenov 1998), dihidro stilben türevleri (Wang et al. 2009), kuinik asit türevleri (Tsevegsuren et al. 2007), triterpenler (Öksüz vd. 1990; Bahadır vd. 2010) seskiterpenler (Zidorn 2001), seskiterpen laktonları (Zhu et al. 2010), taraksosterol türevleri (Bahadır vd. 2010) ve kava laktonları (Jiang et al. 2007) gibi kimyasal bileşikler elde edilmiştir.

Cinse ait bitkilerle bir takım biyolojik aktivite çalışmaları da yapılmıştır. Örneğin; *S. mollis* Bieb. türünün antimikrobiyal ve antifungal etkisi araştırılmıştır (Ertürk ve Demirbağ 2003). Çalışmanın sonucunda *S. mollis*'den elde edilen çeşitli ekstraktların bazı gram (+) ve gram (-) bakterilere karşı belirgin bir antibakteriyal aktivite gösterdiği ve *Candida albicans* kültürüne karşı antifungal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Son zamanlarda cinsin Türkiye taksonları üzerinde taksonomik problemlerinin çözümüne yönelik bazı morfolojik, anatomic, palinolojik çalışmalar da yapılmıştır (Makbul vd. 2010; 2011a ve 2011b; Türkmen vd. 2010).

2.1.1 *Scorzonera* Cinsinde Yapılan Doku Kültürü Çalışmaları

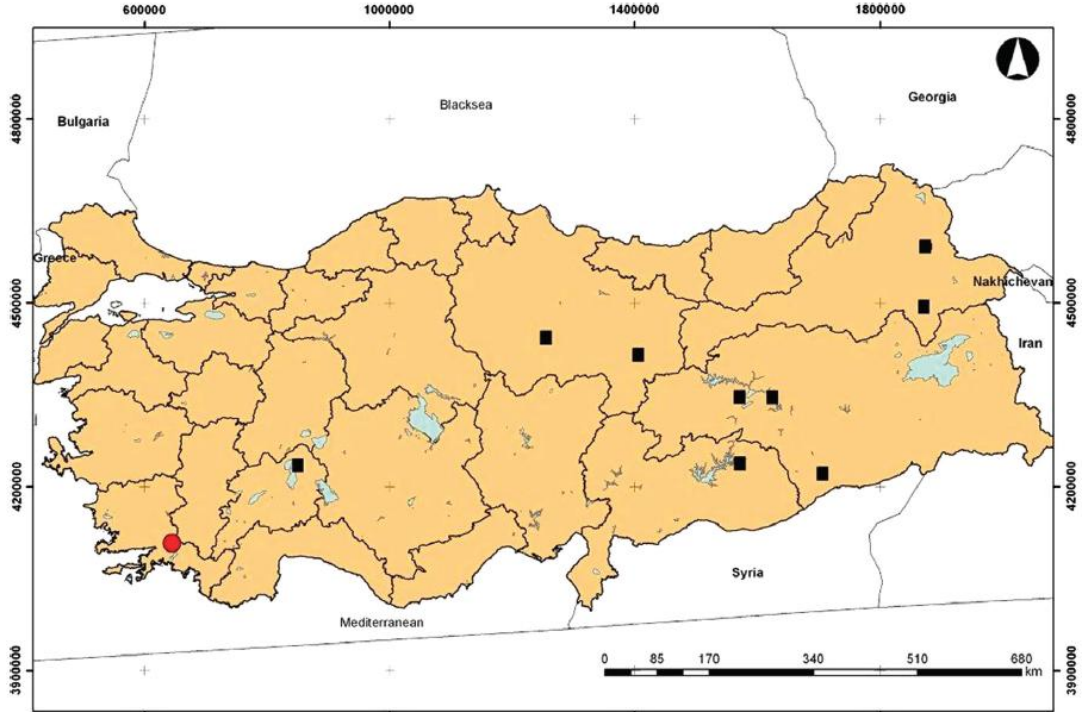
Bu çalışma *in vitro* doku kültürü alanında cins üzerinde yapılan ilk çalışma olma niteliğindedir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1 MATERYAL

Bu çalışmada kullanılan bitki materyali, TÜBİTAK tarafından desteklenen bir proje (TÜBİTAK 109T972) kapsamında 2010 yılı vejetasyon döneminde C2 karesi (Şekil 3.1) Muğla ili Sandras Dağından 1600 ve 1700 m yüksekliklerden toplandı. Toplanan örnekler teşhis edilerek standart herbaryum kurallarına göre Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü herbaryumunda (RUB) saklanmaktadır. Metatiplerden bol miktarda olgun akenler alınarak temizlenmiş ve uygun şartlarda saklanmıştır.



Şekil 3.1 *S. ahmet-duranii* bitkisinin toplandığı lokasyon (●).

3.2 METOT

Çalışmada *S. ahmet-duranii* tohumları hormon içermeyen MS (Murashige and Skoog, 1962) besin ortamında *in vitro* olarak çimlendirildi. Daha sonra *in vitro* ortamda çimlendirilen akenlerden elde edilen 25 günlük aseptik fidelerin apikal meristem, kotiledon, hipokotil, ilk yaprak ve kök eksplantları direkt ve indirekt organogenez için modifiye edilmiş MS besin ortamına alındı. Organogenez için hazırlanan bu ortamda çeşitli konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri kullanıldı. Köklendirmede bitki büyüme düzenleyicisi olarak farklı konsantrasyonlarda NAA içeren modifiye MS ortamı kullanıldı (Çizelge 3.7). Elde edilen klon fidelerin toprağa alınması ile denemeler tamamlandı.

3.2.1 Besin Ortamlarının Hazırlanması

3.2.1.1 Stok Çözeltiler

Besin ortamları hazırlanırken ortamların içerdiği kimyasal maddeler hassas terazi kullanılarak tartıldı. Düşük miktarların tartılmasının zorluğu nedeniyle ortamda kullanılan makro ve mikro elementlerin, vitaminlerin ve demir tuzlarının belirli oranlarda seyreltilmiş stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltiler renkli cam şişelere koyularak +4 °C’de saklandı. 1 litre besin ortamı için %2 (20g/L) sakkaroz ve %0.7 (7g/L) agar ilave edildi.

MS Tohum Çimlendirme Ortamının Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

3.2.1.1.1 Major Tuz Stok Çözeltisi (10x), (g/L)

1 litre balon joje içine bir miktar distile su koyuldu ve çizelge 3.1’de miktarları belirtilen maddeler hassas terazide tek tek tartılarak manyetik karıştırıcı üzerindeki balon jojeye eklendi. Maddelerin kolay çözünmesi ve homojen olarak dağılması için çözelti manyetik karıştırıcı üzerinde devamlı karıştırıldı. Daha sonra karışım distile su ile 1000 ml’ye tamamlandı. Hazırlanan major tuz stoğu renkli cam şişe içerisinde +4°C’de buzdolabında muhafaza edildi ve her besiyeri hazırlanışında bu stoktan 100 ml alınarak ortama ilave edildi.

Çizelge 3.1 MS tohum çimlendirme ortamında kullanılan majör tuzlar.

Potasyum nitrat (KNO_3)	19
Amonyum nitrat (NH_4NO_3)	16,5
Kalsiyum klorür ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	3,3
Magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	3,7
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	1,7

Major tuz stokları içerisinde bulunan kimyasal maddeler çökelti oluşturma eğiliminde olduklarından ortam hazırlanırken çökelti oluşturup oluşturmadığı kontrol edilmeli ve az miktarlarda sık sık hazırlanmalıdır.

3.2.1.1.2 Minör Tuz Stok Çözeltisi (100x), (mg/L)

Minör stok tuzu da majör tuz stoğuna benzer şekilde 1000 ml'lik balon jodelerde hazırlandı. Çözeltide kobalt klorür ve bakır sülfat eser miktarlarda bulunduğu için ayrı bir stok olarak hazırlandıktan sonra minör stok çözeltisine ilave edildi. Bunun için 25 mg kobalt klorür ve 25 mg bakır sülfat tartılıp tartılarak 100 ml distile suda çözdürüldü. Bu çözeltiden 10 ml alınarak önceden hazırlanan minör stok çözeltisine ilave edildi ve çözelti distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 1 litrelik besin ortamı için önceden hazırlanan bu minör tuz stoğundan 10 ml alındı (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 MS tohum ortamında kullanılan minör tuzlar.

Borik asit (H_3BO_3)	620
Potasyum iyodür (KI)	83
Mangan sülfat ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	1680
Sodyum molibdat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	25
Çinko sülfat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	860
Kobalt klorür ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	2,5
Bakır sülfat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	2,5

3.2.1.1.3 Demir Stok Çözeltisi (100x), (g/L)

1 litrelik balon jøjeye bir miktar distile su koyuldu ve yukarıda miktarları belirtilen maddeler hassas terazide tek tek tartılarak manyetik karıştırıcı üzerindeki balon jøjeye eklendi. Daha sonra çözelti distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan demir stoğu renkli şişe içerisinde +4°C'de buzdolabında saklandı. 1 litrelik besiyeri hazırlanırken bu demir stoğundan 10 ml kullanıldı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 MS tohum ortamında kullanılacak demir stoğu.

Demir sülfat ($\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27,8
Sodyum EDTA (Na_2EDTA)	3,72

3.2.1.1.4 Vitamin Stok Çözeltisi (100x), (mg/L)

1000 ml'lik balon joje içerisine bir miktar distile su koyuldu ve balon joje manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirildi. Maddeler çizelge 3.4'de belirtilen miktarlarda tek tek tartılarak balon jøjeye eklendi ve karışım distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 1 litrelik besin ortamı hazırlanırken bu vitamin stoğundan 10 ml alındı.

Çizelge 3.4 MS tohum ortamında kullanılacak vitamin stoğu.

Tiyamin HCl	10
Nikotirik asit	50
Piridoksin HCl	50

Organogenezde Kullanılan Modifiye Edilmiş MSOrtamının Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Major Tuz Stok Çözeltisi (20x), (g/L)

1 litre balon joje içine bir miktar distile su koyulduktan sonra çizelge 3.5'de belirtilen maddeler tek tek hassas terazi ile tartılarak balon jøjeye eklendi. Ortama tüm maddeler ilave

edilip çözüldürüldükten sonra çözelti 1000 ml'ye tamamlandı. 1 litrelik besin ortamı için önceden hazırlanan bu majör tuz stoğundan 50 ml alındı.

Çizelge 3.5 Modifiye edilmiş MS ortamında kullanılan majör tuzlar.

Amonyum nitrat (NH_4NO_3)	0.01
Potasyum nitrat (KNO_3)	0.045
Magnezyum sülfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,009
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	0.007
Kalsiyum nitrat $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,03

Majör tuz stokları içerisinde bulunan kimyasal maddeler çökelti oluşturma eğiliminde olduklarından ortam hazırlanırken çökelti oluşturup oluşturmadığı kontrol edilmeli ve az miktarlarda sık sık hazırlanmalıdır.

Minör Tuz Stok Çözeltisi (100x), (mg/L)

1 litrelik besin ortamı hazırlanırken MS tohum ortamı için hazırlanan minör tuz stoğundan 10 ml alınarak ortama eklendi.

Demir Stok Çözeltisi (100x), (g/L)

1 litrelik besin ortamı hazırlanırken MS tohum ortamı için hazırlanan demir stok çözeltisinden 10 ml alınarak ortama eklendi.

Vitamin Stok Çözeltisi (100x), (mg/L)

1000 ml'lik balon joje içerisine bir miktar distile su koyuldu ve balon joje manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirildi. Maddeler çizelge 3.6'da belirtilen miktarlarda tek tek tartılarak balon jojeye eklendi ve karışım distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 1 litrelik besin ortamı hazırlanırken bu vitamin stoğundan 10 ml alındı.

Çizelge 3.6 Modifiye edilmiş MS ortamında kullanılan vitamin stoğu.

Tiyamin HCl	40
Nikotirik asit	50
Piridoksin HCl	50

Literatürde belirtilen fakat fazla miktarda olduğu için stoğa katılmayan myo-İnositol (100 mg/L) her besiyeri hazırlanışında ayrı olarak tartıldı ve ortama eklendi (Walkey's vitamins) (Walkey 1972).

Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Tohumların *in vitro* çimlendirilmesinde ortama bitki büyüme düzenleyicisi katılmadı. Direkt ve indirekt organogenez oluşumunda kullanılan besiyerine NAA ve Kinetin farklı konsantrasyonlarda ilave edildi. Köklendirme ortamında kinetinin farklı konsantrasyonları kullanıldı.

Naftalen Asetik Asit (NAA) Stok Çözeltisi (1mg/ ml)

250 mg Naftalen asetik asit tartılıp 500 ml'lik ölçülü bir beher içerisine koyuldu. Beherde 5 ml distile su ile ezilerek, çözülünceye kadar damla damla 1M NaOH ilave edildi. Maddenin tamamı çözüldükten sonra çözelti distile su ile 250 ml'ye tamamlandı. Renkli cam şişeye koyularak +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi. 1 litrelik besiyeri ortamına 1 mg/l NAA ilave etmek için stok çözeltisinden 1 ml alındı.

Kinetin Stok Çözeltisi (1mg/ml)

250 mg Kinetin tartılıp 500 ml'lik ölçülü bir beher içerisine koyuldu. Beherde 5 ml distile su ile ezilerek, çözülünceye kadar damla damla 1M HCl ilave edildi. Maddenin tamamı çözüldükten sonra çözelti distile su ile 250 ml'ye tamamlandı. Renkli cam şişeye koyularak +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi. 1 litrelik besiyeri ortamına 1 mg/l kinetin ilave etmek için stok çözeltisinden 1 ml alındı.

Çizelge 3.7 Organogenez için hazırlanan modifiye edilmiş MS ortamı içeriği.

Ortam Adı	Ortam içeriği	Ortam Adı	Ortam içeriği
S1 Ortamı	Balon jöjeye 500 ml saf su	S2 Ortamı	Balon jöjeye 500 ml saf su
	20 gr sakkaroz		20 gr sakkaroz
	50 ml Major Stok		50 ml Major Stok
	10 ml Minor Stok		10 ml Minor Stok
	10 ml Demir Stok		10 ml Demir Stok
	10 ml Vitamin Stok		10 ml Vitamin Stok
	100 mg myo-İnositol		100 mg myo-İnositol
	0,5 gr Kazein Hidrolizat		0,5 gr Kazein Hidrolizat
	(2 mg/L Kinetin + 0,05 mg/L NAA) 2 ml Kinetin Stok + 0,05 ml NAA Stok		(1,5 mg/L Kinetin + 0,1 mg/L NAA) 1,5 ml Kinetin Stok + 0,1 ml NAA Stok
	Hacim litreye tamamlanır		Hacim litreye tamamlanır
	pH: 5,8		pH: 5,8
	7 gr Agar		7 gr Agar
S3 Ortamı	Balon jöjeye 500 ml saf su	S4 Ortamı	Balon jöjeye 500 ml saf su
	20 gr sakkaroz		20 gr sakkaroz
	50 ml Major Stok		50 ml Major Stok
	10 ml Minor Stok		10 ml Minor Stok
	10 ml Demir Stok		10 ml Demir Stok
	10 ml Vitamin Stok		10 ml Vitamin Stok
	100 mg myo-İnositol		100 mg myo-İnositol
	0,5 gr Kazein Hidrolizat		0,5 gr Kazein Hidrolizat
	(1 mg/L Kinetin + 0,5 mg/L NAA) 1 ml Kinetin Stok + 0,5 ml NAA Stok		(0,5 mg/L Kinetin + 1 mg/L NAA) 0,5 ml Kinetin Stok + 1 ml NAA Stok
	Hacim litreye tamamlanır		Hacim litreye tamamlanır
	pH: 5,8		pH: 5,8
	7gr Agar		7 gr Agar

3.2.2 pH Ayarı

Besin ortamının agar hariç bütün maddeleri geniş ağızlı bir erlenmayere koyuldu ve manyetik karıştırıcı üzerinde karışır vaziyetteyken optimum pH ayarına gelinceye dek damla damla 1M HCl ve 1M NaOH eklendi. Bu çalışmada kullanılan bütün besiyerlerinin pH'ı literatürde en iyi verimin alındığı belirtilen 5.8'e ayarlandı (Murashige and Skoog 1962).

3.2.3 Sterilizasyon

Denemeler esnasında besiyerlerine istenmeyen organizmaların yerleşmesini önlemek için literatür taramalarında tespit edilen bir takım sterilizasyon basamakları uygulandı. Bunlar denemelerin yapılacağı laboratuvarın sterilizasyonu, denemelerde kullanılacak malzemelerin sterilizasyonu ve bitki materyalinin sterilizasyonudur.

3.2.3.1 Laboratuvarın Sterilizasyonu

In vitro ekimin yapılacağı odadaki ekipmanlar (laminar kabin, masa, tabure, benç vs.) %10'luk Sodyum hipoklorit (NaOCl) ile temizlendi. Daha sonra laminar kabinin tüm yüzeyleri %70'lik etanol ile silinerek dezenfekte edildi. İleri sterilizasyon için laminar kabinin'in UV ışığı 24 saat süreyle açık bırakıldı.

Ekim odasına girmeden önce uzun kollu önlük giyildi ve sırasıyla galoş, maske ve bone takıldı. Eller iyice yıkanıp kurulandıktan sonra %70'lik alkol ile silindi ve daha sonra cerrahi eldiven giyildi. Laminar kabin içerisinde *in vitro* ekim yapılırken ellerin sterilizasyonu için aralıklarla %70'lik alkol püskürtüldü.

3.2.3.2 *In Vitro* Ekimde Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu

Çalışmalar sırasında kullanılacak olan kurutma kağıtları kullanıma uygun şekilde kesilip katlanarak cam kavanozlara koyuldu. Yüzey sterilizasyonu ve durulamada kullanılacak olan distile su ihtiyaç duyulan miktarlarda erlenmayerlere koyuldu ve erlenmayerin ağız kısmı alüminyum folyo ile kapatıldı. Tohum yüzey sterilizasyonunda kullanılan NaOCl'nin seyreltilmesi için kullanılan dereceli mezurun ağız kısmı folyo ile sarıldı. Ekimde kullanılan metal malzemeler (pens, bistüri vb.) alüminyum folyo ile sarıldı. Eksplant ekimi için kullanılan fayanslar %10'luk NaOCl ile iyice silinip temizlendikten sonra %70'lik etanolle yüzey sterilizasyonu yapıldı ve her tarafı alüminyum folyo ile kaplandı. Besin ortamlarının döküleceği kavanozlar iyice yıkandı ve tüm bu malzemeler ile birlikte otoklav sepetlerine doldurularak otoklava yerleştirildi. Tüm malzemeler 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda steril edildi.

3.2.3.3 Tohum İçin Yüzey Sterilizasyonu

Daha önceden steril edilmiş bir bistüri yardımıyla papusları kesilen akenlerin (Şekil 3.2), sert kabuk yüzeyine dikkatlice çizik atıldı ve akenler kabuk kısmından ayrıldı. Daha sonra %10'luk NaOCl ile 10 dakika steril edildi. Ardından otoklavda steril edilmiş distile su ile 3 kez yıkandı. Akenleri süzmek için yine daha önce otoklavda steril edilmiş olan kurutma kağıtları kullanıldı. Tüm bu işlemler, *in vitro* ekim odasındaki laminar kabin içerisinde yapıldı.



Şekil 3.2 *S. ahmet-duranii* akeni.

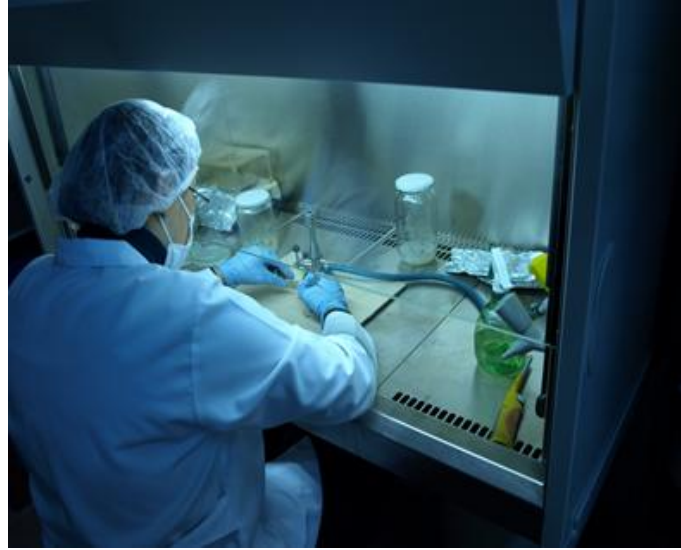
3.2.4 Ortamların Dökülmesi

121°C'de 15 dakika steril edilen besin ortamı odanın ısısıyla aynı seviyeye gelene kadar beklendi. Böylece ortam katılaştırırken besiyeri içerisinde buharlaşmadan dolayı meydana gelen serbest suyun oluşması engellendi. Daha önceden steril edilmiş cam malzemeler (kavanoz,

petri), sterilizasyonu yapılmış laminar kabinin içerisine yerleştirildi. Ortamlar bek alevinin hemen yanında yavaş bir şekilde 90 x 15 mm boyutlarındaki cam petrilere köpürtmeden döküldü. Cam malzemenin üzerine asetat kalem ile ortam adı ve varsa başka önemli bilgiler yazıldı. Dökülen besin ortamlarının katılaşması için ve bu esnada kontaminasyon olup olmadığının ekim yapmadan önce görülmesi için 24 saat süreyle bekletildi.

3.2.5 Tohum ve Eksplantların Ekimi

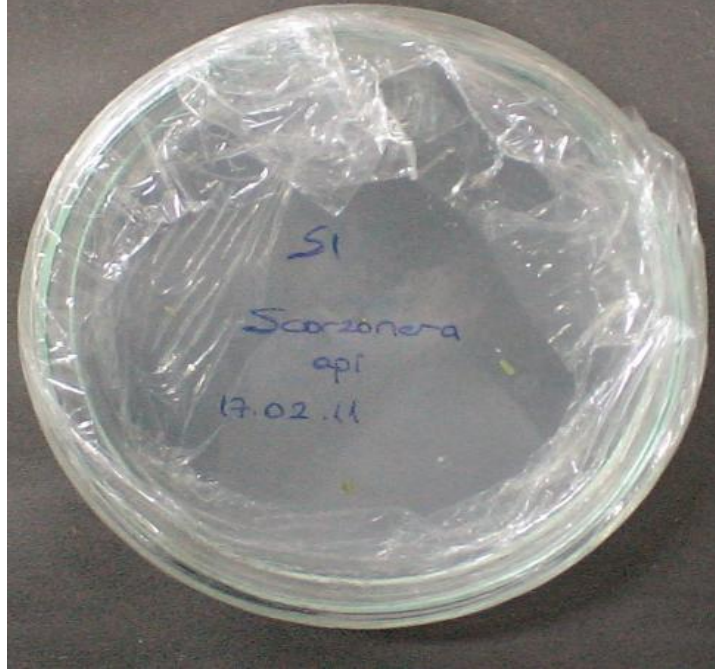
Yüzey sterilizasyonu yapılmış olan tohumlar steril pens yardımı ile 1 litrelik cam kavanoz içerisindeki MS ortamlarına ekildi. Ekim yapılırken her kavanoza 4 tohum ekildi. Ekim işlemi bittikten sonra kavanozların ağzı bek alevinden geçirildi ve sıkıca kapatıldı. Tüm işlemler laminar kabin içerisinde gerçekleştirildi (Şekil 3.3). Kavanozlar inkübasyon odasına taşındı. Ekilen tohumlar steril ortam şartlarında, karanlıkta çimlendirildi. Çimlendirildikten 2-3 gün sonra aydınlığa alındı.



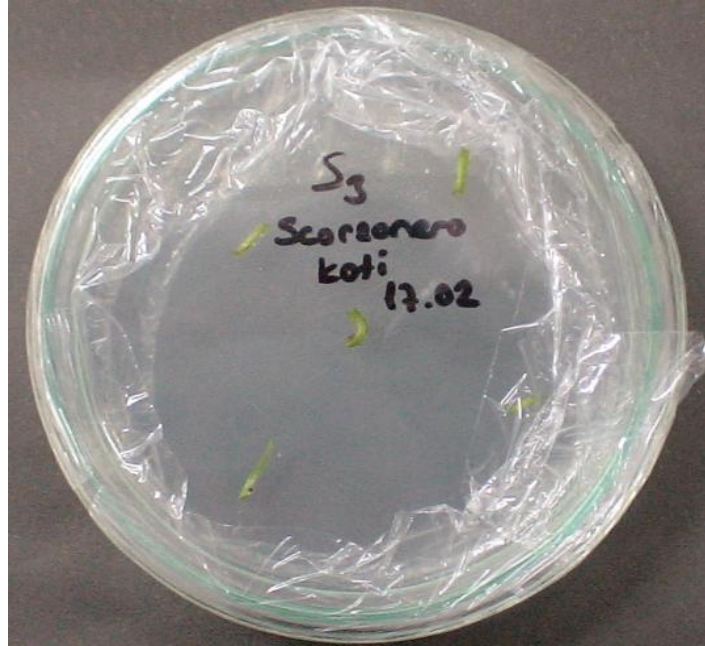
Şekil 3.3 Laminar kabinde *in vitro* eksplant ekimi.

Çimlenen tohumlar 25-28 günlük 10-12 cm boyunda aseptik fide haline geldikten sonra bu fidelerin apikal meristem (Şekil 3.4), kotiledon (Şekil 3.5), hipokotil (Şekil 3.6), ilk yaprak (Şekil 3.7) ve kök eksplantları (Şekil 3.8) kesildi. Fidelerden kesilen bu eksplantlar steril petrilereki modifiye edilmiş MS besiyerlerine pens yardımı ile ekildi.

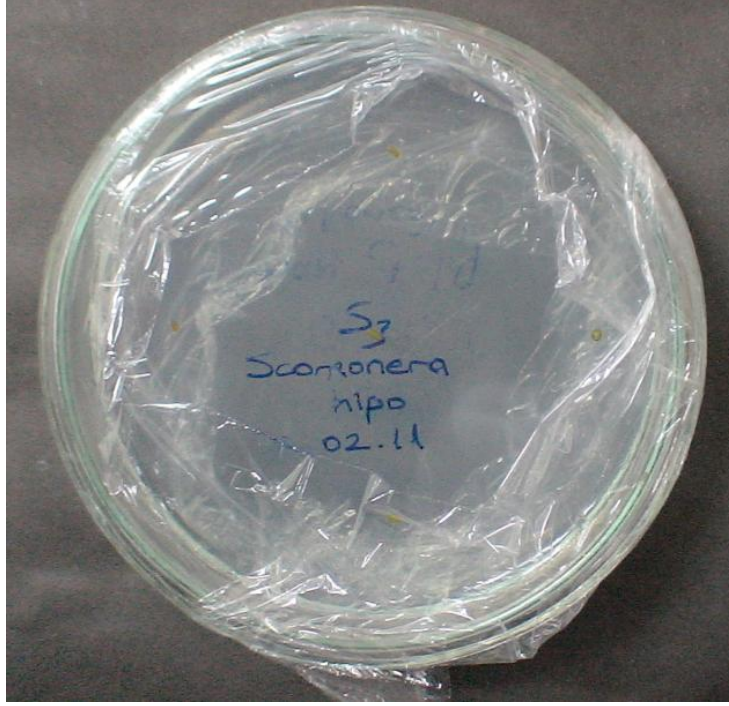
Her petriye aralarında eşit mesafe kalacak şekilde ortalama 5 eksplant ekildi. Eksplant ekimi yapılan her petrinin üst kapağı bek alevinden geçirilerek kapatıldı. Daha sonra kenarları streç filmle sarılarak inkübasyon odasına taşındı.



Şekil 3.4 *S. ahmet-durani* fidesinin apikal meristem eksplantları.



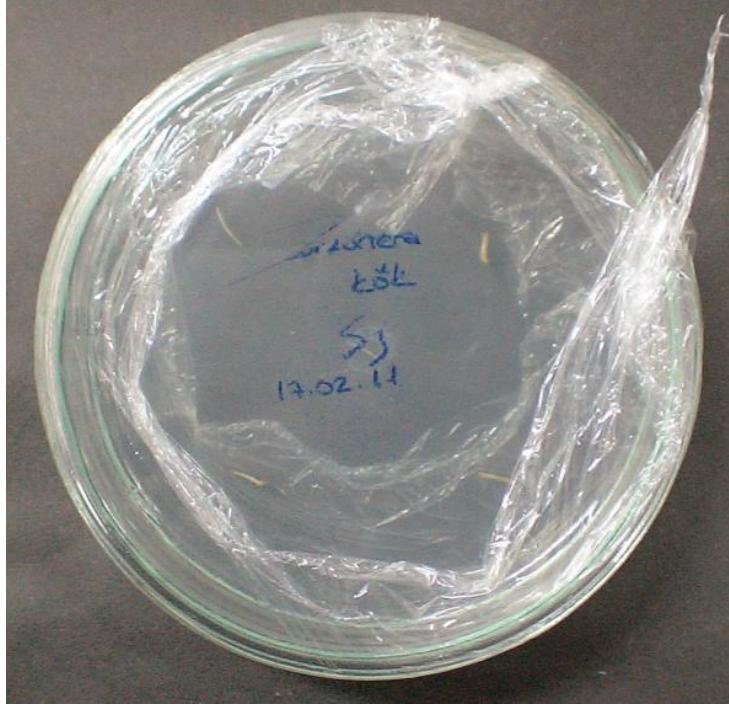
Şekil 3.5 *S. ahmet-durani* fidesinin kotiledon eksplantları.



Şekil 3.6 *S. ahmet-duranii* fidesinin hipokotil eksplantları.



Şekil 3.7 *S. ahmet-duranii* fidesinin ilk yaprak eksplantları.



Şekil 3.8 *S. ahmet-durani* fidesinin kök eksplantları.

3.2.6 İnkübasyon

İnkübasyon için fotoperiyot 16/8 saat, ışık şiddeti 2500-3000 lux ve ortam sıcaklığı 25 ± 1 °C olarak ayarlandı. 28-30. günde oluşan kalluslar ve yeni aseptik bitki fideleri alt kültüre alındı.

3.2.7 Köklendirme

1000 ml köklendirme ortamı hazırlamak için balon jöjeye 500 ml saf su koyulur. İçerisinde 20 gr sakkaroz manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak eritilir. Modifiye edilmiş MS besin ortamında kullanılan majör stok çözeltisinden 50 ml, minör stok çözeltisinden 10 ml, demir stok çözeltisinden 10ml ve vitamin stok çözeltisinden 10ml alınarak ortama eklenir. Miktarları fazla olduğundan stok içine katılmamış olan myo-inositol (100 mg) ve kazein hidrolizat (500 mg) katı halde çözeltiliye eklenir ve tamamen erinceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırılır. RS1, RS2 ve RS3 olmak üzere üç farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme maddesi NAA içeren köklendirme ortamı hacim litreye tamamlanır. pH:5,8'e ayarlandıktan sonra katılaştırıcı olarak her bir ortama 7 gr agar eklenir (Çizelge 3.8). Ortamlar

121°C’de 15 dakika süreyle otoklavlanır. Soğuması beklendikten sonra 1lt’lik kavanozlara dökülerek katılaşması beklenir. Daha sonra organogenez yolu ile elde edilen aseptik fideler köklendirme ortamına dik bir şekilde yerleştirildi ve kök büyümesi takip edildi.

Çizelge 3.8 Organogenez ile elde edilen aseptik fidelerin köklendirme ortamları.

RS1	RS2	RS3
Balon jojeye 500 ml saf su	Balon jojeye 500 ml saf su	Balon jojeye 500 ml saf su
20 gr sakkaroz	20 gr sakkaroz	20 gr sakkaroz
50 ml Majör Stok	50 ml Majör Stok	50 ml Majör Stok
10 ml Minör Stok	10 ml Minör Stok	10 ml Minör Stok
10 ml Demir Stok	10 ml Demir Stok	10 ml Demir Stok
10 ml Vitamin Stok	10 ml Vitamin Stok	10 ml Vitamin Stok
100 mg myo-inositol	100 mg myo-inositol	100 mg myo-inositol
0.5 gr Kazein Hidrolizat	0.5 gr Kazein Hidrolizat	0.5 gr Kazein Hidrolizat
0,5 mg/L NAA	0,75 mg/L NAA	1 mg/L NAA
Hacim litreye tamamlanır	Hacim litreye tamamlanır	Hacim litreye tamamlanır
pH: 5.8	pH: 5.8	pH: 5.8
7gr Agar	7 gr Agar	7 gr Agar

3.2.8 Dış Ortama Alıştırma

Köklenmiş sürgünlerin bulunduğu kavanozların kapakları açılarak sürgünler ortamdan zarar görmeyecek şekilde dikkatlice dışarıya çıkarıldı. Kök kısımları ortamdan temizlenerek daha önceden 121°C’de 15 dakika süreyle otoklavlanmış olan steril toprağın bulunduğu saksılara dikildi. İlk sulama steril su ile yapıldı. Saksıdaki fidelerin üstleri temiz bir kavanoz ya da beherle tamamen kapatıldı. Daha sonra bu kavanozlar bir hafta süre ile kademeli olarak açıldı. Bu esnada bitki yetiştirme odasının nem oranı yüzde %90’dan %80’e kademeli olarak düşürüldü. Bundan sonra fidelerin üzerinde bulunan cam kavanozlar tamamen kaldırıldı. Toprağa alınan fidelerin dış ortama tam olarak alışabilmesini sağlayabilmek için 15 gün içerisinde bu nem oranı %55’e kadar düşürüldü. Böylece saksıdaki fideler fotoperiyot 16/8 saat, ışık şiddeti 2500-3000 lux ve ortam sıcaklığı 25±1 °C’de kontrollü nem koşullarında tutuldu.

3.2.9 İSTATİSTİK

Kallus ve sürgün oluşumu yüzdeleri hesaplandı. Arcsin dönüşüm tablosu kullanılarak veriler düzenli hale getirildikten sonra SPSS 13.0 (Windows sürümü) programında tek yönlü ANOVA analizi yapıldı. Gruplar arası farklılık Duncan testi ile test edildi.

BÖLÜM 4

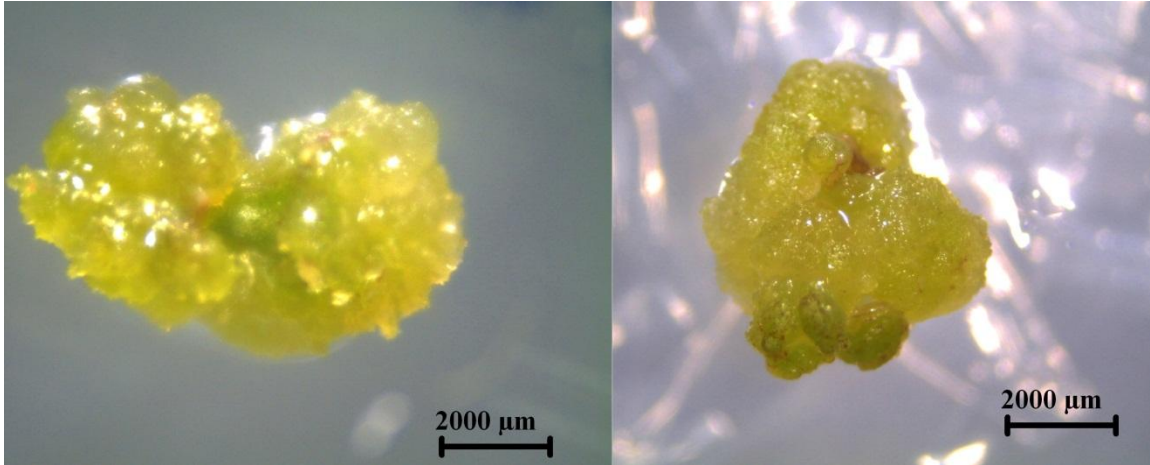
ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 SCORZONERA AHMET-DURANİİ AKENLERİNİN ÇİMLENDİRİLMESİ

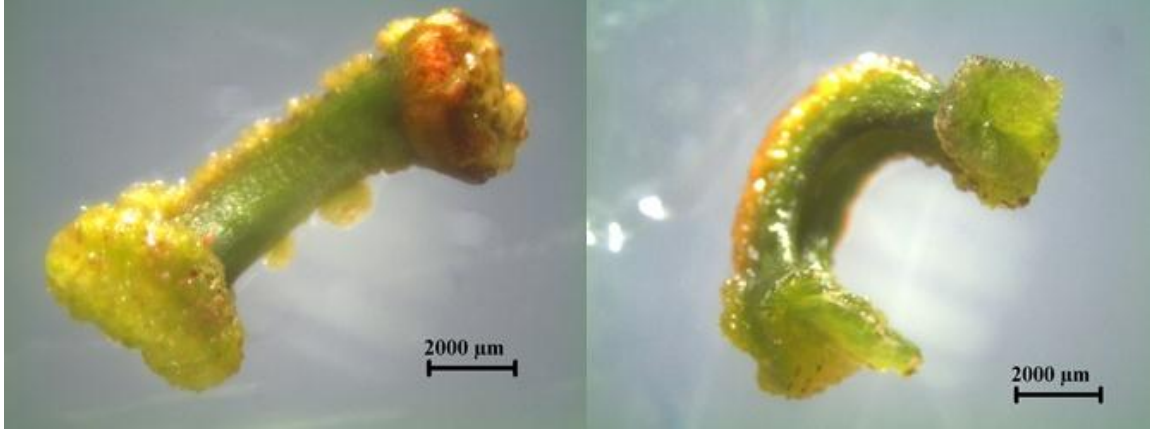
Türün aken tipi olgunlaşmış meyveleri sterilize edildikten sonra hormon içermeyen MS besin ortamına her kavanoza 5 tane olacak şekilde ekildi. İlk çimlenme 4. günde görüldü. Daha sonra *in vitro* ortamda yetiştirilen 25-30 günlük aseptik fidelerin apikal meristem, kotiledon, hipokotil, ilk yaprak ve kök eksplantları, organogenez için çeşitli konsantrasyonlarda Kinetin ve Naftalen asetik asit (NAA) içeren modifiye edilmiş MS ortamına alındı.

4.2 KALLUS OLUŞUMU

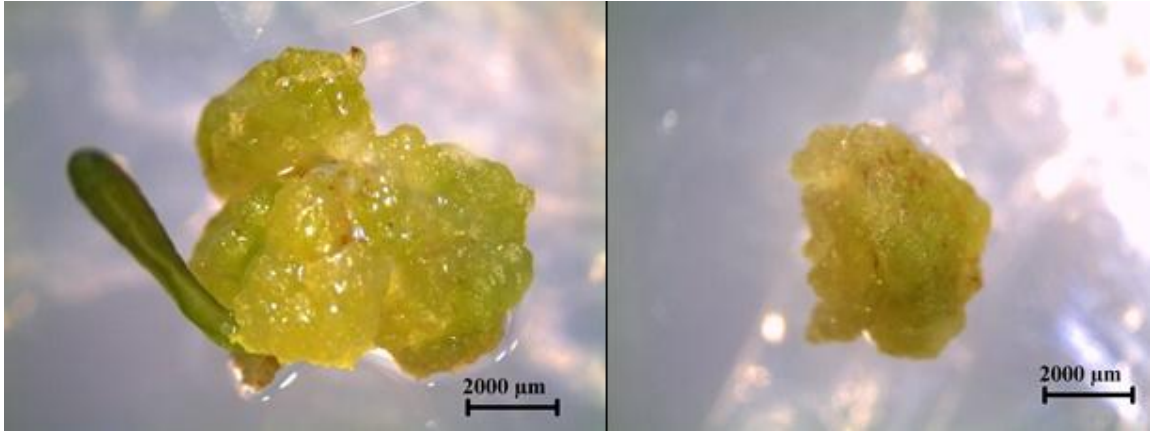
İlk kallus oluşumu 5. günde apikal meristem eksplantlarında başlamıştır. Kalluslar sarı ve yeşil renkli, kitlesel yapıdadır.



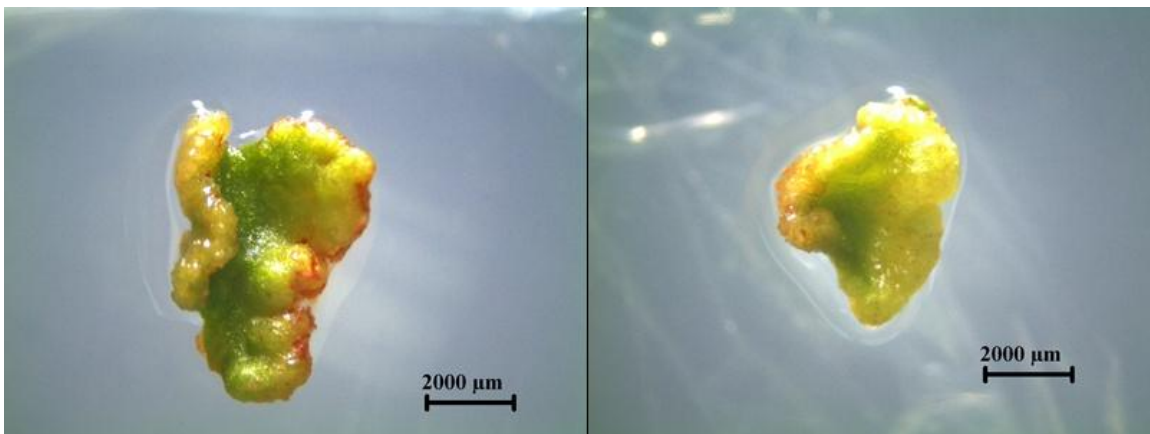
Şekil 4.1 *S. ahmet-duranii* fidesinin apikal meristem eksplantlarından oluşan kalluslar.



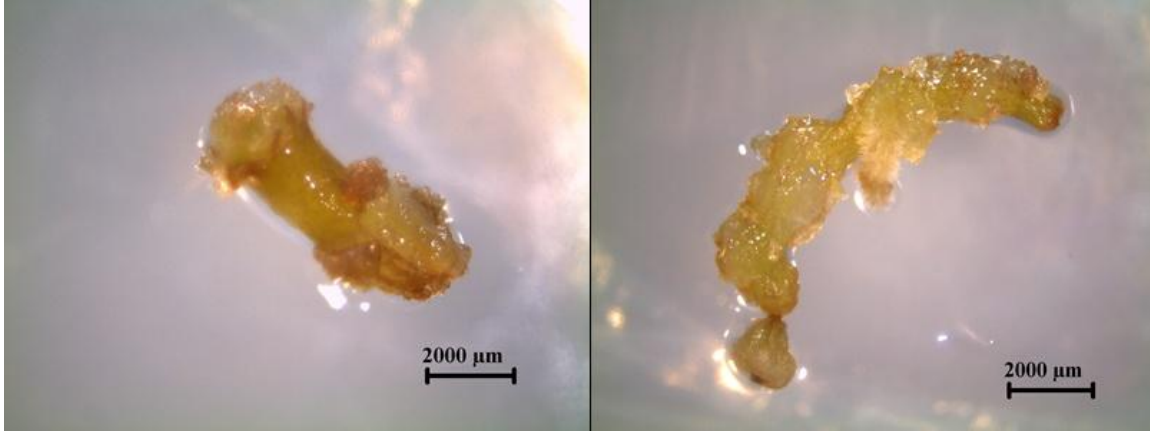
Şekil 4.2 *S. ahmet-duranii* fidesinin kotiledon eksplantlarından oluşan kalluslar.



Şekil 4.3 *S. ahmet-duranii* fidesinin hipokotil eksplantlarından oluşan kalluslar.



Şekil 4.4 *S. ahmet-duranii* fidesinin ilk yaprak eksplantlarından oluşan kalluslar.



Şekil 4.5 *S. ahmet-durani* fidesinin kök eksplantlarından oluşan kalluslar.

Yapılan denemelerde kallus oluşturma yüzdesi bakımından en başarılı eksplant kaynağı hipokotildir (Şekil 4.3). Hipokotil eksplantlarının farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme maddeleri içeren dört farklı ortamda da (S1, S2, S3, S4) kallus oluşturma oranı %90 olarak belirlenmiştir. En düşük kallus oluşturma yüzdesi (%50,77) kök eksplantlarının (Şekil 4.5) S3 ortamına ekilmesi ile elde edilmiştir. Modifiye edilmiş MS ortamında apikal meristemlerde (Şekil 4.1) en yüksek kallus oluşumu S2 ve S3 ortamlarında (%90), en düşük kallus oluşumu ise S1 ortamında (%71,14) görülmüştür. Kotiledon eksplantlarında (Şekil 4.2), en yüksek kallus oluşumu, S3 ve S4 ortamlarında (%81,14), en düşük kallus oluşumu ise S1 ortamında (%69,38) elde edilmiştir. İlk yaprak eksplantlarında (Şekil 4.4), en yüksek kallus oluşumu S1, S2 ve S3 ortamlarında (%90), en düşük kallus oluşumu ise S4 (%81,14) ortamında bulunmuştur. Kök eksplantlarında, en yüksek kallus oluşumu S2 ve S4 ortamlarında (%90) en düşük kallus oluşumu ise S3 (%50,77) ortamında belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Bu denemeler sırasında kallus oluşturmada başarısız olan eksplantlarda kararına meydana geldiği gözlenmiştir. Bunun sebebi ise eksplant alınırken dokunun zedelenmesi ve eksplantın canlılığını kaybetmesidir. Bu nedenle kararlı eksplantlarda kallus oluşturma potansiyeli kaybolmuştur.

Çizelge4.1 Modifiye edilmiş MS ortamındaki *S. ahmet-duranii* eksplantlarının kallus oluşumu yüzdeleri (%).

Ortam	Apikal Meristem	Kotiledon	Hipokotil	İlk Yaprak	Kök
S1	71,14 ± 9,47a	69,38 ± 10,61a	90 ± 0,0	90 ± 0,0a	76,92 ± 13,07b
S2	90 ± 0,0a	76,92 ± 13,07a	90 ± 0,0	90 ± 0,0a	90 ± 0,0b
S3	90 ± 0,0a	81,14 ± 8,85a	90 ± 0,0	90 ± 0,0a	50,77 ± 0,0a
S4	81,14 ± 8,85a	81,14 ± 8,85a	90 ± 0,0	81,14 ± 8,85a	90 ± 0,0b

Ortalama ± Standart Hata. Farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme maddesi içeren ortamlarda Duncan çoklu karşılaştırma testi. Aynı harfle gösterilen ortalama önemli ölçüde farklı değildir.

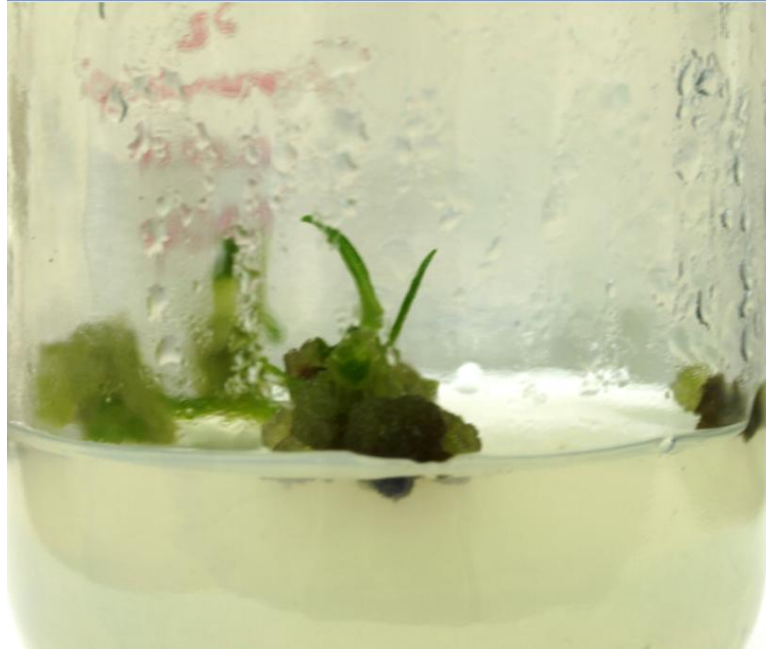
4.3 SÜRGÜN OLUŞUMU

Apikal meristem, kotiledon ve hipokotil eksplantlarının modifiye edilmiş MS besin ortamına ekilmesi sonucunda indirekt organogenez yoluyla sürgün oluşumu gözlenmiştir. İlk yaprak ve kök eksplantlarında ise sürgün elde edilememiştir. Yalnızca kotiledon eksplantında direkt organogenez yoluyla sürgün oluşumu elde edilmiştir (Şekil 4.9).

Modifiye edilmiş MS ortamında apikal meristemlerde (Şekil 4.6), en yüksek sürgün oluşumu S2 ve S3 ortamlarında (%90) en düşük sürgün oluşumu ise S4 ortamında (34,63) görülmüştür. Kotiledon eksplantlarında (Şekil 4.7), en yüksek sürgün oluşumu, S1 ve S2 ortamlarında (%30,78), en düşük sürgün oluşumu ise S4 ortamında (%17,70) bulunmuştur. Hipokotil eksplantlarında (Şekil 4.8), en yüksek sürgün oluşumu S2 ortamında (%43,07), en düşük sürgün oluşumu ise S4 ortamında (%17,70) belirlenmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.6 *S. ahmet-durani* apikal meristem eksplantlarından indirekt sürgün oluşumu.



Şekil 4.7 *S. ahmet-durani* kotiledon eksplantlarından indirekt sürgün oluşumu.



Şekil 4.8 *S. ahmet-duranii* hipokotil eksplantlarından indirekt sürgün oluşumu.



Şekil 4.9 *S. ahmet-duranii* kotiledon eksplantından direkt sürgün oluşumu.

Çizelge 4.2 Modifiye edilmiş MS ortamındaki *S. ahmet-duranii* eksplantlarından sürgün oluşumu (%).

Ortam	Apikal Meristem	Kotiledon	Hipokotil
S1	46,92 ± 3,84b	30,78 ± 4,22a	26,56 ± 0,0a
S2	81,14 ± 8,85a	30,78 ± 4,22a	43,07 ± 10,81a
S3	35 ± 4,22b	26,56 ± 0,0a	21,93 ± 11,55a
S4	34,63 ± 8,07b	17,70 ± 8,85a	17,70 ± 8,85a

Ortalama ± Standart Hata. Farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme maddesi içeren ortamlarda Duncan çoklu karşılaştırma testi. Aynı harfle gösterilen ortalama önemli ölçüde farklı değildir.

Elde edilen aseptik sürgünler boyları en az 10 cm olana kadar modifiye edilmiş MS besin ortamını içeren alt kültür ortamlarında yetiştirildi. Daha sonra yaprak sayısı artan ve yetişkin hale gelen genç fideler köklendirme ortamına alındı.

4.4 ALT KÜLTÜR

Gövde organogenezi sırasında hızlı besin tüketimi olmaktadır. 3. haftadan sonra kalluslarda kararmalar oluşmakta, organogenezin devamlılığı riske girmektedir. Bunun sebebi mevcut kültürün içeriğindeki minerallerin kallus tarafından tüketilmesidir. Bu nedenle 3. haftadan sonra organogenez yapmakta olan kalluslar aynı konsantrasyonlardaki ortamlara alt kültüre alındı. Kararmaya başlayan kalluslar alt kültüre geçirildiğinde canlı olan bölümlerden yeni kallus oluşumu gözlemlendi. Alt kültürde mevcut oluşmuş kalluslar çoğaldı ve aynı anda sürgünler de büyümeye devam etti.

4.5 KÖK OLUŞUMU

Modifiye edilmiş MS besin ortamında gövde organogenezi tamamlanan sürgünler köklendirme çalışmaları için farklı konsantrasyonlarda NAA içeren köklendirme ortamlarına (RS1, RS2 ve RS3) alındı. Köklendirme denemelerinde apikal meristemden elde edilen sürgünlerin RS2 ortamına alınması ile %100 oranında köklenme gerçekleşti (Şekil 4.10). İlk köklenme bir hafta sonra gözlemlendi. Oluşan kökler jeotropizmaya uygun olarak agarlı ortama doğru büyümelerini sürdürdü.



Şekil 4.10 *S. ahmet-duranii* apikal meristem eksplantından elde edilen sürgünün köklendirilmesi.

4.6 DIŞ ORTAMA ALIŞTIRMA

Modifiye edilmiş MS ortamında köklenen sürgünler tam bir klon fide haline geldi. Bitki yetiştirme odasında klon bitkinin kökleri ortamdaki temizlendikten sonra fideler daha önceden otoklavda steril edilmiş toprağın bulunduğu saksılara dikildi (Şekil 4.11). 15 adetten daha fazla yaprağa sahip olan klon fidemiz canlı ve sağlıklı bir şekilde iki ay kadar süre ile yaşadı.

Bu süre zarfında orta kısımdan yeni yapraklar veren fidenin alt kısımdaki yapraklarının dökülmeye başladığı gözlemlendi. İki ay kadar bu şekilde sağlıklı olarak yaşan fidelerimizin yaprakları üzerinde kahverengi lekelerin oluştuğu görüldü ve daha sonra bitki yavaş yavaş canlılığını kaybetti.



Şekil 4.11 Steril toprakta ve %55 nem oranında yaşayan 1 aylık genç klon fide.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

Scorzonera cinsine ait bitkiler tıbbi değeri olan ve halk arasında tedavi amaçlı olarak kullanılan bitkilerdir. *S.hispanica*'nın halk tıbbında idrar söktürücü, ateş düşürücü ve ağrı kesici olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Zidorn et al. (2000), *S.hispanica*'nın köklerinden metanol ekstraksiyonu yaparak seskiterpenoid ve türevlerini elde etmişlerdir.

S. humilis, halk tıbbında yara tedavi edici ve bağırsak düzenleyici olarak kullanılmaktadır. Zidorn et al. (2002), *S. humilis* köklerinden metanol ekstraksiyonu yaparak trilobibenzil E ve F elde etmişlerdir.

S. austriaca köklerinin Tibet halk tıbbında meme iltihabı ve çiban tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir. Li et al. (2004), *S. austriaca* köklerinden aseton ekstraksiyonu yaparak yeni guanolidler elde etmişlerdir.

S.divaricata ülser ve neoplazi gibi mide hastalıklarında tedavi edici özelliğe sahiptir. Tsevegsuren et al. (2007), *S.divaricata* ve *S.pseudodivaricata*'nın toprak üstü kısımlarından etil asetat ekstraksiyonu yaparak scorzonerik asit ve scorzonerin adında iki yeni doğal metabolit elde etmişlerdir.

S. mongolica halk arasında çiban iltihabı ve kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Wang et al. (2009), *S. mongolica*'nın köklerinden metanol ekstraksiyonu yaparak 12 kimyasal bileşik (β -sitosterol, 22-dien-3 β -ol, gliserol -1-octadekanoat, 1-linelogliserol, stearik asit, palmitik asit, sükroz, luteolin-5, 3-dimetil eter, fitalik asit ve türevleri) izole etmişlerdir.

S.latifolia'nın köklerinden elde edilen sakız kurutulularak Türk halk tıbbında ağrı kesici olarak kullanılmıştır. Bunun yanı sıra bu bitkinin kısırılığa ve bazı parazitik canlıların yol

açtığı rahatsızlıklara karşı da kullanıldığı bilinmektedir. Bahadır vd. (2010), *S.latifolia*'nın köklerinden metanol ekstraksiyonu yaparak triterpen ve türevlerini elde etmişlerdir.

Bitki parçalarından ekstraksiyon yoluyla elde edilen bu kimyasallar, bitkilerin *in vitro* ortama alınması ve ileri aşamalarda süspansiyon kültürleri kurulması yoluyla daha fazla miktarda elde edilebilir. Bu anlamda çalışmamızda kullandığımız *S. ahmet-durani*'nin *in vitro* ortamda yetiştirilme metodlarının belirlenmesi önemlidir.

Literatür çalışmaları sonucunda *Scorzonera* taksonlarında bitki doku kültürü çalışmasının yapılmadığı tespit edilmiştir. Fakat *Scorzonera* cinsine taksonomik olarak yakın olan cinslerde (*Cichorium* ve *Tragopogon*) doku kültürü çalışmaları mevcuttur.

Profumo et al. (1985), *Cichorium inthybus* L. fidelerinin kök eksplantlarından modifiye edilmiş Heller besin ortamında oksin ve sitokininlerinin farklı konsantrasyonları kullanarak (yalnızca 2,4-D (0,05mg/l, 0,1mg/l, 1mg/l, 3mg/l), yalnızca NAA (0,05mg/l, 0,1mg/l, 1mg/l, 3mg/l), yalnızca Kinetin (0,05mg/l, 0,1mg/l, 1mg/l, 3mg/l), 2,4-D ve Kinetin'in farklı konsantrasyonları, NAA ve Kinetin'in farklı konsantrasyonları) kallus oluşturmuşlardır. En yüksek kallus oluşumunun 2,4-D bulunan ortamda gerçekleştiğini, kinetinin tek başına sürgün oluşumunda etkili olduğunu ve NAA'in ise sürgün farklılaşmasında ve kök oluşumunda etkili olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda ise bu çalışmadan farklı olarak MS besin ortamında farklı konsantrasyonlarda Kinetin ve NAA kullanarak kallus oluşturuldu. Eksplant kaynağı olarak apikal meristem, kotiledon, hipotil, ilk yaprak ve kök kullanıldı. Her iki çalışmada benzer olarak ilk kallus oluşumu 4-5. günde meydana gelmiş ve oluşan kalluslar sarı ve kitlesel yapılıdır. Profumo et al. (1985)'in tüm ortamlardaki kallus oluşturma yüzdesi çalışmamızda elde edilen sonuçlardan daha düşüktür. Köklendirmede bu çalışma ile benzer olarak yalnızca NAA'in farklı konsantrasyonlarını (0,5mg/l, 0,75mg/l, 1mg/l) kullandık. Çalışmamızda köklendirmede %100 başarı elde edilirken, Profuma et al. (1985)'in farklı konsantrasyonlarda NAA (0,05mg/l, 0,1mg/l, 1mg/l, 3mg/l) kullandığı ortamlardaki kök oluşumu yüzdesi daha düşüktür.

Rehman et al. (2003), *C.inthybus* fidesinin yaprak eksplantlarından modifiye edilmiş MS yarı katı besin ortamında (IAA 2µM– Kinetin 5µM) kallus oluşturmuşlardır.

Kallusların her birinden ise 5 ya da daha fazla sayıda sürgün oluşturmayı başarmışlardır. Sürgün oluşumu için (IBA-indol3bütirikasit 0,2 µM) içeren MS besin ortamını kullanılmışlardır. *In vitro* ortamda yetiştirdikleri genç aseptik fideleri başarıyla toprağa aktarmışlardır. Çalışmamızda benzer olarak MS besin ortamını kullandık. Kallus oluşumu için bu çalışmadan farklı olarak Kinetin ile birlikte NAA'nın farklı konsantrasyonlarını (2 mg/L Kinetin + 0,05 mg/L NAA, 1,5 mg/L Kinetin + 0,1 mg/L NAA, 1,5 mg/L Kinetin + 0,1 mg/L NAA 0,5 mg/L Kinetin + 1 mg/L NAA) kullandık. Yine her iki çalışmada da farklı konsantrasyonlarda olsa kazein hidrolizat kullanıldı.

Malarz et al. (2005), *C. inthybus* fidesinin yaprak eksplantlarından MS besin ortamında (1mg/L 2,4-D, 0,3mg/L Kinetin, %3 sakkaroz) kallus oluşturmuş ve bu kallusları 6 haftada bir alt kültüre alarak çoğaltmış daha sonra ince tabaka kromatografisi yöntemi ile bu kalluslardan furofuran lignanları elde etmişlerdir.

Bennici et al. (2006), *C.inthybus* fidesinin *in vitro* kök eksplantlarında kolşisin denemesi yaparak kromozomlardaki morfojenik etkileri araştırmışlardır. Kallus oluşumu için farklı konsantrasyonlarda kinetin ve 2,4-D içeren (kontrol, yalnız 0.001% kolşisin, 0.001% kolşisin + 0.5µM kinetin, yalnız 0.5 µM kinetin, 0.001% kolşisin + 5 µM 2,4-D, 0.001% kolşisin+ 5 µM 2,4-D ve 0.5 µM kinetin) kültür ortamını kullanmışlardır. Bu ortamda elde ettikleri sürgünleri 5µM IBA içeren MS besin ortamında köklendirmişlerdir. Bu kültür ortamlarında kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonları çalışmamızla bir benzerlik göstermemektedir.

Klavina et al. (2006), aralarında *Tragopogon heterospermus* Scweigg.'in de bulunduğu Baltik denizinin Letonya kıyısında bulunan 29 tehlike altındaki bitkide *in vitro* doku kültürü tekniklerini içeren çalışma yapmışlardır. Çimlendirmede (6g/L agar içeren) yarı katı MS besin ortamını kullanmışlardır. *T. heterospermus* tohumları bu ortamda %100 başarı ile çimlenmiştir ve çimlenen tohumların her birinden %100 başarı ile sürgün elde edilmiştir. Bu çalışma ile birlikte ilk defa *Tragopogon* cinsine ait bir bitki *in vitro* ortamda yetiştirilmiştir. Çalışmamızda benzer olarak agar miktarı daha fazla olan katı MS besin ortamı kullanılarak *Scorzonera* akenleri çimlendirilmiştir.

Sonuç olarak *Scorzonera* cinsinde doku kültürü çalışmalarının yapılmamış olması ve bu bitkilerin zengin kimyasal içeriklere sahip olması çalışmamızda kullandığımız bitkinin bize ülkemiz açısından potansiyel değeri yüksek bir bitki olduğunu düşündürmektedir. Sonuç olarak bu çalışma ile *S.ahmet-durani*'nin *in vitro* olarak üretilmesi, hem türün devamlılığının korunmasını sağlamada, hem bitkide bulunabileceğini düşündüğümüz önemli sekonder metabolitlerin tespiti ve çok miktarda üretilmesini sağlamada bir adım atılması, bundan sonra bu cins üzerinde yapılacak çalışmalara yol gösterici olması açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

- Babaoğlu M, Gürel E ve Özcan S** (2001) *Bitki Biyoteknolojisi I: Doku Kültürü ve Uygulamaları*. SÜ Vakfı Yayınları, Konya.
- Bahadır O, Citoglu GS, Smejkal K, Dall'Acqua S, Ozbek H, Cvacka J and Zemlicka M** (2010) Analgesic compounds from *Scorzonera latifolia* (Fisch. and Mey.) DC. *J. Ethnopharmacol*, 131: 83-87.
- Baytop A** (1983) *Farmasötik Botanik* İstanbul Üniversitesi Basımevi s. 310-316.
- Baytop T** (1999) *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün)*. Nobel s. 236–237.
- Bennici A, Schiff S and Mori B** (2006) Morphogenic effect of colchicine in *Cichorium intybus* L. root explants cultured *in vitro*. *Caryologia*, 59(3): 284-290.
- Boisseir EP** (1875) *Flora Orientalis. Composees*, 3: 151-883.
- Candolle AP** (1805) *Flore Francaise*. Paris, 4: 61.
- Chamberlain DF** (1975) *Scorzonera* L. – In: Davis PH (ed.). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh University Press, 5: 632-657.
- Chater AO** (1976) *Scorzonera* L. – In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM and Webb DA(eds.) *Flora Europaea*. Cambridge University Press, 4: 317-322.
- Çitoğlu GS, Bahadır O and Dall'acqua S** (2010) Dihydroisocoumarin derivatives isolated from the roots of *Scorzonera latifolia*. *Turk. J. Pharm. Sci.*, 7: 205-2012.
- Cronquist A** (1968) *The evolution and Classification of Flowering Plants*. London, UK.
- Davis PH, Mill RR and Tan K** (1988) *Scorzonera* L. – In: Davis PH, Mill RR & Tan K (eds.). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh University Press.,10: 169-170.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Doğan B and Duran A** (2010) A new record for the flora of Turkey: *Scorzonera renzii* Rech. f. (Asteraceae). *Biological Diversity and Conservation*, 3: 133-136.
- Doğan B, Duran A and Makbul S** (2011) *Scorzonera tuzgoluensis* sp. nov. (Asteraceae), a new halophytic species from central Anatolia, Turkey. *Nordic Journal of Botany*, 29: 20-25.
- Duran A** (2002) A new species of *Scorzonera* L. (Asteraceae) from Anatolia, Turkey. *Pakistan Journal of Botany*, 34(3): 385–389.
- Duran A ve Hamzaoğlu E** (2004) A new species of *Scorzonera* L. (Asteraceae) from South Anatolia, Turkey. *Biologia*, 59: 47–50.
- Ezer N and Arısan ÖM** (2006) Folk Medicines in Merzifon (Amasya, Turkey). *Turk J. Bot.*, 30: 223-230.
- Ertürk Ö and Demirbağ Z** (2003) *Scorzonera mollis* Bieb (Compositae) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Ekoloji Çevre Dergisi*, 12(47): 27-31.
- Funk VA, Susanna A, Stuessy TF and Bayer RJ** (2009) Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. *International Association for Plant Taxonomy*, Vienna.
- Güner A** (2000) *Scorzonera* L. – In: Güner A, Özhatay N, Ekim T and Başer KHC (eds.). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. *Edinburgh University Press*, 11: 167.
- Hamzaoğlu E, Aksoy A, Martin E, Pınar NM and Çölgeçen H** (2010) A new record for the flora of Turkey: *Scorzonera ketzkhovellii* Grossh. (Asteraceae). *Turkish Journal of Botany*, 34: 57-61.
- Hartvig P and Strid A** (1987) New taxa and new records from the mountains of S.W. and S.C. Turkey. *Bot. Jahrb. Syst.*, 108: 301-341.
- IUCN** (2001) IUCN red list categories, ver. 3.1. IUCN Species Survival Commission.
- Jiang TF, Wang YH, Lv ZH and Yue ME** (2007) Determination of kava lactones and flavonoid glycoside in *Scorzonera austriaca* by capillary zone electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal.*, 43: 854–858.
- Kilian N and Parolly G** (2002) *Scorzonera ulrichii* Parolly & N. Kilian, sp. nova. In: Greuter W ve Raus T (eds), Med-Checklist Notulae, 21. *Willdenowia* 32: 198-200.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Khobrakova VB, Nikolaev SM, Tolstikhina VV and Semenov AA** (2003) Immunomodulating properties of lignan glucoside from cultivated cells of *Scorzonera hispanica* L. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 37: 345-346.
- Klavina D, Gailīte A and Ievinsh G** (2006) Initial responses of explants from rare and endangered coastal plant species during initiation of tissue culture. *Acta Universitatis Latviensis*, 710: 81–91.
- Lack HW** (2007) Tribe Cichorieae Lam. and DC.– In: Kubitzki (ed.): The Families and Genera of Vascular Plants, Vol. VIII, Flowering Plants. Eudicots, Asterales: Kadereit and Jeffrey (eds.): 180-199. Heidelberg, Berlin: *Springer-Verlag*.
- Li J, Wu QX, Shi YP and Zhu Y** (2004) A New Sesquiterpene Lactone from *Scorzonera austriaca*. *Chinese Chemical Letters*, 15(11): 1309-1310.
- Lipschitz SJ** (1939) Fragmenta monographiae generis *Scorzonera*. *Soc. Nat. Curiosiorum Mosquensis*, Moscow, 2: 1-165.
- Malarz J, Stojakowska A, Szneler E and Kisiel W** (2005) Furofuran lignans from a callus culture of *Cichorium intybus*. *Plant Cell Reports*, 24: 246-249.
- Makbul S, Coşkunçelebi K, Gültepe M, Okur S and Güzel ME** (2012) *Scorzonera ahmet-durani* sp. nov. (Asteraceae) from southwest Anatolia and its phylogenetic position. *Nordic Journal of Botany*, 30: 2-11.
- Makbul S, Coşkunçelebi K, Türkmen Z and Beyazoğlu O** (2011a) Comparison of foliar anatomy of *Scorzonera* L. (Asteraceae) taxa from north east Anatolia. *Pakistan Journal of Botany*, 43(1):135-155.
- Makbul S, Coşkunçelebi K and Beyazoğlu O** (2011b) Notes on the stem anatomy of *Scorzonera* L. (Asteraceae) taxa from northeast Turkey, *Phytologia Balcanica*, 113-121.
- Menichini F, Statti G and Delle MF** (1994) Flavonoid glycosides from *Scorzonera columnae* J. *Fitoterapia*, 65: 555–556.
- Murashige T and Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Nobecourt P** (1939) Sur les radicules naissant des cultures de tissus vegetaux. *C.r. Seanc. Soc. Biol.*, 130: 1271-1272.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Öksüz S, Gören N and Ulubelen A** (1990) Terpenoids from *Scorzonera tomentosa*. *Fitoterapia*, 61(1): 92-93.
- Panero JL and Funk VA** (2008) The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: Major clades of the Asteraceae revealed. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47: 757-782.
- Paraschos S, Magiatis P, Kalpoutzakis E, Harvala C and Skaltsounis AL** (2001) Three new dihydroisocoumarins from the Greek endemic species *Scorzonera cretica*. *J. Nat. Prod.*, 64: 1585-7.
- Profumo P, Gastaldo P, Caffaro L, Dameri RM, Michelozzi GR and Bennici A** (1985) Callus induction and plantlet regeneration in *Cichorium intybus* L.: II. Effect of different hormonal treatments. *Protoplasma*, 126: 215-220.
- Rechinger KH** (1977) *Scorzonera* L. Flora Iranica, 122: 16-79.
- Rehman RU, Israr M, Srivastava PS, Bansal KC and Abdin MZ** (2003) *In vitro* Regeneration of Witloof Chicory (*Cichorium intybus* L.) from Leaf Explants and Accumulation of Esculin. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 39(2): 142-146.
- Sarı A, Zidorn C, Spitaler R, Ellmerer EP, Özgökçe F and Organia KH** (2007) Phenolic compounds from *Scorzonera tomentosa* L. *Helv Chim Acta*, 90: 311-7.
- Seçmen Ö, Gemici Y, Görk G, Bekat L ve Leblebici E** (2004) *Tohumlu Bitkiler Sistematığı*, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Bornova, İzmir.
- Sezik E, Yeşilada E, Tabata M, Honda G, Takaishi Y and Fujita T** (1997) Traditional medicine in Turkey VIII. Folk medicine in East Anatolia; Erzurum, Erzincan, Ağrı, Kars, Iğdır provinces. *Econ. Bot.*, 51: 195-211.
- Skoog F and Miller CO** (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 11: 118-130.
- Skoog F and Tsui C** (1948) Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured *in vitro*. *Am. J. Bot.*, 35: 782-787.
- Skoog F** (1944) Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. *Am. J. Bot.*, 31: 19-24.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Stephens JM** (1994) *Scorzonera – Scorzonera hispanica* L. Fact Sheet HS-664. Florida Cooperative Extension Service, IFAS, *University of Florida*, Gainesville, Florida.
- Sümbül H** (1991) Two new species from Anatolia and two new records for the flora of Turkey. *Edinburgh J. Bot.*, 48: 27-40.
- Tanker N, Koyuncu M ve Coşkun M** (2007) *Farmasötik Botanik*. Ankara Üniversitesi Basımevi.
- Tolstikhina VV and Semenov AA** (1998) Minor metabolites of *Scorzonera hispanica* L. cell culture. *Rastitel'nye Resursy*, 34: 77-80.
- Tsevegsuren N, Edrada RA, Lin W, Ebel R, Torre C, Ortlepp S, Wray V and Proksch P** (2007) Biologically active natural products from Mongolian medicinal plants *Scorzonera divaricata* and *Scorzonera pseudodivaricata* (Asteraceae). *Journal of Natural Products*, 70: 962–967.
- Turan M, Kordali S, Zengin H, Dursun A and Sezen Y** (2003) Macro and Micro Mineral Content of Some Wild Edible Leaves Consumed in Eastern Anatolia. *Acta Agriculturae Scandinavica*, Section B - Soil & Plant Science, 53: 129-137.
- Türkmen Z, Makbul S, Coşkunçelebi K and Beyazoğlu O** (2010) Palynological observations on the genus *Scorzonera* L. (Lactuceae-Asteraceae) from North East Anatolia (Turkey). *Turkish Journal of Botany*, 34: 495-512.
- Walkey DG** (1972) Production of apple plantlets from axillary bud meristems. *Can. J. Plant. Sci.*, 52: 1085–1087.
- Wang B, Qiu PJ, Li GQ and Qu YL** (2009) Anti-tumor constituents from *Scorzonera mongolica*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 7(4): 283-286.
- Wang Y, Edrada-Ebel R, Tsevegsuren N, Sendker J, Braun M, Wray V, Lin W and Proksch P** (2009) Dihydrostilbene derivatives from the Mongolian medicinal plant *Scorzonera radiata*. *J. Nat. Prod.*, 72: 671-675.
- White PR** (1939) Controlled differentiation in a plant tissue culture. *Bull. Torrey Bot. Club*, 66: 507-513.
- Yıldırım Ş** (2011) *Scorzonera kurtii* Yıld. *Ot Sist. Bot. Dergisi*, 18(2): 15.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Zhu Y, Hu PZ, He ZW, Wu QX, Li J and Wu WS** (2010) Sesquiterpene Lactones from *Scorzonera austriaca*. *Journal of Natural Products*, 73: 237-241.
- Zidorn C, Ellmerer-Müller EP and Stuppner H** (2000) Sesquiterpenoids from *Scorzonera hispanica* L. *Pharmazie*, 55: 550-551.
- Zidorn C, Ellmerer-Müller EP and Stuppner H** (2001) Tyrolobibenzyls-novel secondary metabolites from *Scorzonera humilis* L. *Helvetica Chimica Acta*, 83: 2920–2925.
- Zidorn C, Spitaler R, Ellmerer-Müller EP, Perry NB, Gerhauser C and Stuppner H** (2002) Structure of tyrolobibenzyl D and biological activity of tyrolobibenzyls from *Scorzonera humilis*. *Z. Naturforsch C.*, 57: 614-619.
- Zidorn C, Ellmerer EP, Sturm S and Stuppner H** (2003) Tyrolobibenzyls E and F from *Scorzonera humilis* and distribution of caffeic acid derivatives, lignans and tyrolobibenzyls in European taxa of the subtribe Scorzonerinae (Lactuceae, Asteraceae). *Phytochemistry*, 63: 61-67.

ÖZGEÇMİŞ

Cansu SÜRÜCÜ, 1987'de Zonguldak'ta doğdu. İlk ve orta öğrenimini Zonguldak Ahmet Erdoğan İlköğretim Okulunda gördü. 2001'de Zonguldak Mehmet Çelikel Anadolu Lisesi'sini kazandı. 4 yıllık lise eğitiminden sonra 2005 yılında Zonguldak Karaelmas Üniversitesi (BEÜ) Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2010 yılında BEÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisansa başladı. 2011 sonunda Zonguldak'ta özel bir dershanede Biyoloji Öğretmeni olarak çalışmaya başladı. Şu anda, Düzce'de Biyoloji Öğretmeni olarak çalışmaya devam etmektedir.

ADRES BİLGİLERİ

Adres : (BEÜ), Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı
67100 – İncivez, Zonguldak/TÜRKİYE
Cep Tel : (532) 291 98 43
E- posta : cnssurucu@gmail.com