



T.C.

**BATMAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AKSENİK JÜVENİL SAKIZ AĞACI (*Pistacia  
lentiscus* L.) EKSPANTLARINDAN KALLUS  
KÜLTÜRLERİNİN BAŞLATILMASI VE  
OPTİMİZASYONU**

**ELİF DEMİR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Eylül-2018**  
**BATMAN**  
**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ KABUL VE ONAYI

Elif DEMİR tarafından hazırlanan "Aksenik Jüvenil Sakız Ağacı (*Pistacia lentiscus* L.) Eksplantlarından Kallus Kültürlerinin Başlatılması ve Optimizasyonu." adlı tez çalışması 04/09/2018 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyolji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

**Başkan**  
Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ

**Danışman**  
Prof. Dr. Engin TILKAT

**Üye**  
Doç. Dr. Emine AYZAZ TILKAT

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Doc. Dr. Bahattin İŞCAN  
FBE Müdürü



Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 114Z842 nolu proje ile desteklenmiştir.

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

## **DECLARATION PAGE**

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Elif DEMİR

04.09.2018

**ÖZET**  
**YÜKSEK LİSANS**

**AKSENİK JÜVENİL SAKIZ AĞACI (*Pistacia lentiscus* L.)  
EKSPLANTLARINDAN KALLUS KÜLTÜRLERİNİN BAŞLATILMASI VE  
OPTİMİZASYONU**

**ELİF DEMİR**

**Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Engin TILKAT**

**2018, 82 Sayfa**

**Jüri**  
**Prof. Dr. Engin TILKAT**  
**Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ**  
**Doç. Dr. Emine AYZAZ TILKAT**

*Pistacia lentiscus* L.'ta kallus kültürlerinin başlatılması ve optimizasyonu için etkili bir protokol geliştirmek amacıyla yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar, 1 mg/l IBA destekli MS besi ortamında çimlendirilmiş, sonrasında elde edilen akseni apikal sürgünler 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> içeren MS besi ortamında çoğaltılmıştır. İn vitro çoğaltılmış kültürlerden gelen akseni yapraklar ve tohumların in vitro çimlendirilmesiyle elde edilen kökler, kallus indüksiyonu için eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Kallus oluşumuna, her biri 0.25, 0.5, 1.0 ve 2mg/l olacak şekilde farklı oksin (IAA, IBA, NAA ve 2,4-D) ve sitokinin (BAP, Kin, TDZ ve 2İP) kombinasyonlarının etkisi ile yine her biri 1/1 kuvvette hazırlanan farklı besiyeri tiplerinin (MS, WPM, SH, B5) etkileri test edilmiştir. Bunların yanı sıra kallus kültürlerinin gelişimlerinin optimizasyonları üzerine farklı şeker tipi (glukoz ve sukroz) ve konsantrasyonları (15, 30, 50 mg/l), farklı pH (4.5, 5, 5.8, 6.5, 7), farklı ışık yoğunluğu (20,40,80 µmol/s), farklı sıcaklık (10, 20, 25, 30, 35°C) uygulamaları ile farklı besiyeri tipleri (MS, WPM, SH, B5) ve konsantrasyonlarının (0.25, 0.5, 1 ve 2 mg/l) etkileri test edilmiştir. Kallus kültürlerinin başlatılması çalışmalarında besiyeri tipi olarak hem kök (%80) hem yaprak (%84) eksplantları için, 1/1 MS besi ortamının, farklı BBD tipleri bakımından hem kök (%80) hem yaprak (%80) eksplantları için 1mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D içeren MS besi ortamının en iyi sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Kallus kültürlerinin gelişimleri üzerine optimizasyon çalışmalarında ise, farklı besiyeri tiplerinin araştırıldığı denemede kök (%80) ve yaprak (%100) eksplantlarında 1/1 MS besi ortamının, farklı şeker tip ve konsantrasyonlarının araştırıldığı denemede, kök ve yaprak eksplantlarında 15 mg/l sukroz ortamının, farklı pH uygulamaları arasında kök (%96) ve yaprak (%100) eksplantlarında pH 5.8 ortamının, farklı ışık şiddeti uygulamaları arasında kök eksplantları için 20 µmol (%100), yaprak eksplantları için 80 µmol (%100) ışık uygulamalarının, farklı sıcaklık uygulamaları arasından ise hem kök (%76) hem yaprak (%100) eksplantlarında 25°C sıcaklık uygulamasının en iyi sonuçları verdiği tespit edildi.

Özetle bu çalışma, değerli sekonder metabolitlerin *P. lentiscus* L. kallus kültürleri yoluyla daha fazla miktarlarda üretilmesine ışık tutacak, aynı zamanda kallus kültürlerinin başlatılması ve optimizasyonu için rutin olarak kullanılabilir bir protokol geliştirilmesine olanak sağlamıştır.

**Anahtar Sözcükler:** *Pistacia lentiscus* L., sakız, kallus kültürleri, optimizasyon.

## ABSTRACT

## MS THESIS

### ESTABLISHMENT AND OPTIMIZATION OF CELL SUSPENSION CULTURES OF JUVENILE MASTIC TREE (*Pistacia lentiscus* L.)

Elif DEMİR

BATMAN UNIVERSITY, INSTITUTE OF SCIENCE,  
THE DEGREE OF MASTER IN BIOLOGY

Advisor: Prof. Dr. Engin TILKAT

2018, 82 Pages

Jury

Prof. Dr. Engin TILKAT

Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ

Assoc. Prof. Dr. Emine AYAZ TILKAT

To develop an effective protocol for the initiation and optimization of callus cultures in *Pistacia lentiscus* L., the surface-sterilized seeds were germinated in an MS medium supplemented with 1 mg/l IBA and then the axenic apical shoots obtained were propagated in MS medium containing 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l GA<sub>3</sub>. The roots obtained by in vitro germination of the seeds and the axenic leaves from in vitro propagated cultures were used as explant source for callus induction. The effect of the combination of different auxin (IAA, IBA, NAA and 2,4-D) and cytokinin (BAP, Kin, TDZ and 2IP) each one at 0.25, 0.5, 1.0 and 2 mg /l concentrations, respectively were tested. for callus formation. The effects of different nutrient media types (MS, WPM, SH, B5) prepared in 1/1 strength were also tested. In addition, different types of sugar (glucose and sucrose) and their different concentrations (15, 30, 50 mg / l), different pHs (4.5, 5, 5.8, 6.5, 7), different light intensities (20,40,80 µmol/s), and different temperature (10,20,25,30,35 ° C) effects were tested for callus development. Besides these experiments, different types of nutrient media (MS, WPM, SH, B5) prepared in (0.25, 0.5, 1 and 2 mg/l) strength were also tested. In the study of callus cultures initiation, it was found that the MS medium for both root (80%) and leaf (84%) explants gave the best results as nutrient medium type. In terms of different types of PGR, again an MS medium containing 1mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D for both root (80%) and leaf (80%) explants gave the best results.

In the optimization studies on callus cultures development, the highest root and leaf explants in application results of different sugar types and concentrations from 1/1 MS medium in root (80%) and leaf (100%) explants in which different food types were searched. The optimal value for root (96%) and leaf (100%) explants was different from pH 5.8 medium between different pH applications and 20 µmol (100%) for root explants among different light intensity applications from MS medium containing 15 mg/l sucrose 80% (100%) light applications for explants and the best result for different temperature applications was obtained from both roots (76%) and leaves (100%) at 25°C temperature.

In the optimization studies on callus cultures development, in experiments investigating the different media types, the root (80%) and leaf (100%) of explants that 1/1 MS medium, different sugar types and their different concentrations the root and leaf of explants at 15 mg / l sucrose, different pH applications . root (96%) and leaf (100%) explants at pH 5.8, different light intensity applications the root (100%) at 20 µmol and leaf (100%) at 80 µmol, different temperature applications, both root (76%) and leaf (100%) explants at 25 ° C temperature gave the best results was determined.

In summary, this study allows to develop a protocol that can routinely be used for the initiation and optimization of callus cultures, which at the same time will shed light on the production of valuable secondary metabolites by *P. lentiscus* L. callus cultures

**Keywords:** *Pistacia lentiscus* L., mastic, callus cultures, optimization.

## ÖNSÖZ

Sakız ağacından elde edilen reçine geleneksel olarak çok sayıda hastalığı tedavi etmek amacıyla tarih boyunca kullanılmıştır. Günümüzde hastalıkların tedavisinde farmasötik ilaçları takviye etmek amacıyla veya tamamen doğal ilaçların kullanılmasında artan bir eğilim mevcuttur. İlaç bileşenlerine olan ihtiyacın artması, alternatif olarak kullanılacak diğer yöntemlerin keşfini gerektirmiştir. Bu bağlamda hammadde temininde kullanılan geleneksel yöntemlere alternatif olarak kullanılacak diğer bir yöntem ise farklılaşmamış hücrelerden üretimdir. Kallus kültürleri, sekonder metabolit üretiminde ana bitkiye oranla daha yüksek kapasitede üretim özelliği gösterebilen alternatif bir yaklaşımdır. Bu çalışmada *Pistacia lentiscus* L.'un aksenik juvenil sürgünlerinden kallus kültürlerin başlatılması ve optimizasyonuna ilişkin bir protokol ilk defa geliştirilmiştir. Tez çalışmamızda geliştirilen bu protokol, süspansiyon kültürlerinin başlatılmasında ve biyoreaktör sistemleri kullanılarak ihtiyaç duyulan hammadde temininde ticari üretim olanaklarına temel oluşturabilir.

Tez konunun belirlenmesi ve yürütülmesini sağlayan, fikirleriyle beni yönlendiren, araştırmalarımnda ilgi, bilgi ve desteğini esirgemeyen danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Engin TILKAT'a, araştırma ve tez yazım aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı sayın hocam Doç. Dr. Emine AYZAZ TILKAT'a ve laboratuvar çalışmalarım sırasında her zaman yardım, desteğini ve tecrübesini esirgemeyen sayın hocam Öğr. Gör. Veysel SÜZERER'e ve sayın hocam Araş. Gör. Dr. Hilal SURMUŞ ASAN'a, deneysel çalışmalar aşamasında samimiyeti ve enerjisiyle çalışmaktan keyif aldığım ve desteğini her zaman hissettiğim arkadaşım Ayşe HOŞER'e ve emeği geçen laboratuvar arkadaşlarım Gurbet BAĞLAMIŞ ve Makbule AYDINLIK'a teşekkürlerimi sunarım. Her zaman fedakârlık ve desteklerini yanımda hissettiğim canım aileme de sonsuz teşekkür ve minnettarlığımı sunarım. Aynı zamanda tez çalışmamın yürütülmesinde 114Z842 No'lu proje ile finansal kaynak sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na da teşekkürü bir borç bilirim.

Elif DEMİR  
BATMAN-2018

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	ix
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....</b>	<b>5</b>
2.1. <i>P. lentiscus</i> ile İlgili Sistematik Bilgiler .....	5
2.1.1. <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....	5
2.1.1.1. Botanik özellikleri.....	5
2.1.1.2. Tıbbi ve ekonomik önemi .....	8
2.2. Kallus Kültürleri İle İlgili Çalışmalar .....	9
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>14</b>
3.1. Materyal .....	14
3.2. Yöntem.....	14
3.2.1. <i>In vitro</i> kültürlerin başlatılması için ön hazırlıklar .....	14
3.2.1.1. Stok solüsyonların hazırlanması .....	14
3.2.1.2. Sterilizasyon işlemleri .....	16
3.2.2. Sürgün kültürlerinin eldesi çalışmaları .....	17
3.2.2.1. Olgun tohumların yüzey sterilizasyon işlemleri .....	17
3.2.2.2. <i>In vitro</i> sürgün kültürlerinin başlatılması çalışmaları.....	18
3.2.2.3. Stok Sürgün Kültürlerinin Elde Edilmesi .....	18
3.2.3. Kallus kültürlerinin eldesi ve optimizasyonu çalışmaları.....	18
3.2.3.1. Kallus kültürlerinin başlatılması çalışmaları .....	18
3.2.3.2. Kallus gelişiminin optimizasyonu ve stok kallus kültürlerinin eldesi çalışmaları .....	18
3.2.3.3. Juvenil (kök ve yaprak) kallus kültürlerinde büyümenin karakterizasyonu .....	20
<b>4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>21</b>
4.1. Sürgün Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular ve Tartışma .....	21
4.2. Kallus Kültürlerinin Başlatılması ve Optimizasyonu Çalışmalarına Ait Bulgular ve Tartışma .....	22
4.2.1. Kallus kültürlerinin başlatılması çalışmalarına ait bulgular .....	22
4.2.2. Kallus kültürlerinin gelişiminin optimizasyonu çalışmalarına ait bulgular ve tartışma .....	39
4.2.2.1. Farklı besi ortam tipinin etkisine ait bulgular.....	39
4.2.2.2. Farklı besi ortamı kuvvetlerinin etkisine ait bulgular.....	42
4.2.2.3. Farklı karbon kaynağı ve konsantrasyonun etkisine ait bulgular .....	44

4.2.2.4. Farklı pH etkisine ait bulgular .....	45
4.2.2.5. Farklı ışık yoğunluklarının etkisine ait bulgular.....	47
4.2.2.6. Farklı sıcaklıkların etkisine ait bulgular .....	48
4.2.3. Optimize edilmiş juvenil kök ve yaprak kalluslarının büyümesinin karakterizasyonu .....	54
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>56</b>
5.1. Sonuçlar .....	56
5.2. Öneriler .....	62
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>63</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>72</b>



## SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
2,4-D	: 2,4 Diklorofenoksi asetik asit
2iP	: 2-izopentiladenin
B5	: Gamborg (1968)
BAP	: Benzil amino pürin
BBD	: Bitki büyüme düzenleyicileri
CaCl <sub>2</sub>	: Kalsiyum klorür
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	: Kalsiyum klorür dihidrat
CdCl <sub>2</sub>	: Kadmiyum klorür
CdSO <sub>4</sub>	: Kadmiyum sülfat
cm	: Santimetre
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	: Kobalt klorür heksahidrat
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	: Bakır sülfat pentahidrat
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EI/MS	: Kütle spektrometresi
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	: Demir sülfat heptahidrat
FeSO <sub>4</sub>	: Demir sülfat
g/l	: Gram/litre
GA <sub>3</sub>	: Gibberellik asit
GC	: Gaz kromatografisi
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi
gr	: Gram
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	: Borik asit
HCl	: Hidrojen klorür
IAA	: Indol asetik asit
IBA	: İndol bütirik asit
IPP	: İzopentil pirofosfat
JA	: Jasmonik asit
kg	: Kilogram
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	: Potasyum dihidrojen fosfat
KHA	: Kuru hücre ağırlığı
KI	: Potasyum iyodür
Kin	: Kinetin
KNO <sub>3</sub>	: Potasyum nitrat
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografisi-Kütle spektrometresi
Lux	: Lüks
m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>	: metre <sup>2</sup> /saniye
mg	: Miligram
mg/l	: Miligram/litre
MgSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	: Magnezyum sülfat tetrahidrat
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	: Magnezyum sülfat heptahidrat
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	: Mangan sülfat
MS	: Murashing ve Skoog
Na <sub>2</sub> EDTA	: Sodyum etilen diamin tetra asetik asit
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	: Sodyum molibdat dihidrat
NAA	: Naftalen asetik asit

NaOCl	: Sodyum hipoklorit
NaOH	: Sodyum hidroksit
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	: Amonyum nitrat
NO	: Nitrik oksit
pH	: Hidrojen iyon konsantrasyonu
RA	: Rosmarinik asit
s	: Saat
Sn	: Saniye
TDZ	: Thidiazuron
UV	: Ultraviyole
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	: Çinko sülfat heptahidrat
µM	: Mikromolar



## 1. GİRİŞ

Sakız ağacı (*P. lentiscus* L.), Anacardiaceae familyasında yer alan *Pistacia* cinsine dâhil bir türdür (Stevens, 2008). Sakız Ağacı, Akdeniz havzası boyunca özellikle İber yarım adası, İtalya, Fas, Ürdün, Yunanistan ve Türkiye'nin batı kıyılarında yetişen, genellikle çalı formunda ancak ıslah edildikten sonra ağaç formu da alabilen, 8-10 m'ye kadar uzayabilen ve yapraklarını dökmeyen dioik bir bitkidir (Onay ve ark., 2016a,b; Akdemir ve ark., 2013; 2015, Kılınç ve ark., 2014). Yapraklar tüysü, yaprakçıklar uçta, dikensi ve sivridir. Çiçekler salkım şeklinde toplanmıştır. (Kıvıçak ve Akay 2004; Anonim 2008a). Sakız ağacı, erkek veya dişi ağaçların kalın dallarının yaralanması yoluyla elde edilen sıvı ve renksiz bir reçine üretir (Acar, 1988; Baytop, 1968). Bu yaralama işlemi genellikle dişi ağaçlara oranla daha yüksek verim alınan erkek ağaçlarda uygulanır. Mastik sakızı olarak adlandırılan bu aromatik şeffaf renkli reçine, dünyada sadece ticari olarak Sakız Adası'nda üretilir (Mills ve White, 1977; Duke, 1983; Mills ve White, 1989; Dalby, 2003; Kılınç ve ark., 2014). Bu reçine sakız ağacının savunma mekanizmasında önemli bir role sahiptir. Milat'tan önceki yıllardan beri birçok ülkede sakız ağacı gövdesinin reçinesi, yaprakları ve meyvelerinden drog (ilaç etkili madde) olarak yararlanılmaktadır. Sakız reçinesi günümüzde ilaç ve gıda sanayinin de önemli bir hammaddesidir. Sakız ağacı, ılımlı iklimi ve toprak karakteristiği bakımından Sakız Adası'nın güney kısmında iyi gelişim gösterir aynı zamanda adanın diğer kısımlarında da yetişir ancak sakız üretmez. Sakız ağacı, Mastichochoia (doğal damla sakızının yetiştirildiği köylere verilen ad) köyllerine yayılmış limonsu balsam kokusuyla bilinir. (Anonim, 2008b).

İlaç hammaddesi başta olmak üzere kozmetik, gıda ve katkı maddesi gibi pek çok endüstri sektöründe sakız reçinesinin kullanımı ile ilgili olarak kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Günümüze kadar yapılan birçok farmakolojik çalışmada, sakız ağacının içeriğinde bulunan metabolitlerin çok sayıda hastalığın tedavisinde (antifungal, antibakteriyal, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, anti-helicobakter pylorii aktivitesi, antiatherogenik aktivite, antitümör aktivite, yara iyileştirici aktivitesi, karaciğer koruyucu aktivite, antiproliferatif ve proapoptik aktivite ve tansiyon düşürücü ve antikanser aktivite gibi) kullanıldığı rapor edilmiştir (İmtiyaz ve ark., 2013; Huwez ve ark., 1998; Marone ve ark., 2001; Al-Habbal ve ark. 1984; Al-Said ve ark. 1986; Balan ve ark., 2007; Assimopoulou ve Papageorgiou, 2005; Kaliora ve ark., 2007a,b; Andrikopoulos ve ark., 2003 ve Akdemir, 2013). Sakız reçinesinin tedavi edici etkisi ile ilgili çalışmalar irdelendiğinde, özellikle bakteriyal enfeksiyonlar ve gastrointestinal

sistem düzensizliklere karşı koruyucu etkileri de olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte, son 30 yıl içerisinde yapılan çalışmalara göre ise sakız reçinesinin insanda kansere neden olan birçok tümör tipine karşı antiproliferatif özellikler gösterdiği tespit edilmiştir. Sakız reçinesi içinde bulunan aktif antikanser özellik gösteren bileşenlerin (masticadienonic asit, 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienolic asit, 24,25-S-dihydromasticadienonic asit ve masticadienolic asit) 5 farklı kanser tipini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Ch'avez ve ark., 2005; Giaginis ve Theocharis 2011).

Ülkemizde hobi amaçlı bahçelerde bireysel ihtiyaçların karşılanması haricinde ticari sakız reçinesi üretimi yapılmamaktadır. Ticari nitelikteki üretim sadece Yunanistan'ın Sakız Adası'nda yapılmakta olup, bu nedenle de sınırlı miktarlarda kalmaktadır (Anonim, 2015).

Bitki doku kültürleri yüksek miktarda, homojen, farklılaşmamış hücrelerin üretimine olanak sağlayarak çok değerli fitokimyasalları sentezleme potansiyeline sahiptir. Sekonder metabolitler doğal olarak tarımsal yöntemlerle de elde edilebilirler. Ancak, tarımsal üretim, pek çok bitki için mevsimsel olduğu gibi, coğrafi konuma, iklim ve büyüme koşullarına da bağlıdır. (Güven ve Gürsul 2014). Temel olarak doku kültürü, bitkiden (yaprak, kök gövde vb.) bir parçanın (eksplant), daha önceden steril edilmiş, bir kap içindeki (petri, erlen vb.) besin ortamına yerleştirilmesi yoluyla kültüre alınmasıdır. Kallus kültürü, bitkinin herhangi bir kısmından aseptik şartlarda uygun bir besi ortamında, genellikle eşit oksin sitokin kombinasyonlarında farklılaşmamış hücre dokusunun oluşturulmasıdır. Bir başka deyişle kallus kültürleri kök, gövde, apikal meristem, kotiledon, yaprak gibi organlardan alınan küçük parçaların (eksplant), kallus (bitki yara dokusu) oluşturmak için besin ortamlarına ekilmesiyle yapılan yöntemdir. Bazı dokuları kültüre almak güç olmasına rağmen, kök ve gövde iletim dokularının yakınındaki dokular kallus oluşturma çalışmalarında iyi sonuçlar vermektedir. Yukarıda da değinildiği üzere kallus farklılaşmamış bitki hücrelerinden oluşan bir hücre topluluğudur. Bir başka deyişle kallus, ana bitkiden kesilip çıkartılan ve bölünme özelliğini yitirmemiş organ ve doku parçalarının, karbon kaynağı ve bitki büyüme düzenleyicileri içeren yarı katı besin ortamında büyütülmesi sonucu oluşan morfolojik düzensizliğe sahip kütleler olarak tanımlanmaktadır (Sökmen ve Gürel 2001). Kallus oluşumu inkübasyon süresine, ortam sıcaklığına, fotoperiyoda, bitkinin kallus oluşturma yeteneğine göre değişir. Elde edilen kalluslardan sekonder metabolit üretimi, süspansiyon kültürü, protoplast kültürü ve füzyonu, mikroçoğaltım yapılabilir (Yağcı ve ark. 2008).

Bitki rejenerasyonu, dolaylı organogenez, somatik embriyogenez ve hücre süspansiyon kültürleri gibi birçok kültür tekniğinin başlangıç noktası olarak kallus kültürleri kullanılabilir (Aktaş ve Çölgeçen 2017). Bitki doku kültürü yöntemlerinden olan kallus kültürleri, bitki biyoteknolojisi çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bağlamda, indirekt organogenez, somatik embriyogenez ve hücre süspansiyon kültürleri ve protoplast kültürlerinde başlangıç materyali, fizyolojik ve sitogenetik çalışmalarda ise deneysel materyal olarak kullanılmaktadır. Bunun yanısıra yine başta somaklonal varyasyon çalışmaları olmak üzere, yapay tohum oluşturma, mutasyon ıslahı ve gen transferi çalışmalarında, aşı uyumsuzluğunun kontrolünde, bitkinin biyotik ve abiyotik stres koşullarına verdiği yanıtların araştırıldığı ve daha çok sekonder metabolit üretim çalışmalarında da kullanılmaktadır (Erdemel ve Aygün 2016).

Kallus kültürleri yoluyla, çok az miktarda kallus materyalinin yüksek miktarlarda üretilebilmesi mümkündür. Aynı zamanda kallus kültürleri mevsimlik kısıtlamalar nedeniyle üretilemeyen, istenilen ürünlerin yıl boyunca üretimine de imkân sağlar. Bazı sekonder metabolitler (örneğin antosiyanin) organize olmuş dokulardan daha zor elde edilirken, kallus kültürlerinden kolay elde edilir (Sökmen ve Gürel, 2001; Koo ve ark., 2005; Keskin ve Kunter, 2007; Maharik ve ark., 2009; Çetin ve ark., 2011). Kallus kültürlerinin en çok tercih edildiği çalışma alanları arasında ikincil bitki ürünü üretimi gelmektedir. İkincil ürün üretiminde kallus kültürü diğer *in vitro* yöntemlere göre daha fazla kullanılmaktadır. Kallus kültürlerinin kullanılması ile elde edilecek hedef bileşiğin miktarı, ortamda kullanılan büyümeyi düzenleyici, uyarıcı veya öncü maddeler katkısı ile düzenlenerek artırılabilir (Yağcı ve ark. 2008). Sekonder metabolit üretiminde kallus kültürlerinin kullanılmasının; spesifik dokulara özgü metabolitlerin daha etkin üretimi, tehlike altındaki türlerde metabolit üretimi çalışmalarına imkan sağlaması gibi avantajları bulunmaktadır (Ramachandra ve Ravishankar 2002; Lila 2005).

Kallus kültürleri kullanılarak değişik ikincil bitki ürünlerinin üretilebileceğine ilişkin çok sayıda çalışma yapılmıştır (Parr 1989; Bouque ve ark. 1998; Ciddi ve Shuler 2000; Keller ve ark. 2000; Luczkiewicz ve ark. 2002; Stella ve Braga 2002; Luczkiewicz ve Glod 2003). Kallus kültürleri, ikincil metabolitlerin çoğaltılması ve ekstraksiyonu amacıyla bitkilerin yaprak, gövde, kök ve tohum gibi eksplantlarından steril koşullar altında rutin olarak başlatılabilir. Kallus kültürlerinde hızlı bölünebilen hücre hatlarının geliştirilmesi, yüksek üretim yapan hücre hatlarının seleksiyonu ve

kültür şartlarının optimizasyon çalışmaları, sekonder metabolit üretimini arttıran etmenler arasında sayılabilir (Karuppusamy, 2010). Kallus kültürünün başlatıldığı doku parçasının orijini sekonder metabolitlerin üretiminde önem kazanmaktadır (Sökmen ve Gürel, 2001). Sekonder metabolit üretiminde, farklı bitki kısımlarından geliştirilen kallusların orjinlendiği doku türüne göre farklı sonuçlar verdiği tespit edilmiştir (Maharik ve ark., 2009; Nartop ve ark., 2014, Erkoyuncu ve yorgancılar, 2016).

Çalışmamızda kullandığımız bitkisel materyal ülkemizde sadece Ege bölgesinde doğal bir şekilde yetişmektedir. Özellikle sakızgacığıllar (Anacardiace) familyasına ait türlerin sahip olduğu tıbbi önem göz önüne alındığında, bu türler üzerine yapılan biyokimyasal çalışmalar, yapı aydınlatma çalışmaları ile bu bitkilerin içerdikleri bileşenlerin biyoteknolojik olarak miktarlarının ve etkilerinin araştırılması üzerine yapılan çalışmalar yok denecek kadar az durumdadır. Bu nedenle tez çalışmamızda, iki farklı orjinden gelen kalluslar (kök ve yaprak) kullanılarak birçok değerli sekonder metaboliti yapısında barındıran sakız ağacının, literatürde daha önce hiç çalışılmamış olan kallus kültürlerinin, başlatılması ve optimizasyonu için protokoller geliştirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. *P. lentiscus* ile İlgili Sistematik Bilgiler

Sakız ağacı (*P. lentiscus* L.), Sapindales takımının Anacardiaceae familyasından *Pistacia* cinsine dâhil bir türdür (Stevens, 2008). *Pistacia* cinsi ile ilgili Linnaeus (1753) tarafından yapılan ilk sistematik çalışmada; *P. lentiscus*, *P. narbonensis*, *P. simaruba*, *P. terebinthus*, *P. trifolia*, ve *P. vera* olmak üzere 6 tür tanımlanmıştır. Linnaeus'dan önce Tournefort (1700) *P. lentiscus*'un ayrı bir cins, *Lentiscus* olduğunu değerlendirerek *P. terebinthus* ve *P. vera*'yı *Terebinthus* cinsi altında sınıflandırmıştır. *Pistacia* cinsi üzerine yapılan en kapsamlı taksonomik çalışmada ise, cins 11 tür ve 4 seksiyon olarak sınıflandırılmıştır. Ancak yapılan moleküler çalışmalar sonucunda *Pistacia* cinsinin, *Pistacia* ve *Lentiscella* olmak üzere iki seksiyondan oluştuğu, *P. lentiscus*'un ise 2. seksiyonda yer aldığı rapor edilmiştir (Al Saghir 2012; Onay ve ark.,2016a).

1) *Pistacia*: *Pistacia atlantica* Desf., *Pistacia chinensis* Bunge, *Pistacia eurycarpa* Yalt., *Pistacia khinjuk* Stocks, *Pistacia terebinthus* L., *Pistacia vera* L.

2) *Lentiscella*: *Pistacia lentiscus* L., *Pistacia mexicana* Humb., *Pistacia weinmannifolia* J. Poiss. ex Franch.

#### 2.1.1. *Pistacia lentiscus* L.

Genellikle çalı ve ağaçlık formunda gelişen, 1-3 m'ye kadar boylanabilen hatta bazen 10 m yüksekliğine ulaşabilen sık dallı her dem yeşil bir bitkidir. Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerden özellikle Yunanistan, Türkiye, İtalya ve İspanya'nın kıyı bölgelerinde doğal olarak yetişen bir türdür. Sakız ağacının Türkiye florasına göre bitki sistematikteki yeri aşağıdaki gibi ifade edilebilir (**Çizelge 2.1**).

**Çizelge 2.1.** *P. lentiscus* L.'un sistematikteki yeri.

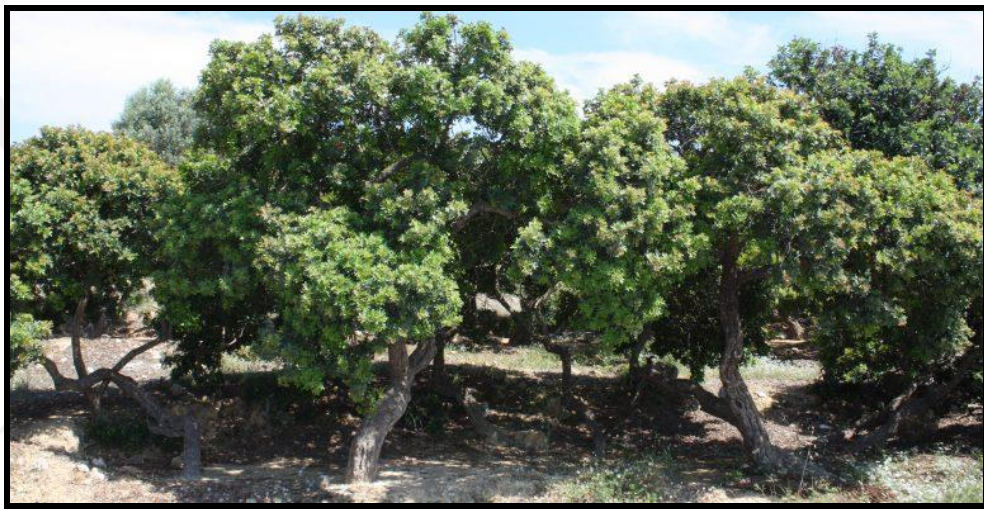
Kingdom:	Plantae
Divisio:	Magnoliophyta
Clasis:	Magnoliopsida
Subclasis:	Rosidae
Ordo:	Sapindales
Familya:	Anacardiaceae
Genus:	<i>Pistacia</i>
Species:	<i>Pistacia lentiscus</i> L.

#### 2.1.1.1. Botanik özellikleri

*Pistacia lentiscus* L.(sakız ağacı) Akdeniz Havzasındaki yarı çöl kıyı bölgelerinde büyük ölçüde yayılım gösteren odunsu bitkilerin en önemli türlerinden

biridir (Cortina ve ark., 2007). Antik Yunanlılardan beri halk sağlığında kullanılan her zaman yeşil alıkları yada 2-10 metre uzunluğunda bŸyŸyen kŸk ağaçlardan oluşmaktadır (Benhammou ve ark., 2008; Yalçın, 2011).

Doğal şartlarda ağaçlar oldukça yavaş bŸyŸmekte olup, yaklaşık 40-50 yılda maksimum ekonomik sakız verim olgunluğuna erişirler. Her ne kadar ‘‘olŸmsŸz ağaç’’ diye adlandırılırsa da, 70 yıldan sonra yaşlanırlar ve reçine verimleri azalış, ancak 200 yıl yaşayan ağaçlar mevcuttur. Modern bakım teknikleriyle yetiştirilen sakız ağaçları çok daha kısa bir zamanda tam olgunluğa ulaşır ve yŸksek verim ve kalite daha kısa sŸrede alınabilir (Perikos 1993).



**şekil 2.1.** eşme iftlikkŸy’de yetişen dişi bir sakız ağaının genel gŸrŸnŸmŸ, (Anonim, 2017).

**GŸvde:** Doğal damla sakızı ağaının gŸvdesi dŸz değildir. Gençken açık gri renkte, ileri yaşlarında kŸl karası rengindedir. am ağaçlarında olduğu gibi gŸvdeden ayrılması zor olan "riknides" adıyla anılan çizgilerle kaplıdır ve pŸrŸzlŸdŸr (Anonim, 2011, Yalçın 2011).

**KŸk:** Genç dŸnemde kazık kŸk ve bol miktarda yan kŸk oluşturma Ÿzelliđindedir. Olgun dŸnemde, yan kŸkler oldukça genişler ve bŸylece saçak kŸk oluşumu ve kŸkler her yŸne doğru gelişmekte ve 20 metre uzunluğa erişebilmektedir artar (Mattia vd., 2005).

**Yaprak:** Yaprakları ift tŸysŸ 4-10 yaprakçıktan oluşur. Yaprաđın orta damarı (rachis) belirgin olarak kanatlıdır. Yaprakıkları 1,5-3,5 cm. boyunda olup, 0,5-1,5 cm genişliğinde, uzun-oval biçimde, kŸt uçlu, tam kenarlı, sert ve derimsidir. Yaprakığın Ÿst yŸzŸ parlak açık yeşil, alt yŸzŸ mat yeşil her iki yŸzŸ de tŸysŸzdŸr (Karadağ ve ark., 2012).



Şekil 2.2. Dişi sakız ağacı yaprakları

**Çiçek:** Dişi ve erkek çiçekler ayrı bitkiler üzerindedir. Çiçekler infloresens gösterir ve tipik bir panikuladır. İlkbaharda çiçeklenir, meyveler sonbaharda olgunlaşır. Sürgün gelişiminden birkaç hafta sonra çiçeklenme gözlenir. Çiçekleri Mart ortasında ilk kez ortaya çıkar ve Nisan başlarında tam çiçeklenme gerçekleşir (Yalçın, 2011).



Şekil 2.3. Dişi sakız ağacı çiçek yapısı (Anonim, 2017)

**Meyve:** İlk önce yeşil renkte olup daha sonra kırmızılaşır, olgunlaşmış meyve ise siyahtır. Sonbaharda sahip olduğu sayısız meyvesiyle üretkenlik yeteneği fazla gibi görünse de üreme başarısı (tohum ve meyve oluşturan çiçek yüzdesi) çok düşüktür. Çok sayıda çiçek meyve oluşturmaz ve gelişimin farklı aşamalarında dökülür (Şenyay, 2008).



Şekil 2.4. Sakız ağacı meyveleri (Anonim, 2017)

**Tohum:** Tohumlar olgunlaşma döneminde yuvarlak ve düz yüzeylidirler. Olgun tohumlar ekim-ocak ayları arasında toplanabilir (Prada ve Arizpe, 2008). Meyve tek tohum içerir, ancak birçok meyve partenokarpiden, embriyo yokluğundan veya böcek zararından dolayı tohum içermez (Palli and Aronne, 2000).

#### 2.1.1.2. Tıbbi ve ekonomik önemi

*P. lentiscus* L. çok çeşitli tıbbi kullanımlara sahiptir. Antik Yunan'da farklı parçaları ya da reçinesi kaynatılarak oluşturulan özüt öksürük, boğaz ağrısı, egzama, mide ağrısı, böbrek taşı ve sarılık tedavisinde kullanılmıştır. Hepatoprotektif etkisiyle terapötik fayda sağladığı, reçinesinin kanser hücrelerinin tedavisinde etkili olabileceği, bazı lipoproteinlerin sitotoksik etkisini düşürdüğü bilinmektedir. Ayrıca içerdiği fenolik bileşenlerin de önemli seviyede antimikrobiyal ve antifungal aktivite gösterdiği rapor edilmiştir Bunun yanısıra sakız reçinesi gıda endüstrisinde, parfüm yapımı için kozmetik endüstrisinde, dental yapıştırıcı, boya, vernik gibi malzemelerin üretiminde kullanılmaktadır (Yalçın, 2011; Akdemir ve ark., 2013).

Sakız adasında üretilen ham sakızın yaklaşık % 70'i dış ülkelere pazarlanmaktadır. Geri kalan ham sakızdan çok sayıda ürün geliştirilerek başta Sakız Adası ve Yunanistan olmak üzere Kıbrıs, New York, Suudi Arabistan, Fransa ve ülkemizdeki marketlerde satılan ürünler üretilmektedir. Bu marketlerde sakız katkılı çok sayıda ürün satılmaktadır. Bunlar; doğal sakız, sakızlı çiklet, sakız uçucu yağı (eterik yağı), sakız yağı, sakız tozu gibi organik gıda maddeleri, sakızlı tatlı ve bisküviler ve geleneksel sakızlı su gibi içecekler, değişik hastalıklar için ilaç yerine kullanılan tabletler, kozmetik ve folklor öğelerini içeren ürünlerdir.

Sakız Adası'nda sakız yetiştiriciliği ve sakızdan ürün geliştirilmesi için binlerce istihdam yaratılmış ve her yıl milyonlar lira ada ekonomisine kazandırılmaktadır. Bu kapsamda bugün hala ülkemizde sakız yetiştiriciliğinin izleri bulunan İzmir'in farklı bölgelerinde Çeşme, Ildır, Alaçatı, Seferihisar ve Karaburun bölgeleri sakız adası örnek alınarak ülke ekonomisine kazandırılması için sakız eylem planının başarılı bir şekilde uygulanmasına ve kapsamının genişletilerek kontrollü bir şekilde büyütülmesi elzemdir (Onay ve ark., 2016).

## 2.2. Kallus Kültürleri İle İlgili Çalışmalar

**Gürel ve ark. (2002)**, çalışmalarında şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.)'nin ıslah edilen hatlarından elde edilen kalluslarından bir hücre süspansiyon kültürü protokolü oluşturmuşlardır. Benzil amino pürin (BAP) ve 2-4 Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D)'nin farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarının kültür periyotları boyunca (0,3,5,7,9,11,13 ve 15 gün) süspansiyon kültürlerinin büyümesi üzerine etkisini incelemişlerdir. Bütün hatlarda hücrelerin büyüme oranlarının başlangıçta yavaş ancak kültür süresi arttıkça büyüme oranlarında artış olduğunu belirtmişlerdir. Yüksek oranda BAP (0,25 mg/l) ve 2,4-D (0,25 mg/l) içeren besi ortamlarında hücre bölünmesinin düşük oranda BAP (0,1 mg/l) ve 2,4-D (0,1 mg/l) içeren besi ortamlarına oranla daha yüksek seviyede hücre bölünmesinin meydana geldiğini belirtmişlerdir. Farklı hatların ortalama büyüme oranları karşılaştırıldığında M14, M114, ELK345, ÇBM315 ve M1017'ye ait ortalama hücre büyüme oranlarının sırasıyla %34.8, %21.5, %19.2, ve %13.4 olduğu, süspansiyon kökenli kallusların %50'sinin BAP+IAA veya sadece TDZ içeren ortamda inkübe edildiğinde sürgün oluştuğu ve sürgünlerin sadece 3.0 mg/l IBA içeren ortamda kolaylıkla köklendirildiği rapor edilmiştir.

**Onay ve ark., (2007)**, *Pistacia vera* L.'nin olgun zigotik embriyoları 2.0 mg/l 2,4-D ve 40 g/l sükröz ile Gamborg vitaminlerini içeren MS besi ortamında kallus kültürlerinin başlatmışlardır. 1-4 mg/l 2,4-D tek başına veya BAP ile kombinasyonu içeren Gamborg vitamin destekli MS besi ortamında kalluslardan globular somatik embriyolar elde etmişler ve embriyojenik kültürleri 4 hafta süresince 1-2 mg/l BAP içeren kültür ortamında muhafaza etmişlerdir. Akabinde 0.5 mg/l BAP, ABA'nın farklı konsantrasyonları ve sükröz destekli besin ortamında ise somatik embriyoların oluştuğunu belirtmişlerdir.

**Francoise ve ark. (2007)**, *Zataria multiflora* bitkisinin *in vitro* şartlarda farklı hormon uygulamaları ve besi ortamında gelişimini incelemek amacıyla yürüttükleri

çalışmada sürgün kültürleri sürgün uçlarının farklı BAP ve NAA destekli MS besi ortamında başlatılmıştır. En yüksek proliferasyon oranı 1 mg/l BAP destekli besi ortamından elde etmişlerdir. Kallus kültürleri ise sürgün nodları kullanılarak 1 mg/l Kinetin ve 0.5 mg/l 2,4-D destekli MS besi ortamında başlatmışlardır. Kallus büyümesine üç farklı besi ortamının (MS tuz ve vitaminleri, MS tuz ve Gamborg vitaminleri ile Gamborg tuz ve vitaminleri) etkisini araştırmışlardır. En iyi büyüme oranı ve rosmarinik asit (RA) üretiminin 0.75 mg/l BAP destekli Gamborg tuz ve vitaminlerini içeren besi ortamından elde edildiğini RA'in sürgün ve kallus kültürlerinde üretimi ile bitki büyümesi üzerine farklı karbonhidrat (sükroz ve glukoz) çeşitlerinin ve dozlarının etkisini de test etmişlerdir. Bununla birlikte iki farklı ışık altında (karanlık ve 16 saat aydınlık /8 saat karanlık) deneyleri yürütmüşlerdir. En yüksek RA seviyesi sürgün kültürlerine oranla (12.28 mg/g kuru ağırlık) kallus kültürlerinden (158.26 mg/g) elde edildiği en yüksek üretimin ışık altında, 75 mg/l glukoz içeren besi ortamından elde edildiği belirtilmiştir.

**Kumar ve Rakhi, (2008)**, *Camelia sinensis* bitkisinde kallus başlatılması ve optimizasyonu üzerine yaptıkları çalışmada, farklı BBD, sıcaklık, ışık, pH ve karbon kaynaklarının etkilerini test etmişlerdir. Büyüme düzenleyicilerden NAA ve 2,4-D ile en az bir sitokin BAP / Kinetin varlığında, 25 °C sıcaklık, % 9 oranında sukroz ve 1000-2000 lux ışık yoğunluğunun kallus kültürleri için optimum şartlar olduğunu tespit etmişlerdir.

**Behbahani ve ark. (2011)**, özellikle yaprakları likopen bakımından zengin bir bitki olan *Barringtonia racemosa* bitkisinin yaprak eksplantlarının ışık (8,200 lux beyaz lamba altında 16 saat 25°C fotoperiyotta) ve karanlık şartlarda doku kültürü yoluyla çoğaltılan fidelerinden ekstrakte edilen likopen içeriğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada bitkinin yaprak eksplantları farklı konsantrasyonlarda 2,4-D içeren modifiye MS, WPM ve B5 besi ortamlarında kültüre alınmıştır. Karanlık ve aydınlık ışık uygulamasında kallus oluşumu için optimal şartlar araştırılmış ve büyüme ve likopen birikimi değerlendirilmiştir. Sonuç olarak besiyerleri arasında 2 mg/l 2,4-D destekli WPM besi ortamında kırılğan kallus oluşumunun kültür başlangıcından itibaren 3 hafta sonunda elde edildiği gözlenirken denenen diğer tüm besi ortamlarından kallus oluşumunun ise 5 hafta sonunda elde edildiği bildirilmiştir. Kalluslar her iki haftada bir alt kültüre alınmıştır. Soluk sarı ve yeşil kalluslar likopen içeriğinin değerlendirilmesi için seçilmiştir. HPLC metodu ile yapılan analiz sonucunda ışık şartlarında likopen üretiminin karanlık şartlara oranla daha yüksek seviyede olduğu kallus ve hücre

süspansiyonlarında en iyi büyüme oranının WPM ve B5 besi ortamlarından elde edildiği ve likopen üretiminin hem kallus hem hücre süspansiyon kültürlerinde büyümeye bağlı olduğu rapor edilmiştir.

**Aghaei ve ark. (2013)**, çitlembik bitkisinin (*Pistacia atlantica* Desf. subsp. *kurdica* Rech. f.) kallus başlatılması ve optimizasyonu üzerine farklı BBD ve kombinasyonlarının etkisini araştırmışlardır. Çiçek eksenini eksplant olarak kullanılmış ve 1, 2 ve 3 mg/l TDZ veya 1, 2 ve 3 mg/l BA, 1mg/l oksin (2, 4-D, NAA ve IBA) destekli WPM besi ortamında kültüre alınmıştır. Kallus oluşumunun bütün kültür ortamlarında meydana geldiği, en yüksek kallus oluşumunun (%100) 1mg/l BA yada TDZ ile 1mg/l NAA destekli besi ortamından elde edildiği bildirilmiştir. Ek olarak kallus ve olgunlaşmamış meyvelerde antosiyanin ve total fenolik bileşikler ölçülmüştür. Kallus ve olgunlaşmamış meyvelerin taze ağırlığında antosiyanin içeriğinin sırasıyla,  $9.42 \pm 4.63$  ve  $61.71 \pm 3.81$  mg siyanidin-3-glikozit/g olduğu, total fenolik içeriğinin ise sırasıyla,  $4.91 \pm 0.492$  ve  $5.1 \pm 0.780$  mg gallik asit/g olduğu rapor edilmiştir. Çitlenbiğin kallus ve yapraklarında bulunan uçucu yağ bileşenlerinin GC-MS analizleri sonucunda kalluslarının 8, yapraklarının 13 çeşit bileşen içerdiği, kallus ekstraktlarından elde edilen ana bileşenlerin alfa pinen (89.19%), kampen (1.09%) ve bisiklol heptan, 6,6-dimetil-2-metilen (3.40%) olduğu yaprak eksplantlarından elde edilen ana bileşenlerin ise alfa pinen (15.63%), gama elemen (33.84%) ve karyofilen (9.26%) olduğu belirtilmiştir.

**Fazelzadeh Dezfuli ve ark. (2013)**, kuşkonmaz bitkisinde (*Asparagus officinalis*) *in vitro* kallus başlatılması, dolaylı organojenez ve bitki rejenerasyonunu incelemek amacıyla tamamen tesadüf blokları deneme desenine göre bir deney gerçekleştirmiştir. Çalışmada, kuşkonmazın nodal eksplantlarından fide rejenerasyonu ve kallus indüksiyonu için NAA ve BAP'ın farklı konsantrasyonlarının gerekli olduğunu, 0,5 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP destekli MS besi ortamında maksimum kallus elde edildiği ve bu kallusların eksplant başına 22 tomurcuk ürettiği, farklı konsantrasyonlarda kullanılan 2, 4-D'nin fidelerde kök oluşumunu başlattığı ve en iyi kök oluşumunun ortalama %52'lik köklenme ile 1,25 mg/l 2, 4-D ile destekli MS besi ortamından alındığı bildirilmiştir.

**Sundaram ve ark. (2013)**, *Mucuna pruriens*'in çeşitli sükröz konsantrasyonlarını içeren besi ortamlarında etkin şekilde büyümesinin optimize edildiği çalışmada denenen en yüksek sükröz konsantrasyonu (2.58 g/l) maksimum taze ağırlığın 197 g/l ve maksimum kuru ağırlığın ise 17.34 g/l olduğu bildirilmiştir.

**Ali ve ark. (2014)**, 4 seçkin mısır hattına (Agaiti-85, Golden, Soneri ve Sultan) ait olgun ve olgunlaşmamış embriyoları kullanarak mısır bitkisinde etkili bir rejenerasyon sistemi oluşturmak amacıyla 2 aşamada bir deney gerçekleştirmişlerdir. Karşılaştırmalı analizler sonucunda bütün mısır hatlarına ait olgun ve olgunlaşmamış embriyoların kallus oluşturma ve bitki rejenerasyonu çalışmalarına yanıt verdiği bildirilmiştir. Deneyin her iki aşamasında da besi ortamı olarak Chu's N6 kullanılmıştır. 2,4-D (2 ml/l), Kin, (0.2g/l ) BAP (0.2 g/l) ve IBA (0.3 g/l) destekli besi ortamında kültüre alınan olgunlaşmamış embriyoların etkili bir şekilde kallus ürettiği ve rejenere bitki oluşturduğu, olgun embriyoların etkili bir kallus üretimi ve bitki rejenerasyonu için daha yüksek konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicisine ihtiyaç duyduğu (sırasıyla 5 ml/l, 0.4 g/l, 0.5 g/l, 0.6 g/l), bütün seçkin mısır hatlarında olgunlaşmamış embriyoların rejenerasyon frekansının % 40-75 arasında, olgun embriyoların ise %55-80 arasında değiştiği rapor edilmiştir.

**Karataş ve ark. (2014)**, yaptıkları çalışmada, siyah havuç (*Daucus carota* ssp. sativus var. atrorubens Alef.) bitkisinden oluşturulan kallus kültüründe antosiyanin üretimine bazı uygulamaların etkisini incelemişlerdir. Kallus indüksiyonunu fidelerin hipokotil eksplantlarının 2 mg/l NAA, 0,2 mg/l BAP, 30 g/l sukroz ve 2 g/l phtagel içeren MS besi ortamında kültüre alınmasıyla başlatmışlar ve kallusların antosiyanin üretimini artırmak için farklı konsantrasyonlarda riboflavin ile değişik sürelerde UV-C elisitör olarak kullanmışlardır. Yapılan analizler neticesinde kalluslara uygulanan riboflavin veya UV-C'nin antosiyanin sentezini güçlü bir şekilde arttırdığı ancak hücre büyümesini de önemli ölçüde yavaşlattığı bildirilmiştir.

**Iriawati ve ark. (2014)**, *Eurycoma longifolia* Jack. bitkisinde 2.25 mg/l 2,4-D ve 2.0 mg/l kinetin ile desteklenmiş MS besi ortamında kallus dokuları elde edilmiş ve çoğalan kallus ortamından alınan bir gram kallus, 1.0 veya 2.25 mg/l 2,4-D ve 2.0 mg/l BAP veya 2.0 mg/l kinetin içeren MS sıvı ortamına aktarılmıştır. Histokimyasal testler ve GC-MS analizlerine göre, embriyojenik kallus ve somatik embriyo karışımının, alkaloidler, terpenoidler ve fenoller gibi sekonder metabolitleri üretebileceği sonucuna varılmıştır.

**Koç ve ark., (2014)**, Sakız (*Pistacia lentiscus* L.) bitkisinin *in vitro* rejenerasyonu ve konzervasyonu üzerine yaptıkları bir çalışmada, sitokinin içeren ortamlarda kültürlenmiş tohumlarda kallus oluşumunun meydana geldiğini, ayrıca gerçekleştirdikleri tüm uygulamalarda, yaralanmaya bağlı olarak eksplantların bazal

uçlarında kahverengi kallus oluşumu ve fenolik birikiminin görüldüğünü rapor etmişlerdir.

**Dalila ve ark. (2015)**, hindistan cevizi (*Coccos nucifera* Linn. Matag) 'de *in vitro* mikroçoğaltımın geliştirilmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda 2,4-D'nin etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda eksplantların dört haftalık kültür sonrasında kırılğan, beyaz renkli kalluslar ürettiği, parametreler arasında kallusların başlama sıklığı bakımından farklılıklar gösterdiği, en yüksek kallus oluşumu hormonsuz bazal besi ortamından (%45.71) ve 20 mg/l 2,4-D içeren besi ortamından (%43.75) elde edildiği ve Hindistan cevizinin olgunlaşmamış çiçek salkımlarının kallus başlatılması ve somatik embriyogenez çalışmaları için alternatif bir eksplant kaynağı olduğu rapor edilmiştir.

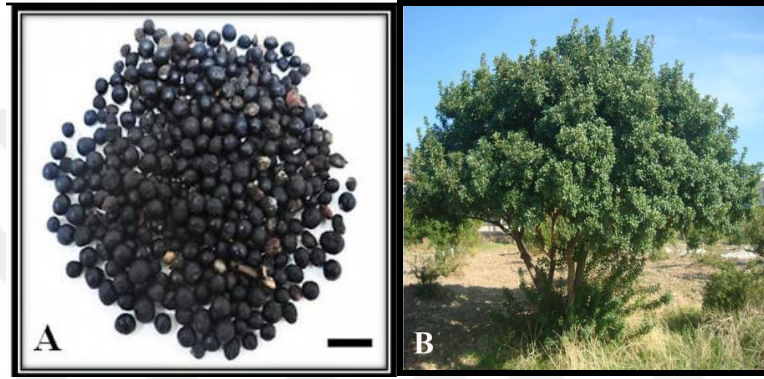
**Zang ve ark. (2016)**, bambu (*Dendrocalamus hamiltonii*) bitkisinin sürgün uçlarını eksplant kaynağı olarak kullanmış ve çeşitli besi ortamı ile kültür şartlarının kallus başlatılması, proliferasyonu, sürgün farklılaşması, kök oluşumu ve bitki transplantasyonu üzerine etkilerini araştırmışlardır. En iyi granüler-kompakt kallus oluşumu 3 mg/l 2,4-D 2 mg/l BA, 500 mg/l glutamin ve 500 mg/l kazein hidrolizat destekli MS besi ortamından elde edilmiştir. 1 mg/l BA 0.3 mg/l kinetin ve 0.3 mg/l NAA destekli MS besi ortamı en yüksek farklılaşmış kallus oranını verdiği, uzun ve kalın kökleri içeren maksimum köklenme oranının ise 3 mg/l IBA destekli 1/2 MS besi ortamından elde edildiği ve akabinde elde edilen fidelerin eşit miktarda turba, vermikülit ve perlit içeren bir karışıma aktarıldıktan sonra hayatta kaldığı belirtilmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma, 2014-2017 yılları arasında Batman Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

#### 3.1. Materyal

Tez çalışmasında kullanılacak olan juvenil sakız ağacı (*Pistacia letiscus* L.) bitkisine ait olgun tohumlar (Şekil 3.1. A, B) başlangıç materyali olarak kullanılmış ve İzmir, Çeşme, Çiftlikköy mevkiinde bulunan ağaçlardan temin edilmiştir. Tohumlar, laboratuvara transfer edildikten sonra kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C da muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Juvenil sakız ağacı (*Pistacia letiscus* L.) bitkisine ait olgun tohumların genel görünümü (A) Çeşme/Çiftlikköy'de bir dişi ağaç (B).

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. *In vitro* kültürlerin başlatılması için ön hazırlıklar

###### 3.2.1.1. Stok solüsyonların hazırlanması

Tez kapsamında sürgün ve kallus kültürlerinin oluşturulması, muhafazası ve optimizasyonunda kullanılan MS (Murashige ve Skoog, 1962) besi ortamının içeriği ile stok solüsyonların hazırlanmasına ve tüm denemelerde kullanılan BBD ve besi ortam içeriklerine ait çizelgeler aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.1, 3.2 ve 3.3).

Çizelge 3.1. MS besi ortamının hazırlanmasında kullanılan stok solüsyonlar ve miktarları (g/l)

MS MakroElementler Ana Solüsyonu	
NH <sub>4</sub> NO	16.5g
KNO <sub>3</sub>	19.0 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4.4 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3.7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.7 g
Steril saf su	1000 cc'ye tamamlanır.

<b>MS Mikro Elementler-1 Ana Solüsyonu</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	62 g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	223 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	86 g
KI	8.3 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub>	2.5 g
Steril saf su	1000 cc'ye tamamlanır.

<b>MS Mikro Elementler-2 Ana Solüsyonu</b>	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2.5 g
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	2.5 g
Steril saf su	100 cc'ye tamamlanır.

<b>Kompleks Kelatör Ana Solüsyonu</b>	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.785 g
Na <sub>2</sub> EDTA	3.725 g
Steril saf su	1000 cc'ye tamamlanır.

<b>Vitamin Karışımı Ana Solüsyonu</b>	
Nikotinik Asit	50 mg
Glisin	2.0 mg
Piridoksin HCl	50 mg
Steril saf su	100 cc'ye tamamlanır.

<b>B1 Vitamini Ana Solüsyonu</b>	
Tiamin HCl	100 mg
Steril saf su	100 cc'ye tamamlanır.

<b>Myo-inositol</b>	
Myo-inositol	10 mg
Steril saf su	1000 cc'ye tamamlanır.

**Çizelge 3.2.** Besi ortamlarına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerinin tip ve çeşitleri.

<b>BAP (6-Benzylaminopürin) Ana Solüsyonu (10<sup>-3</sup>)</b>	
BAP	100 mg
1N NaOH	2-3 ml
Steril saf su	100 ml'ye tamamlanır.

<b>Kin (Kinetin) Ana Solüsyonu (10<sup>-3</sup>)</b>	
Kin	100 mg
1N NaOH	2-3 ml
Steril saf su	100 ml'ye tamamlanır.

<b>2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetik asit) Ana Solüsyonu</b>	
2,4-D	100 mg
1N NaOH	2-3 ml
Steril saf su	100 ml'ye tamamlanır.

<b>IBA (Indol Bütirik Asit) Ana Solüsyonu</b>	
BA	100 mg
%95'lik Etil Alkol	3-5 ml
Steril saf su	100 ml

**Çizelge 3.3.** Standart besi ortamlarının içeriği\* (g<sup>-1</sup>)

Kimyasallar	MS	WPM	SH	Gamborg B5
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	0	0	0
KCl	0	0	0	0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	0	0	134 mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0	0	0	150 mg
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0	0	300	0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650 mg	400 mg	0	0
KNO <sub>3</sub>	1900 mg	0	2500 mg	2500 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Monobasic)	170 mg	168 mg	0	0
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0	460 mg	0	0
MgSO <sub>4</sub>	0	0	0	122 mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370 mg	368 mg	400 mg	250 mg
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440 mg	72 mg	200 mg	150 mg
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	988 mg	0	0
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16,9 mg	16,9 mg	10 mg	10 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6 mg	8,6 mg	1 mg	2 mg
Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25 mg	0,25 mg	0,1 mg	0,25 mg
KI	0,83 mg	0,83 mg	1 mg	0,75 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20 mg	6,20 mg	5 mg	3 mg
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025 mg	0,025 mg	0,1 mg	0,025 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025 mg	0,025 mg	0,2 mg	0,025 mg
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	28 mg	28 mg	20 mg	28 mg
Na <sub>2</sub> EDTA	37 mg	37 mg	15 mg	37 mg
Glycine	2 mg	2 mg	0	0
Nicotinic Acid	0,5 mg	0,5 mg	5 mg	1 mg
Thiamin HCl	0,1 mg	0,1 mg	5 mg	10 mg
Pyridoxine HCl	0,5 mg	0,5 mg	0,5 mg	1 mg
Sukroz	30 gr	30 gr	30 gr	20 gr
Myo-İns.	100 mg	100 mg	1000 mg	100 mg
Agar	7 gr	7 gr	7 gr	7 gr
Ph	5,8	5,8	5,8	5,5

\* Tez çalışmasında kullanılan bütün kimyasallar Sigma Ltd.'den alınmıştır.

### 3.2.1.2. Sterilizasyon işlemleri

#### 3.2.1.2.1. Cam malzemelerin sterilizasyonu

Tez kapsamında kullanılan tüm cam malzemelerin (pipet, erlenmayer kaplar, vb.), ağız kısımları folyo ile kapatılarak 3 saat 180 °C'ye ayarlanmış bir etüvde sterilize edilmiştir.

### **3.2.1.2.2. Kültür kaplarının sterilizasyonu**

Tez kapsamında kullanılan tek kullanımlık ve steril olan petri kapları haricindeki diğer kültür kaplarının (Magenta GA7) sterilizasyon işlemi ise 105kPa basınç altında, 121°C’de 20 dk boyunca bir otoklav içerisinde yapılmıştır. İşlem öncesinde Magenta GA7 kaplarının ağızları kapatılıp otoklav bandı kullanılarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.1.2.3. Pens ve bistürilerin sterilizasyonu**

Kültüre alma ve alt kültürleme işlemlerinde kullanılan pens ve bistüriler öncelikle %70’lik ticari alkol kullanılarak ön sterilizasyon işleminden geçirilip kurutulduktan sonra, 250 °C’ye kadar ısıtılmış bir cam boncuklu sterilizatör (Steri 350 Swiss-Made) içerisinde 10-20 sn bekletilerek sterilize edilmişlerdir.

### **3.2.1.2.4. Transfer odasının hazırlanması ve sterilizasyonu**

Kültüre alma işlemlerinin yapıldığı transfer (röpikaj) odası ve laminar flow kabin iç yüzeyi kullanımdan yarım saat önce %10’luk Benzalkonyum klorür içeren ticari zefiran antiseptik çözeltisi ile akabinde ise %70’lik teknik alkol ile silinmiştir. Odada bulunan bençler yine ticari alkol, zemin ise ticari çamaşır suyu ile silinmiş, hem laminar flow kabin içinde hem de transfer odasında bulunan UV lambası 30 dk kültür işleminden en az 30 dk. önce açık bırakılarak, oda kültüre hazır hale getirilmiştir

### **3.2.1.2.5. Kültür odasının şartları**

Kültürler genellikle bir büyüme odasında  $25 \pm 2$  °C de  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  yoğunluklu 16/8 s fotoperiyot altında büyümeye bırakıldı. Işık kaynağı olarak 3500 lüks ışık şiddetine sahip floresan lambalar (400W MBFR/U, Thorn) kullanıldı.

## **3.2.2. Sürgün kültürlerinin eldesi çalışmaları**

### **3.2.2.1. Olgun tohumların yüzey sterilizasyon işlemleri**

Eksplant kaynağı olarak dişi sakız ağacına ait olgun tohumlar kullanılmıştır. Juvenil sakız tohumlarının yüzey sterilizasyonu Kılınç ve ark., (2015)’nin geliştirmiş olduğu protokol modifiye edilerek kullanıldı. Bu metoda göre; tohumlar %20’lik Sodyum Hipoklorit (NaOCl) Ticari ACE ile 20 dakika boyunca çalkalandı. Daha sonra, tohumlar 5 dakika olacak şekilde 5 defa steril distile su ile çalkalanarak sterilit kalıntılarında arındırıldı.

### **3.2.2.2. *In vitro* sürgün kültürlerinin başlatılması çalışmaları**

Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar, laminar akımlı kabinde steril filtre kâğıdı üzerinde steril pens ve bisturi yardımıyla sert kabuk ve testalarından arındırılarak, 1 mg/l IBA ile destekli MS besin ortamına aktarıldı (Yıldırım 2012, Kılınç ve ark., 2015). Tohumlar besi ortamlarına aktarılmalarının ardından 4 hafta boyunca  $25\pm 2$  °C 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyodu bulunan bitki büyütme odasına transfer edildi.

### **3.2.2.3. Stok sürgün kültürlerinin elde edilmesi**

4 haftalık kültür periyodu sonrasında 1 mg/l IBA destekli MS besi ortamında çimlendirilen bitkicikler, 1 mg/l BAP ve 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> destekli MS besi ortamına aktararak proliferasyon sağlandı (Yıldırım 2012, Kılınç ve ark., 2015). Gelişen sürgünler 4 haftalık kültür periyotları halinde sürekli alt kültürlenerek proliferasyon sağlanarak stok kültürler elde edildi.

### **3.2.3. Kallus kültürlerinin eldesi ve optimizasyonu çalışmaları**

#### **3.2.3.1. Kallus kültürlerinin başlatılması çalışmaları**

Juvenil materyallerden kallus oluşturma çalışmalarında, sürgün kültürlerinden elde edilen kök ve yaprak eksplantları öncelikle farklı oksin (IAA, IBA, NAA, 2,4-D) ve sitokininlerin (BAP, Kin, TDZ, 2-İP) farklı konsantrasyonlarını (0.25, 0.5, 1 ve 2 mg/l) nı içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) besi ortamında, sonrasında ise SH (Shenk ve Hildebrandt, 1972), Gamborg B5 (Gamborg ve ark., 1968) ve WPM (Lloyd & McCown 1980) gibi farklı besi ortamlarında 4 hafta boyunca  $25\pm 2$  °C 16/8 saat fotoperiyot uygulanan bitki büyütme odasında kültüre alındı. 4 hafta sonunda kallusların morfolojik gözlemleriyle birlikte oluşan kallus yüzdeleri ile kallus yaş ve kuru ağırlıklarına (kalluslar daha önceden 40 °C'ye ayarlanmış etüvde bir gün bekletilerek) ait veriler alınarak istatistiksel olarak hesaplandı.

#### **3.2.3.2. Kallus gelişiminin optimizasyonu ve stok kallus kültürlerinin eldesi çalışmaları**

Hem kök hem de yaprak kallus hatlarının gelişimi için aşağıda belirtilen optimizasyon çalışmaları yapıldı. Juvenil eksplantlardan kallus gelişiminin optimizasyonu çalışmaları kapsamında;

1-Farklı besi ortamlarının (MS-SH-Gamborg B5 ve WPM)

2-Farklı besi ortamlarının (MS-SH-Gamborg B5 ve WPM) farklı kuvvetlerinin (0.25-0.5-1-2)

3-Farklı karbon kaynaklarının (glukoz ve sukroz) ve farklı konsantrasyonlarının (15-30-50 gr/l)

4-Farklı pH kuvvetlerinin (4.5-5-5.8-6-7)

5-Farklı ışık yoğunluklarının [20 (karanlık)-40-80  $\mu\text{mol}$ ] ve

6-Farklı sıcaklıkların (10-20-25-30-35  $^{\circ}\text{C}$ )

etkileri ayrı ayrı test edildi. Juvenil kök ve yapraklara ait kalluslar, yukarıdaki denemelere tabi tutulan besi ortamlarında kültüre alınarak 4 hafta boyunca  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  16/8 saat fotoperiyot uygulanan (farklı ışık yoğunluğu ve sıcaklıkların uygulandığı çalışmalar hariç) bitki büyütme odasına transfer edildi. Juvenil (kök ve yaprak) eksplantlar, optimizasyon çalışmalarının ardından en başarılı kallus oluşturma ve geliştirme ortamında kültüre alınarak 4 hafta boyunca  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  16/8 saat fotoperiyot uygulanan bir bitki büyütme odasına transfer edildi. 4 hafta sonunda kallusların morfolojik gözlemleriyle birlikte oluşan kallus yüzdesi (%) ile kallus yaş ve kuru ağırlıklarına ait veriler istatistiksel olarak hesaplandı. Oluşan kalluslardan yine aynı metod kullanılarak alt kültürleme yoluyla juvenil materyale ait stok kallus kültürleri elde edildi.

#### **3.2.3.2.1. Farklı besi ortamlarının etkisi**

Jüvenil kök ve yaprak hatlarına ait kallusların büyüme ve gelişimine farklı besi ortamı çeşitlerinin etkisini belirlemek amacıyla, kalluslar sırasıyla tam kuvvetteki MS-SH-Gamborg B5 ve WPM besi ortamlarında kültüre alındı. 4 haftalık bir kültür periyodu sonrasında kültür gelişimine ait istatistiksel gözlemler rapor edildi.

#### **3.2.3.2.2. Farklı besi ortamlarının farklı kuvvetlerinin etkisi**

Kallus kültürlerinin optimizasyon çalışmalarında, jüvenil kök ve yaprak hatlarına ait kallus kültürlerinin büyümesi ve gelişimi üzerine farklı besi ortamı kuvvetlerinin etkisini belirlemek amacıyla, kalluslar sırasıyla 0.25, 0.5, 1 ve 2 kuvvetteki MS-SH-Gamborg B5 ve WPM besi ortamlarında kültüre alındı. 4 haftalık bir kültür periyodu sonrasında kültür gelişimine ait istatistiksel sonuçlar rapor edildi.

#### **3.2.3.2.3. Farklı karbon kaynaklarının farklı konsantrasyonlarının etkisi**

Kallus kültürlerinin optimizasyonu çalışmalarında, kallusların büyüme ve gelişimlerine farklı karbon kaynaklarının (glikoz ve sukroz) ve bunların farklı konsantrasyonlarının (15, 30 ve 50 mg/l) etkileri test edildi. 28 günlük kültür periyodu sonrasında kallusların gelişimine ait istatistiksel sonuçlar rapor edildi.

#### 3.2.3.2.4. Farklı pH kuvvetlerinin etkisi

Farklı pH derecelerine (sırasıyla pH 4.5, 5.0, 5.8, 6.5 ve 7.0) tabi tutulan juvenil kök ve yaprak hatlarına ait kallusların, 4 haftalık kültür periyodu sonrasında gelişimlerine ait istatistiksel sonuçlar rapor edildi.

#### 3.2.3.2.5. Farklı ışık yoğunluklarının etkisi

Optimizasyon çalışmalarında, kallus kültürlerinin gelişimi üzerine farklı ışık yoğunluklarının etkisinin test edildiği bu çalışmada, kalluslar 20, 40 ve 80  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluklarına tabi tutularak kültüre alındı. 4 haftalık bir kültür periyodu sonrasında, yine gelişimlerine ait istatistiksel sonuçlar rapor edildi.

#### 3.2.3.2.6. Farklı sıcaklıkların etkisi

Jüvenil kök ve yaprak hatlarına ait kalluslar farklı sıcaklık değerlerine ayarlanmış büyüme ortamlarında (10, 20, 25, 30 ve 35 °C') kültüre alındı. 4 haftalık bir kültür periyodu sonrasında kültür gelişimine ait gözlemler alınarak, sonuçlar istatistiksel analize tabi tutuldu.

#### 3.2.3.3. Juvenil (kök ve yaprak) kallus kültürlerinde büyümenin karakterizasyonu

Juvenil kök ve yaprak materyallerinden elde edilen kallusların büyümelerinin karakterizasyonu çalışmalarında, optimize edilmiş besin ortamı ve şartlarda kültüre alınan kalluslar, 4 hafta boyunca 25±2 °C 16/8 saat fotoperiyot uygulanan bitki büyütme odasında kültüre alındı. 1. gün ve 28. günlerde kallusların yaş ağırlıkları tartılarak, 28. gün sonunda kuru ağırlıklar istatistiksel olarak hesaplandı ve kallusların büyümelerinin ifadesi olarak rapor edildi.

**Kallus (%):** Kültürlerin 4. hafta sonunda, kallus oluşturan eksplantların kültürdeki tüm eksplantların sayısına oranı hesaplanarak yüzde olarak ifade edildi.

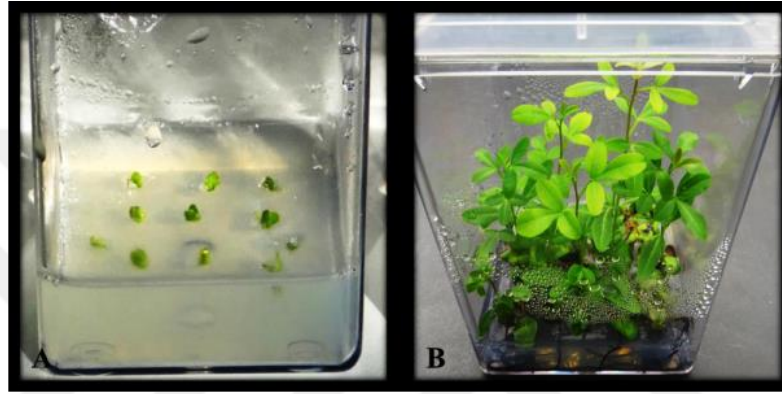
**Ortalama Kallus Taze Ağırlığı:** Kültürden 4 hafta sonra her bir yaprak veya kökten gelişen kallusların ağırlıklarının toplamı, kallus oluşturan eksplantlara oranı olarak ifade edildi.

**Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı:** Taze ağırlığı ölçülen kallusların, sıcaklığı önceden 40 °C'ye ayarlanmış etüvde 16 saat bekletilen kallusların ağırlıklarının toplamı, kallus oluşturan eksplantlara oranı olarak ifade edildi. Ayrıca tüm stok kültürlerin elde edilmesinde ve gerçekleştirilen tüm deneylerde, in vitro gelişen kültürlere ait morfolojik gözlemler de alınarak çizelgelerde sunuldu.

#### 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

##### 4.1. Sürgün Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular ve Tartışma

Dış kabukları kırıldıktan sonra mezokarplarından uzaklaştırılan olgun *P. lentiscus* L. tohumları, %20'lik Sodyum Hipoklorit (NaOCl) Ticari ACE ile 20 dk çalkalandı. Sterilant kalıntılarından arındırmak için tohumlar 5'er kez 5 dk. steril distile su ile çalkalanarak 1 mg/l IBA destekli MS besi ortamına ekilerek çimlendirilmesi sağlandı (Şekil 4.1.A). 4 haftalık çimlenme periyodu sonunda tohumlardan gelişmiş fideler görülmektedir (Şekil 4.1.B).



Şekil 4.1. 1 mg/l IBA içeren MS besi ortamında kültüre alınmış *P. lentiscus* L. tohumları, Bar: 1 cm cm (A), 28 günlük kültür periyodu sonunda çimlenen *P. lentiscus* L. tohumları, Bar : 1 cm. (B)

Aksenik apikal ve nodal sürgünlerin proliferasyonu ise, 1 mg/l BAP ve 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> ile destekli MS besi ortamında gerçekleştirildi. Bu ortamda 4 haftalık kültür sonucunda, sağlıklı, iyi çoğalmış gövdelere sahip stok kültürler elde edildi. Elde edilen gövdelerden alınan sürgünler, yine aynı besi ortamında çoğaltılarak stok kültürlerin muhafazası sağlandı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Sakız tohumlarının çimlendirilmesi sonrası alınan eksplantların 1 mg/l BAP ve 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> destekli MS besi ortamında 4 haftalık kültür süresi sonundaki durumu.

Bu tez kapsamında nihai amaç sakız ağacının aksenik kök ve yapraklarından kallus kültürlerinin başlatılması ve optimizasyonu olduğundan bu aşamada önce, Kılınc ve ark., (2015) ve Yıldırım (2012)'nin geliştirmiş oldukları protokoller modifiye edilerek sürgün kültürü işlemleri başarılı bir şekilde gerçekleştirildi.

## **4.2. Kallus Kültürlerinin Başlatılması ve Optimizasyonu Çalışmalarına Ait Bulgular ve Tartışma**

### **4.2.1. Kallus kültürlerinin başlatılması çalışmalarına ait bulgular**

Juvenil kök ve yaprak eksplantları kullanılarak BAP, Kin, TDZ ve 2-İP'nin farklı konsantrasyonlarının (0.25-0.5-1-2 mg/l), IAA, IBA, NAA ve 2,4-D'nin farklı konsantrasyonları (0.25-0.5-1-2 mg/l) ile olan kombinasyonlarının test edildiği deneylere ait sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek, her bir sitokin için ayrı ayrı olacak şekilde tablolar halinde hazırlanarak kök için **Çizelge 4.1; Çizelge 4.3; Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.7'** te ve yaprak için **Çizelge 4.2; Çizelge 4.4; Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.8'** te sunulmuştur.

**Çizelge 4.1** irdelendiğinde, kök eksplantlarından [(0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l IAA, IBA, NAA ve 2,4-D), (0.25 mg/l BAP ile 0.5 mg/l IAA, IBA ve 2,4-D), (0.25 mg/l BAP ile 1 mg/l IAA), (0.25 mg/l BAP ile 2 mg/l 2,4-D), (0.5 mg/l BAP ile 0.25 mg/l IAA, IBA), (0.5 mg/l BAP ile 2 mg/l IAA, IBA, NAA ve 2,4-D), (1 mg/l BAP ile 0.25 mg/l IAA, IBA ve 2,4-D), (1 mg/l BAP ile 2 mg/l IAA, IBA, NAA ve 2,4-D), (2 mg/l BAP ile 0.25 ve 0.50 mg/l 2,4-D)] kombinasyonları ile desteklenmiş MS besi ortamında kallus oluşumu genelde gözlenmezken, en yüksek kallus oluşumu %96 ile 0.25 mg/l BAP ve 2 mg/l IBA kombinasyonu destekli MS besi ortamından elde edilmiştir. En düşük kallus oluşumu %4 oranında (0.25 mg/l BAP ile 1 veya 2 mg/l NAA kombinasyonu ve 1 mg/l BAP ile 0.25 veya 0.5 mg/l NAA kombinasyonu ile desteklenmiş MS besi ortamından elde edilmiştir. En yüksek kallus oluşumunun gözlendiği 0.25 mg/l BAP ve 2 mg/l IBA destekli MS besi ortamında kallus yaş ve kuru ağırlığı sırasıyla;  $40.00 \pm 0.50$ ,  $3.90 \pm 0.70$  olarak hesaplanmıştır. Genel olarak kallus morfolojileri irdelendiğinde 2,4-D destekli kombinasyonlarda yumuşak ve sarımsı kalluslar elde edilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Juvenil kök eksplantları kullanılarak BAP'ın farklı konsantrasyonları (0.25-0.5-1.-2 mg/l) ile oksinlerin (IAA, IBA, NAA, 2.4 D) farklı konsantrasyonlarının (0.25-0.5-1.-2 mg/l) kombinasyonlarının kallus oluşumuna etkisi

Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kombinasyonu (mg/l)	Kallus (%)	Ortalama Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi	
<b>0.25 BAP</b>	<b>0.25 IAA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>0.25 IBA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>0.25 NAA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>0.25 2.4-D</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
<b>0.25 BAP</b>	<b>0.5 IAA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>0.5 IBA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>0.5 NAA</b>	8.00g	30.00±5.00d	2.50±0.50 c	Sadece Kök Uçlarında Kahverengi Sert Kallus
	<b>0.5 2.4-D</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
<b>0.25 BAP</b>	<b>1 IAA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>1 IBA</b>	12.00fg	12.00±2.30h	1.20±0.23g	Açık Yeşil-Sert
	<b>1 NAA</b>	4.00h	20.00±0.00e	2.00±0.00cd	Kök Uçlarında Kahverengi Sert Kallus
	<b>1 2.4-D</b>	28.00de	60.00±1.50b	6.00±0.15b	Boğumlanma Şeklinde- Kahverengi-Sert
<b>0.25 BAP</b>	<b>2 IAA</b>	8.00g	40.00±2.50c	3.75±0.25b	Kahverengi-Sert
	<b>2 IBA</b>	96.00a	40.00±0.50c	3.90±0.70b	Açık Yeşil-Sert
	<b>2 NAA</b>	4.00h	6.00±0.00ı	0.50±0.00j	Boğumlanma Kahverengi Sert Kallus
	<b>2 2.4-D</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
<b>0.5 BAP</b>	<b>0.25 IAA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>0.25 IBA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>0.25 NAA</b>	16.00f	4.20±0.10j	0.30±0.02j	Kahverengi-Sert
	<b>0.25 2.4-D</b>	8.00g	3.10±0.10k	0.20±0.01k	Kahverengi-Az sert
<b>0.5 BAP</b>	<b>0.5 IAA</b>	4.00h	40.00±0.15c	0.40±0.01j	Koyu Yeşil-Yumuşak
	<b>0.5 IBA</b>	12.00fg	10.00±0.95h	0.93±0.18gh	Yeşil-Yumuşak
	<b>0.5 NAA</b>	20.00e	10.00±0.29h	0.97±0.02gh	Kararmalar-Yumuşak
	<b>0.5 2.4-D</b>	48.00c	22.00±0.48e	1.21±0.04g	Açık sarı yumuşak
<b>0.5 BAP</b>	<b>1 IAA</b>	8.00g	10.00±0.33h	1.02±0.03gh	Koyu Yeşil-Yumuşak
	<b>1 IBA</b>	16.00f	25.00±0.44de	2.50±0.04c	Yeşil-Yumuşak
	<b>1 NAA</b>	36.00d	70.00±1.00a	7.02±0.09a	Sarı-kahve. sert
	<b>1 2.4-D</b>	52.00b	21.00±0.31e	2.10±0.30c	Açık Sarı - Dağılgan
<b>0.5 BAP</b>	<b>2 IAA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>2 IBA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>2 NAA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>2 2.4-D</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
<b>1 BAP</b>	<b>0.25 IAA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>0.25 IBA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>0.25 NAA</b>	4.00h	10.20±0.10h	0.08±0.01ıı	Kahverengi-Sert
	<b>0.25 2.4-D</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
<b>1 BAP</b>	<b>0.5 IAA</b>	4.00h	10.00±0.39h	0.99±0.03gh	Koyu Yeşil-Yumuşak
	<b>0.5 IBA</b>	12.00fg	15.00±0.45f	1.50±0.04f	Yeşil-Yumuşak
	<b>0.5 NAA</b>	4.00h	5.00±0.13ı	0.49±0.04j	Koyu Kahverengi-Sert
	<b>0.5 2.4-D</b>	20.00e	18.00±0.46e	1.80±0.45d	Açık Yeşil-Granüler
<b>1 BAP</b>	<b>1 IAA</b>	8.00g	10.00±0.27	1.01±0.02gh	Koyu Yeşil-Yumuşak
	<b>1 IBA</b>	32.00d	15.00±0.48f	1.51±0.04f	Yeşil-Yumuşak
	<b>1 NAA</b>	32.00d	15.00±0.19f	1.50±0.05f	Kararmalar-Yumuşak
	<b>1 2.4-D</b>	52.00b	18.00±0.55e	1.89±0.03d	Açık Sarı - Dağılgan

Çizelge 4.1. Devamı..

Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kombinasyonu (mg/l)	Kallus (%)	Ortalama Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi	
1 BAP	2 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 NAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 2.4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
2 BAP	0.25 IAA	40.00cd	19.50±0.10e	1.10±0.01g	Kararmalar-Yumuşak
	0.25 IBA	32.00d	20.00±0.60e	2.20±0.06cd	Açık Yeşil-Granüler
	0.25 NAA	20.00e	10.50±1.00h	1.16±0.10g	Açık Yeşil-Granüler
	0.25 2.4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
2 BAP	0.50 IAA	32.00d	16.00±1.15f	1.76±0.11ed	Kararmalar-Yumuşak
	0.50 IBA	32.00d	1.30±0.17l	0.81±0.02h	Açık Yeşil-Granüler
	0.50 NAA	32.00d	10.00±1.15h	1.10±0.16g	Koyu Yeşil-Yumuşak
	0.50 2.4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
2 BAP	1 IAA	20.00e	19.00±1.00e	2.09±0.10cd	Koyu Yeşil-Yumuşak
	1 IBA	32.00d	16.60±1.15f	1.83±0.12d	Koyu Yeşil-Yumuşak
	1 NAA	40.00cd	18.50±0.64e	0.94±0.06gh	Kararmalar-Yumuşak
	1 2.4-D	20.00e	12.50±1.00g	1.38±0.10g	Açık Yeşil-Granüler
2 BAP	2 IAA	20.00e	14.00±0.00fg	1.54±0.00f	Açık Yeşil-Granüler
	2 IBA	20.00e	12.50±0.50g	0.50±0.05ı	Koyu Yeşil-Yumuşak
	2 NAA	12.00fg	12.00±0.00g	1.32±0.00g	Koyu Yeşil-Yumuşak
	2 2.4-D	52.00b	17.40±0.20e	0.80±0.02h	Sarı-Az Yumuşak
$X^2(df;63)$	p≤0.05				

Veriler kültürün 1. ve 28. günü 25 eksplantın ortalamasını göstermektedir. Bir kolondaki farklı harfler işlemin Duncan çoklu karşılaştırma testine göre P≤0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 4.2.** irdelendiğinde, yaprak eksplantlarından [(0.25 mg/l BAP' ın 0.25 mg/l IBA, NAA ve 2,4-D), (0.25 mg/l BAP' ın 0.5 mg/l IAA, IBA, ve 2,4-D), (0.25 mg/l BAP' ın 2 mg/l IAA), (0.5 mg/l BAP' ın 1 mg/l IAA, NAA), (0.5 mg/l BAP' ın 2 mg/l 2,4-D), (1 mg/l BAP' ın 0.25 mg/l IBA, 2,4-D), (1 mg/l BAP' ın 0.5 mg/l IAA, NAA, 2,4-D), (1 mg/l BAP' ın 2 mg/l IAA, IBA, NAA, 2,4-D), (2 mg/l BAP' ın 0.25 mg/l IAA, 2,4-D), (2 mg/l BAP' ın 1 mg/l IAA),] destekli MS besi ortamında kallus oluşumu genelde gözlenmezken, en yüksek kallus oluşumu %80 ile 2 mg/l BAP 0.5 mg/l 2,4-D kombinasyonu destekli MS besi ortamında hesaplanırken, en düşük kallus oluşumu %4 ile [(0.25 mg/l BAP ile 1 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l NAA; kombinasyonu), destekli MS besi ortamında hesaplanmıştır. Belirtilen besi ortamlarında kallus yaş ve kuru ağırlıkları sırasıyla; 20.60±0.10, 3.90±0.70; 12.00±0.00, 3.00±0.00; 6.00±0.00, 0.60±0.00mg olarak hesaplanmıştır. Genel olarak kallus morfolojileri irdelendiğinde BAP'ın 2,4-D destekli kombinasyonlarda yumuşak ve sarımsı kalluslar elde edilirken, BAP'ın IAA, IBA ve NAA'lı kombinasyonlarda genelde yeşil ve sert kalluslar elde edilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Juvenil yaprak eksplantları kullanılarak BAP'ın farklı konsantrasyonları (0.25-0.5-1.-2 mg/l) ile oksinlerin (IAA, IBA, NAA, 2,4 D) farklı konsantrasyonlarının (0.25-0.5-1.-2 mg/l) kombinasyonlarının kallus oluşumuna etkisi .

Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kombinasyonu (mg/l)	Kallus (%)	Ortalama Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi	
<b>0.25 BAP</b>	<b>0.25 IAA</b>	36.00g	30.00±1.10f	3.00±0.10d	Yeşil. Sert, Yaprak Kenarlarında Kıvrılmalar
	<b>0.25 IBA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>0.25 NAA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>0.25 2.4-D</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
<b>0.25 BAP</b>	<b>0.50 IAA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>0.50 IBA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>0.50 NAA</b>	16.00j	12.00±0.90j	1.20±0.08g	Açık Yeşil – Sert
	<b>0.50 2.4-D</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
<b>0.25 BAP</b>	<b>1 IAA</b>	24.00hı	20.00±1.30gh	2.00±0.13e	Petiyol ucunda. Sert. Kahverengi
	<b>1 IBA</b>	40.00f	70.00±1.20a	6.90±0.11a	Açık Yeşil. Sert
	<b>1 NAA</b>	24.00hı	10.00±1.20j	1.00±0.10g	Açık Yeşil. Sert
	<b>1 2.4-D</b>	4.00m	12.00±0.00d	3.00±0.00d	Açık Yeşil. Sert
<b>0.25 BAP</b>	<b>2 IAA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>2 IBA</b>	76.00b	55.00±1.45c	5.20±0.14c	Açık Yeşil, Sert
	<b>2 NAA</b>	4.00m	6.00±0.00k	0.60±0.00	Kararma ve Yanma
	<b>2 2.4-D</b>	12.00k	9.00±2.00j	0.90±0.11g	Kahverengi, Dağılgan
<b>0.50 BAP</b>	<b>0.25 IAA</b>	20.00ı	18.10±4.15g	2.00±0.10e	Kahverengi-Sert gelişim durmuş
	<b>0.25 IBA</b>	20.00ı	23.20±2.20g	2.11±0.30e	Kahverengi Siyah-Sert gelişim çoğunda durmuş
	<b>0.25 NAA</b>	24.00hı	35.25±6.15ef	3.72±0.21d	Kahverengi-Sert
	<b>0.25 2.4-D</b>	44.00f	61.50±1.50b	6.91±0.10a	Sarı-Az Sert
<b>0.50 BAP</b>	<b>0.50 IAA</b>	72.00c	19.00±2.03gh	1.97±0.17ef	Koyu Yeşil, Yosuna Benzer, Sert Yapılı
	<b>0.50 IBA</b>	32.00g	29.00±2.08f	2.27±0.16e	Koyu Yeşil, Yosuna Benzer, Sert Yapılı
	<b>0.50 NAA</b>	28.00h	23.00±3.90g	2.04±0.42e	Koyu Kahve, Sert Yapılı
	<b>0.50 2.4-D</b>	24.00hı	21.00±3.89g	2.73±0.31de	Yeşil, Sert
<b>0.50 BAP</b>	<b>1 IAA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>1 IBA</b>	12.00k	30.00±4.76ef	2.89±0.50de	Koyu yeşil, sert yapılı
	<b>1 NAA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>1 2.4-D</b>	60.00d	51.00±4.62c	5.21±0.25c	Açık Sarı - Dağılgan
<b>0.50 BAP</b>	<b>2 IAA</b>	8.00ı	15.00±1.00ı	1.10±0.05g	Siyah-Sert gelişim tamamen durmuş
	<b>2 IBA</b>	16.00j	68.20±2.10a	6.54±0.20b	Yeşil, sert gelişimleri iyi
	<b>2 NAA</b>	12.00k	35.80±3.50	4.20±0.10d	Kahverengi, ortası sarı, sert gelişim normal
	<b>2 2.4-D</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
<b>1 BAP</b>	<b>0.25 IAA</b>	16.00j	12.15±1.10j	1.52±0.10f	Kahverengi, sert gelişim durmuş
	<b>0.25 IBA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>0.25 NAA</b>	24.00hı	35.25±3.20e	3.32±0.10de	Siyah, sert gelişim tamamen durmuş
	<b>0.25 2.4-D</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
<b>1 BAP</b>	<b>0.50 IAA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>0.50 IBA</b>	20.00ı	30.00±3.66fe	3.80±0.34d	Koyu yeşil-Sert Yapılı
	<b>0.50 NAA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>0.50 2.4-D</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
<b>1 BAP</b>	<b>1 IAA</b>	8.00ı	10.00±1.76j	0.80±0.16g	Koyu Yeşil-Yumuşak
	<b>1 IBA</b>	48.00ef	22.00±2.47g	1.92±0.37 ef	Koyu Yeşil-Yumuşak
	<b>1 NAA</b>	44.00f	19.00±3.83g	0.91±0.46g	Kalluslarda Kararmalar-Yumuşak
	<b>1 2.4-D</b>	60.00d	52.00±5.36c	6.68±0.32ab	Açık Sarı - Dağılgan

Çizelge 4.2. Devamı..

Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kombinasyonu (mg/l)	Kallus (%)	Ortalama Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi	
1 BAP	2 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 NAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 2,4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
2 BAP	0.25 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.25 IBA	40.00f	20.80±0.20g	2.28±0.02	Koyu Yeşil-Yumuşak
	0.25 NAA	32.00g	20.30±0.18g	2.23±0.02	Siyah, sert gelişim tamamen durmuş
	0.25 2,4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
2 BAP	0.50 IAA	40.00f	18.00±0.50h	0.69±0.05h	Koyu Yeşil-Yumuşak
	0.50 IBA	40.00f	18.10±0.40h	2.00±0.05e	Koyu Yeşil-Yumuşak
	0.50 NAA	40.00f	20.35±0.50g	2.00±0.05e	Açık Yeşil-Yumuşak
	0.50 2,4-D	80.00a	20.60±0.10g	2.18±0.01e	Koyu Yeşil-Az Sert
2 BAP	1 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	1 IBA	32.00g	21.10±0.12g	2.32±0.02e	Kahverengi-Sert
	1 NAA	60.00d	5.50±0.30k	0.61±0.03h	Açık Yeşil-Granüler
	1 2,4-D	40.00f	9.90±0.25j	1.00±0.03g	Koyu Sarı-Az Yumuşak
2 BAP	2 IAA	20.00ı	14.70±0.20ı	1.60±0.02hg	Kahverengi-Sert
	2 IBA	12.00k	14.80±0.00ı	1.63±0.00hg	Açık Yeşil-Granüler
	2 NAA	12.00k	14.90±0.00ı	1.64±0.00hg	Açık Yeşil-Granüler
	2 2,4-D	30.00g	15.50±0.30ı	1.71±0.03hg	Koyu Sarı-Az Yumuşak

 $X^2(df;63)$  $p \leq 0.05$ 

Veriler kültürün 1. ve 28. günü 25 eksplantın ortalamasını göstermektedir. Bir kolondaki farklı harfler işlemin Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 4.3** irdelendiğinde, kök eksplantlarından kallus oluşumu [(0.25 mg/l Kin'in 0.25 mg/l IAA, IBA, NAA ve 2,4-D), [(0.25 mg/l Kin'in 0.5 mg/l IAA, IBA ve 2,4-D), (0.25 mg/l Kin'in 1 mg/l NAA ve 2,4-D) (0.25 mg/l Kin'in 2 mg/l IAA, IBA ve 2,4-D), (0.5 mg/l Kin'in 0.25 mg/l IAA ve IBA), (0.5 mg/l Kin'in 2 mg/l IAA), (1 mg/l Kin'in 0.25 mg/l IAA, IBA, NAA ve 2,4-D), (1 mg/l Kin'in 2 mg/l IAA, IBA ve 2,4-D), (2 mg/l Kin'in 0.25 mg/l IAA), (2 mg/l Kin'in 0.5-1 ve 2 mg/l IAA, IBA, NAA ve 2,4-D) kombinasyonları] destekli MS besisi ortamında kallus oluşumu gözlenmezken, en yüksek kallus oluşumu %80 ile 1 mg/l Kin ile 1 mg/l 2,4-D kombinasyonu destekli MS besisi ortamında hesaplanırken, en düşük kallus oluşumu %4 ile [(0.5 mg/l Kin ile 0.5 ve 1 mg/l IAA kombinasyonu)] destekli MS besisi ortamında hesaplanmıştır. Belirtilen besisi ortamlarında kallus yaş ve kuru ağırlıkları sırasıyla; 18.00±0.43, 1.76±0.03; 10.00±0.54, 1.00±0.05; 4.00±0.12, 0.39±0.05 mg olarak hesaplanmıştır. En yüksek kallus yüzdesinin elde edildiği Kin'nin 2,4-D destekli kombinasyonlarda yumuşak ve sarımsı kalluslar elde edilmiştir. Bununla birlikte, Kin'nin diğer oksinlerle olan kombinasyonlarından da dağılgan ve az dağılgan kalluslar elde edilmiş ise de Kin'nin 2,4-D kombinasyonlarında daha uygun tekstürde kallus oluşumu elde edilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Juvenil kök eksplantları kullanılarak Kin'in farklı konsantrasyonları (0.25-0.5-1.-2 mg/l) ile oksinlerin (IAA, IBA, NAA, 2.4 D) farklı konsantrasyonlarının (0.25-0.5-1.-2 mg/l) kombinasyonlarının kallus oluşumuna etkisi.

Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kombinasyonu (mg/l)	Kallus (%)	Ortalama Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi	
<b>0.25 Kin</b>	0.25 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.25 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.25 NAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.25 2.4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
<b>0.25 Kin</b>	0.50 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.50 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.50 NAA	12.00j	34.20±1.40bc	3.74±0.08c	Yeşil-Yumuşak
	0.50 2.4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
<b>0.25 Kin</b>	1 IAA	12.00j	35.00±1.52b	3.85±0.24c	Koyu Yeşil-Yumuşak
	1 IBA	20.00g	22.00±1.40fg	2.40±0.18g	Yeşil-Yumuşak
	1 NAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	1 2.4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
<b>0.25 Kin</b>	2 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 NAA	20.00g	20.00±0.45g	2.20±0.12ı	Yeşil-Yumuşak
	2 2.4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
<b>0.50 Kin</b>	0.25 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.25 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.25 NAA	52.00c	32.00±1.80c	1.54±0.10k	Yeşil-Yumuşak
	0.25 2.4-D	32.00e	22.00±0.52g	1.76±0.04j	Kararmalar-Yumuşak
<b>0.50 Kin</b>	0.5 IAA	4.00k	10.00±0.54ı	1.00±0.05n	Koyu Yeşil-Yumuşak
	0.5 IBA	16.00h	15.00±0.50h	1.51±0.05l	Yeşil-Yumuşak
	0.5 NAA	12.00	15.00±0.43h	1.51±0.04l	Kararmalar-Yumuşak
	0.5 2.4-D	16.00h	12.00±0.26	1.21±0.02m	Açık Yeşil-Granüler
<b>0.50 Kin</b>	1 IAA	4.00k	4.00±0.12l	0.39±0.05	Koyu Yeşil – Gevrek
	1 IBA	16.00h	35.00±0.44b	3.50±0.04d	Koyu Yeşil-Sert
	1 NAA	28.00f	40.00±0.25a	4.01±0.03a	Sarı- Yumuşak
	1 2.4-D	48.00c	25.00±0.40f	2.46±0.03	Açık Sarı-Beyaz yumuşak, Dağılgan
<b>0.50 Kin</b>	2 IAA	-	-	-	Yeşil-Yumuşak
	2 IBA	12.00	19.00±0.40g	2.09±0.04ı	Kararmalar-Yumuşak
	2 NAA	20.00	20.00±1.20g	2.21±0.06h	Koyu Yeşil-Yumuşak
	2 2.4-D	12.00	42.00±2.40a	4.62±0.08a	Açık- Az Yumuşak
<b>1 Kin</b>	0.25 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.25 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.25 NAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.25 2.4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
<b>1 Kin</b>	0.5 IAA	8.00j	25.00±0.18e	2.47±0.02g	Koyu Yeşil – Gevrek
	0.5 IBA	28.00f	40.00±0.52a	4.02±0.05a	Koyu Yeşil-Sert
	0.5 NAA	16.00h	40.00±0.58a	4.00±0.04a	Yeşil-Sert
	0.5 2.4-D	60.00b	12.00±0.21ı	1.20±0.02n	Kirli Beyaz-Granüler
<b>1 Kin</b>	1 IAA	12.00	20.00±0.78g	1.99±0.05ij	Koyu Yeşil – Sert
	1 IBA	28.00f	25.00±0.43e	2.50±0.01f	Koyu Yeşil-Sert
	1 NAA	8.00j	5.00±0.15k	0.50±0.01o	Açık Yeşil-Orta Sert
	1 2.4-D	80.00a	18.00±0.43h	1.76±0.03j	Sarı-Yumuşak Dağılgan
<b>1 Kin</b>	2 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 NAA	40.00d	19.00±0.44g	2.09±0.04ı	Koyu Yeşil-Sert
	2 2.4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok

Çizelge 4.3. Devamı..

Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kombinasyonu (mg/l)	Kallus (%)	Ortalama Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi
2 Kin	0.25 IAA	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.25 IBA	12.00 <sub>1</sub>	29.00±0.68 <sub>d</sub>	Koyu Yeşil-Sert
	0.25 NAA	12.00 <sub>1</sub>	25.00±1.10 <sub>f</sub>	Açık Yeşil-Orta Sert
	0.25 2,4-D	20.00 <sub>g</sub>	10.00±0.50 <sub>1</sub>	Koyu Sarı-Yumuşak
2 Kin	0.50 IAA	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.50 IBA	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.50 NAA	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.50 2,4-D	-	-	Kallus Oluşumu Yok
2 Kin	1 IAA	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	1 IBA	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	1 NAA	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	1 2,4-D	-	-	Kallus Oluşumu Yok
2 Kin	2 IAA	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 IBA	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 NAA	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 2,4-D	-	-	Kallus Oluşumu Yok
$X^2(df;63)$	$p \leq 0.05$			

Veriler kültürün 1. ve 28. günü 25 eksplantın ortalamasını göstermektedir. Bir kolondaki farklı harfler işlemin Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 4.4** irdelendiğinde, yaprak eksplantlarından kallus oluşumu, kök eksplantlarına göre aynı sitokinin oksinlerle kombinasyonları kapsamında kallus oluşumunda daha başarılı olduğu, ancak [(0.25 mg/l Kin'in 0.25 mg/l IAA, 2,4-D; 1,2 mg/l 2,4-D; 2 mg/l IBA), (0.5 mg/l Kin'in 0.25, 0.5 mg/l IBA; 0.5, 1 mg/l NAA; 2 mg/l 2,4-D), (1 mg/l Kin'in 0.25 mg/l IAA; 2 mg/l NAA; 2 mg/l 2,4-D), (2 Kin'in 1 mg/l IBA) kombinasyonları ] destekli MS besi ortamında kallus oluşumu gözlenmezken, en yüksek kallus oluşumu %100 ile [(0.5 mg/l Kin ile 2 mg/l IAA), (2 mg/l Kin ile 0.25 mg/l IAA; 2,4-D), (2 mg/l Kin ile 1 mg/l IAA; 2,4-D)] destekli MS besi ortamında hesaplanırken, en düşük kallus oluşumu %4 ile [(1 mg/l Kin'in 1 mg/l IAA)] destekli MS besi ortamında hesaplanmıştır. Belirtilen besi ortamlarında kallus yaş ve kuru ağırlıkları sırasıyla; 84.00±2.40, 9.26±1.45; 36.00±6.42, 3.51±0.42; 36.00±6.42, 3.51±0.42; 60.00±8.45, 6.60±0.45; 69.00±2.25, 6.11±1.14; 82.00±2.85, 7.51±1.24; 15.00±0.69, 1.51±0.12 mg olarak hesaplanmıştır. Bununla birlikte kök eksplantlarına göre yaprak eksplantlarında, 2,4-D kombinasyonlu dışındaki Kin'nin diğer oksin kombinasyonlarında sert ve yeşil tekstürlü kallus gözlenirken, Kin 2,4-D kombinasyonlarında genelde sarımsı ve yumuşak dağılgan kallus gözlenmiştir.

**Çizelge 4.4.** Juvenil yaprak eksplantları kullanılarak Kin'in farklı konsantrasyonları (0.25-0.5-1-2 mg/l) ile oksinlerin (IAA, IBA, NAA, 2.4 D) farklı konsantrasyonlarının (0.25-0.5-1-2 mg/l) kombinasyonlarının kallus oluşumuna etkisi.

Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kombinasyonu (mg/l)		Kallus (%)	Ortalama Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi
0.25 Kin	0.25 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.25 IBA	60.00d	52.00±1.22f	4.80±1.45gh	Açık yeşil.sert
	0.25 NAA	52.00e	61.00±1.85e	5.82±1.24ef	Açık yeşil.sert
	0.25 2.4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
0.25 Kin	0.50 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.50 IBA	52.00e	84.00±1.42b	9.20±1.24a	Açık yeşil.sert
	0.50 NAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.50 2.4-D	60.00d	82.00±1.80bc	7.42±1.23cd	Koyu yeşil. sert
0.25 Kin	1 IAA	72.00c	82.00±2.40bc	9.12±0.92a	Açık yeşil.sert
	1 IBA	70.00c	84.00±4.42b	9.62±0.72a	Açık yeşil.sert
	1 NAA	52.00e	64.00±2.42e	7.09±0.84c	Açık yeşil.sert
	1 2.4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
0.25 Kin	2 IAA	40.00f	30.00±1.22gh	4.14±0.54g	Koyu yeşil. sert
	2 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 NAA	52.00e	92.00±2.80a	9.25±4.45a	Koyu yeşil. sert
	2 2.4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
0.50 Kin	0.25 IAA	12.00j	47.00±1.90fg	5.24±1.36ef	Koyu yeşil. sert
	0.25 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.25 NAA	60.00d	91.00±0.40a	8.22±1.45bc	Koyu yeşil. sert
	0.25 2.4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
0.50 Kin	0.5 IAA	8.00k	50.00±1.92f	6.47±0.59cd	Koyu yeşil. sert
	0.5 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.5 NAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.5 2.4-D	8.00k	49.00±4.61f	4.53±0.25fg	Beyaz renk,sert yapılı
0.50 Kin	1 IAA	24.00i	32.00±1.59gh	3.40±0.30h	Açık yeşil.sert
	1 IBA	24.00i	61.00±1.80e	6.05±0.18cd	Yeşil.sert
	1 NAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	1 2.4-D	56.00e	80.00±2.60b	8.01±0.44b	Açık sarı, Yumuşak, Dağılgan
0.50 Kin	2 IAA	100.00a	84.00±2.40b	9.26±1.45a	Açık yeşil.sert
	2 IBA	20.00i	46.00±1.20fg	5.22±1.36fg	Yeşil,sert
	2 NAA	32.00g	63.00±2.05e	7.44±0.45c	Açık yeşil,sert
	2 2.4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
1 Kin	0.25 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.25 IBA	40.00f	61.00±1.25e	6.47±1.55cd	Açık Yeşil-Gevrek
	0.25 NAA	80.00b	66.00±1.82d	7.24±1.28bc	Açık Yeşil-Gevrek
	0.25 2.4-D	52.00	87.00±5.20b	9.21±0.42a	Açık Sarı-Yumuşak
1 Kin	0.5 IAA	8.00k	25.00±1.42i	2.52±0.16	Koyu Yeşil – Sert
	0.5 IBA	36.00fg	42.00±5.05fg	4.68±0.50fg	Koyu Yeşil-Sert
	0.5 NAA	20.00i	38.00±7.50gh	3.68±0.87	Koyu Yeşil-Sert
	0.5 2.4-D	72.00c	48.00±2.08fg	4.13±0.35g	Beyaz-Granüler
1 Kin	1 IAA	4.00l	15.00±0.69j	1.51±0.12i	Koyu Yeşil-Sert
	1 IBA	36.00fg	32.00±4.35gh	3.37±0.76g	Koyu Yeşil-Sert
	1 NAA	12.00j	15.00±0.70j	1.54±0.06i	Açık Yeşil-Gevrek
	1 2.4-D	84.00b	46.00±4.35fg	4.60±1.42fg	Sarı-Yumuşak Dağılgan
1 Kin	2 IAA	32.00g	77.00±4.22c	7.24±0.28c	Koyu Yeşil-Sert
	2 IBA	20.00i	42.00±2.24g	4.18±0.52g	Açık Yeşil-Gevrek
	2 NAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 2.4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok

Çizelge 4.4. Devamı..

Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kombinasyonu (mg/l)	Kallus (%)	Ortalama Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi	
2 Kin	0.25 IAA	100.00a	36.00±6.42gh	3.51±0.42h	Koyu Yeşil-Sert
	0.25 IBA	52.00e	46.00±2.24fg	4.37±0.36g	Açık Yeşil-Gevrek
	0.25 NAA	40.00f	42.00±0.48g	4.54±0.16g	Açık Yeşil-Gevrek
	0.25 2,4-D	100.00a	60.00±8.45e	6.60±0.45d	Koyu Sarı Az Dağılgan
2 Kin	0.50 IAA	72.00c	57.00±4.50e	6.51±1.34de	Sarı Yeşil-Sert
	0.50 IBA	60.00d	43.00±2.82fg	5.37±0.36e	Açık Yeşil-Gevrek
	0.50 NAA	60.00d	48.00±6.20f	4.52±0.16g	Açık Yeşil-Gevrek
	0.50 2,4-D	12.00j	39.00±6.40fg	3.68±0.33g	Koyu Sarı Az Sert
2 Kin	1 IAA	60.00d	58.00±4.22ef	5.54±0.42e	Sarı Yeşil-Sert
	1 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	1 NAA	100.00a	69.00±2.25d	6.11±1.14d	Sarı Yeşil-Sert
	1 2,4-D	100.00a	82.00±2.85b	7.51±1.24cd	Sarı Yeşil-Az Dağılgan
2 Kin	2 IAA	52.00e	47.00±1.24g	6.54±0.16d	Koyu Yeşil-Sert
	2 IBA	60.00d	32.00±1.82h	3.60±0.45g	Koyu Yeşil-Sert
	2 NAA	52.00e	43.00±7.24fg	4.51±1.21fg	Sarı Yeşil-Az Dağılgan
	2 2,4-D	84.00b	51.00±5.52f	6.37±1.32de	Sarı Yeşil Az Kararma-Az Dağılgan
$X^2(df;63)$	$p \leq 0.05$				

Veriler kültürün 1. ve 28. günü 25 eksplantın ortalamasını göstermektedir. Bir kolondaki farklı harfler işlemin Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 4.5** irdelendiğinde, kök eksplantlarından kallus oluşumu [(0.5 mg/l TDZ'nin 0.5 mg/l IAA), (1 mg/l TDZ'nin 0.25 mg/l IAA), (1 mg/l TDZ'nin 0.5 mg/l IBA), (1 mg/l TDZ'nin 1-2 mg/l IAA, IBA 2,4-D) kombinasyonları] destekli MS besi ortamında kallus oluşumu gözlenmezken, en yüksek kallus oluşumu %90 ile [(0.25 mg/l TDZ ile 0.5 mg/l IBA)] destekli MS besi ortamında hesaplanırken, en düşük kallus oluşumu %8 ile [(1 mg/l TDZ'in 1 mg/l NAA)] destekli MS besi ortamında hesaplanmıştır. Belirtilen besi ortamlarında kallus yaş ve kuru ağırlıkları sırasıyla; 44.90±0.40, 4.93±0.19; 21.00±2.46, 2.51±0.21 mg olarak hesaplanmıştır. Bununla birlikte, diğer bitki büyüme düzenleyecilerine göre TDZ uygulamalarının kök eksplantlarında kırmızımsı kalluslar oluştuğu gözlenirken, aynı şekilde 2,4-D kombinasyonlu dışındaki TDZ'nin diğer oksin kombinasyonlarında sert ve sarı kırmızı tekstürlü kallus gözlenirken, TDZ'nin 2,4-D kombinasyonlarında genelde kırmızı sarı yumuşak dağılgan kallus gözlenmiştir.

**Çizelge 4.5.** Juvenil kök eksplantları kullanılarak TDZ'nin farklı konsantrasyonları (0.25-0.5-1-2 mg/l) ile oksinlerin (IAA, IBA, NAA, 2.4 D) farklı konsantrasyonlarının (0.25-0.5-1-2 mg/l) kombinasyonlarının kallus oluşumuna etkisi.

Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kombinasyonu (mg/l)	Kallus (%)	Ortalama Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi	
0.25 TDZ	0.25 IAA	60.00d	49.30±1.42d	5.42±0.23b	Açık Kırmızı-Sert
	0.25 IBA	52.00e	44.40±1.57de	5.43±0.41b	Açık Kırmızı-Gevrek
	0.25 NAA	52.00e	49.50±0.80d	5.44±0.45b	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.25 2.4-D	48.00f	37.00±1.20f	4.07±0.42c	Açık S.- Yumuşak
0.25 TDZ	0.50 IAA	52.00e	37.10±1.25f	4.08±0.41c	Açık SarıKırmızı-Sert
	0.50 IBA	90.00a	44.90±0.40e	4.93±0.19bc	Açık Kırmızı-Sert
	0.50 NAA	40.00g	19.60±0.52h	2.15±0.26de	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.50 2.4-D	20.00ı	59.00±4.84c	4.49±0.35c	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
0.25 TDZ	1 IAA	20.00ı	23.00±0.20	2.53±0.22de	Açık Kırmızı-Sert
	1 IBA	40.00g	20.00±0.40h	2.20±0.31de	Açık Kırmızı-Gevrek
	1 NAA	60.00d	27.00±1.20g	2.97±0.24de	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	1 2.4-D	40.00g	21.00±0.50h	2.31±0.85e	Açık Sarı Kırmızı-Az Kırılğan
0.25 TDZ	2 IAA	24.00ı	18.00±0.21ı	1.98±0.26e	Açık Kırmızı-Sert
	2 IBA	60.00d	53.00±1.24c	5.83±0.96b	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	2 NAA	40.00f	47.00±3.27de	5.17±0.27b	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	2 2.4-D	20.00ı	26.00±1.46g	2.86±0.10e	Açık Sarı Koyu Kırmızı-Az Yumuşak
0.50 TDZ	0.25 IAA	40.00g	35.00±4.50f	4.25±0.28c	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.25 IBA	24.00ı	43.00±2.52e	4.03±0.35c	Kırmızı-Az Kırılğan
	0.25 NAA	40.00g	47.00±1.40d	5.69±0.34b	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.25 2.4-D	40.00g	40.00±1.21e	4.80±0.42bc	Sarı Kırmızı-Az Yumuşak
0.50 TDZ	0.50 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.50 IBA	52.00e	54.00±2.72c	5.94±0.82a	Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.50 NAA	80.00b	27.00±0.75g	2.97±0.45e	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.50 2.4-D	20.00ı	13.00±0.14j	1.43±0.14f	Açık Sarı, Yer Yer Kırmızı- Yumuşak
0.50 TDZ	1 IAA	24.00ı	40.90±1.80e	4.49±0.91bc	Açık Kırmızı-Gevrek
	1 IBA	52.00e	30.50±0.92f	3.35±0.45de	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	1 NAA	80.00b	57.00±4.40c	6.27±0.78ab	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	1 2.4-D	40.00g	39.90±0.82ef	4.38±0.98bc	Sarı Koyu Kırmızı-Az Sert
0.50 TDZ	2 IAA	24.00ı	14.00±1.02j	1.44±0.26f	Sarı Kırmızı-Az Sert
	2 IBA	52.00e	33.00±1.25f	3.63±1.14cd	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	2 NAA	80.00b	68.00±2.24a	7.48±1.49a	Sarı-Kırmızı-Sert
	2 2.4-D	40.00g	43.00±0.88e	4.73±0.84bc	Açık Sarı Az Kırmızı- Yumuşak
1 TDZ	0.25 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.25 IBA	40.00g	30.00±1.50g	4.70±0.42bc	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.25 NAA	40.00g	49.80±1.28d	5.47±1.28b	Sarı Kırmızı-Sert
	0.25 2.4-D	80.00b	36.00±0.72f	3.96±0.26cd	Sarı Az Kırmızı-Yumuşak
1 TDZ	0.50 IAA	40.00f	25.00±0.56g	2.75±0.85e	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.50 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.50 NAA	20.00ı	33.00±1.24f	3.63±0.29d	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.50 2.4-D	60.00d	21.00±1.02hi	2.31±0.38e	Sarı Kırmızı-Az Sert
1 TDZ	1 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	1 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	1 NAA	8.00j	21.00±2.46hi	2.51±0.21e	Açık Sarı Kır.-Az Sert
	1 2.4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
1 TDZ	2 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 NAA	40.00g	25.00±0.40g	3.15±0.10d	Sarı Kırmızı-Az Sert
	2 2.4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok

Çizelge 4.5. Devamı..

Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kombinasyonu (mg/l)	Kallus (%)	Ortalama Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi	
2 TDZ	0.25 IAA	20.00 <sub>1</sub>	18.00±1.24 <sub>1</sub>	1.98±0.51 <sub>f</sub>	Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.25 IBA	40.00 <sub>g</sub>	16.00±0.48 <sub>jk</sub>	1.76±0.24 <sub>f</sub>	Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.25 NAA	80.00 <sub>b</sub>	63.00±1.52 <sub>b</sub>	6.93±1.11 <sub>a</sub>	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.25 2.4-D	20.00 <sub>1</sub>	26.00±0.27 <sub>g</sub>	2.86±0.47 <sub>de</sub>	Açık Sarı Yer Yer Kırmızı- Yumuşak
2 TDZ	0.50 IAA	20.00 <sub>1</sub>	36.00±1.24 <sub>f</sub>	3.96±0.82 <sub>cd</sub>	Açık Kırmızı-Gevrek
	0.50 IBA	20.00 <sub>1</sub>	47.00±0.85 <sub>d</sub>	4.57±0.74 <sub>cd</sub>	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.50 NAA	40.00 <sub>g</sub>	32.10±0.46 <sub>f</sub>	4.13±0.05 <sub>c</sub>	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.50 2.4-D	60.00 <sub>d</sub>	56.00±1.25 <sub>c</sub>	6.16±1.22 <sub>a</sub>	Sarı Koyu Kırmızı- Yumuşak
2 TDZ	1 IAA	72.00 <sub>c</sub>	34.00±1.22 <sub>f</sub>	3.74±0.75 <sub>d</sub>	Sarı Kırmızı-Az Sert
	1 IBA	32.00 <sub>h</sub>	12.00±0.15 <sub>1</sub>	1.32±0.28 <sub>f</sub>	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	1 NAA	40.00 <sub>g</sub>	11.00±0.20 <sub>1</sub>	1.21±0.32 <sub>f</sub>	Sarı-Kırmızı-Sert
	1 2.4-D	40.00 <sub>g</sub>	14.00±0.82 <sub>k</sub>	1.54±0.41 <sub>f</sub>	Açık Sarı Az Kırmızı-Az Kırılğan
2 TDZ	2 IAA	40.00 <sub>g</sub>	44.90±2.21 <sub>d</sub>	4.23±0.92 <sub>cd</sub>	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	2 IBA	20.00 <sub>1</sub>	26.00±1.14	2.86±0.12 <sub>e</sub>	Açık Sarı Yer Yer Kırmızı- Sert
	2 NAA	40.00 <sub>g</sub>	43.00±1.24 <sub>de</sub>	4.73±0.65 <sub>cd</sub>	Açık Kırmızı-Gevrek
	2 2.4-D	40.00 <sub>g</sub>	29.00±0.72 <sub>g</sub>	1.99±0.29 <sub>f</sub>	Açık Sarı Kırmızı-Az Kırılğan
$X^2(df;63)$	$p \leq 0.05$				

Veriler kültürün 1. ve 28. günü 25 eksplantın ortalamasını göstermektedir. Bir kolondaki farklı harfler işlemin Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.6 irdelendiğinde, kök eksplantlarından kallus oluşumuna göre yaprak eksplantlarından kallus oluşumu daha başarılıdır, sadece, [(0.5 mg/l TDZ'nin 2 mg/l 2,4-D) kombinasyonu] destekli MS besi ortamında kallus oluşumu gözlenmezken, en yüksek kallus oluşumu %100 ile [(1 mg/l TDZ ile 0.5 mg/l IBA)] destekli MS besi ortamında hesaplanırken, en düşük kallus oluşumu %8 ile [(1 mg/l TDZ'in 1 mg/l IAA ve NAA) kombinasyonları] destekli MS besi ortamında hesaplanmıştır. Belirtilen besi ortamlarında kallus yaş ve kuru ağırlıkları sırasıyla; 26.80±0.90, 2.94±0.82; 17.80±1.20, 1.95±0.88; 18.20±1.25<sub>k</sub>, 2.00±0.42 mg olarak hesaplanmıştır. Bununla birlikte, diğer bitki büyüme düzenleyecilerine göre yaprak eksplantlarında olduğu gibi TDZ uygulamalarında yaprak eksplantlarında kırmızimsı kalluslar oluştuğu gözlenirken, aynı şekilde 2,4-D kombinasyonlu dışındaki TDZ'nin diğer oksin kombinasyonlarında sert ve sarı kırmızı tekstürlü kallus gözlenmiştir.

**Çizelge 4.6.** Juvenil yaprak eksplantları kullanılarak TDZ'nin farklı konsantrasyonları (0.25-0.5-1-2 mg/l) ile oksinlerin (IAA, IBA, NAA, 2.4 D) farklı konsantrasyonlarının (0.25-0.5-1-2 mg/l) kombinasyonlarının kallus oluşumuna etkisi.

Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kombinasyonu (mg/l)		Kallus (%)	Ortalama Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi
0.25 TDZ	0.25 IAA	40.00i	22.00±1.20	2.42±0.28f	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.25 IBA	52.00g	45.00±4.16ef	4.95±0.85de	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.25 NAA	40.00i	49.80±2.85e	5.47±0.82d	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.25 2.4-D	52.00g	45.00±1.42ef	4.95±1.05de	Açık Kırmızı-Yumuşak
0.25 TDZ	0.50 IAA	32.00j	24.60±1.26h	2.70±0.60e	Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.50 IBA	52.00g	50.00±2.10ef	5.50±0.50d	Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.50 NAA	40.00i	45.60±1.25ef	5.01±0.63d	Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.50 2.4-D	52.00g	45.80±1.20ef	5.03±0.58d	Açık Kırmızı-Yumuşak
0.25 TDZ	1 IAA	40.00i	30.00±1.50h	3.30±0.28e	Sarı Kırmızı-Az Sert
	1 IBA	72.00c	26.40±1.22h	2.90±0.42e	Sarı Kırmızı-Az Sert
	1 NAA	20.00l	21.80±1.48i	2.39±0.28f	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	1 2.4-D	60.00d	35.60±1.60g	3.91±0.62de	Sarı Kırmızı-Yumuşak
0.25 TDZ	2 IAA	80.00b	67.40±2.72b	7.91±0.84ab	Açık Kırmızı-Gevrek
	2 IBA	20.00l	12.80±1.82	1.40±0.28fg	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	2 NAA	52.00g	21.40±0.76hi	2.35±0.48f	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	2 2.4-D	20.00l	9.60±0.28l	1.05±0.26g	Sarı Koyu Kırmızı-Yumuşak
0.50 TDZ	0.25 IAA	72.00c	55.20±2.68c	6.07±1.20bc	Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.25 IBA	44.00h	25.00±1.25hi	2.75±0.25f	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.25 NAA	40.00i	42.20±1.26f	4.64±0.42de	Sarı-Kırmızı-Sert
	0.25 2.4-D	24.00k	21.20±0.80i	2.33±0.22e	Açık Sarı Az Kırmızı-Az Kırılğan
0.50 TDZ	0.50 IAA	32.00j	17.20±1.36k	1.89±0.54ef	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.50 IBA	80.00b	53.20±3.72c	5.85±0.85d	Açık Sarı Yer Yer Kırmızı- Sert
	0.50 NAA	12.00n	43.80±2.45ef	4.81±0.38de	Açık Kırmızı-Gevrek
	0.50 2.4-D	40.00i	42.00±1.20ef	4.62±0.52de	Açık Sarı Kırmızı-Az Kırılğan
0.50 TDZ	1 IAA	52.00g	54.60±2.64c	6.00±0.62c	Sarı Kırmızı-Az Sert
	1 IBA	68.00d	84.20±1.28a	9.26±1.02a	Sarı Kırmızı-Az Sert
	1 NAA	60.00e	41.20±1.41f	4.53±0.74de	Sarı Kırmızı-Az Sert
	1 2.4-D	40.00i	43.00±2.52ef	4.73±0.46de	Açık Kırmızı-Yumuşak
0.50 TDZ	2 IAA	20.00k	42.00±1.45ef	4.62±0.38de	Sarı Kırmızı-Az Sert
	2 IBA	56.00f	26.20±0.85i	2.88±0.24e	Sarı Kırmızı-Az Sert
	2 NAA	16.00m	18.00±1.22k	1.98±0.68ef	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	2 2.4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
1 TDZ	0.25 IAA	40.00i	30.80±0.85h	3.38±0.38e	Açık Kırmızı-Gevrek
	0.25 IBA	40.00i	41.00±1.45ef	4.51±0.41de	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.25 NAA	40.00i	20.60±0.45i	2.26±0.60ef	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.25 2.4-D	60.00e	51.00±1.35d	5.61±1.02d	Sarı Koyu Kırmızı-Yumuşak
1 TDZ	0.50 IAA	60.00e	45.20±1.20e	4.97±0.26e	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	0.50 IBA	100.00a	26.80±0.90i	2.94±0.82de	Açık Sarı Yer Yer Kırmızı- Sert
	0.50 NAA	32.00j	16.60±0.50k	1.82±0.62f	Açık Kırmızı-Gevrek
	0.50 2.4-D	32.00j	17.60±0.70k	1.93±0.46f	Açık Sarı Kırmızı-Az Kırılğan
1 TDZ	1 IAA	8.00o	17.80±1.20k	1.95±0.88f	Sarı Kırmızı-Az Sert
	1 IBA	12.00n	18.00±0.60k	1.98±0.28f	Sarı Kırmızı-Az Sert
	1 NAA	8.00o	18.20±1.25k	2.00±0.42f	Sarı Kırmızı-Az Sert
	1 2.4-D	12.00n	18.40±1.40k	2.02±0.54f	Açık Kırmızı-Yumuşak Az Dağılğan
1 TDZ	2 IAA	20.00l	26.60±0.80i	7.32±0.56b	Açık Kırmızı-Gevrek
	2 IBA	52.00g	27.20±1.10hi	2.99±0.92ef	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert
	2 NAA	12.00n	11.00±0.20l	1.21±0.11g	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert

		2 2,4-D	40.00i	19.60±0.80ij	2.15±0.68f	Sarı, K. Kırmızı-Yumuşak
<b>Çizelge 4.6. Devamı..</b>						
Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kombinasyonu (mg/l)	Kallus (%)	Ortalama Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi		
2 TDZ	0.25 IAA	60.00e	65.00±1.42b	9.50±1.24a	Açık Sarı Kırmızı Sert	
	0.25 IBA	32.00j	19.00±1.22ij	2.09±0.45f	Açık Sarı Yer Yer Kırmızı-Sert	
	0.25 NAA	40.00i	24.20±1.84h	2.66±0.82ef	Açık Kırmızı-Gevrek	
	0.25 2,4-D	20.00l	11.20±0.91l	1.23±0.32g	Açık Sarı Kırmızı-Az Kırılğan	
2 TDZ	0.50 IAA	32.00j	12.00±1.12	1.32±0.24f	Açık Kırmızı-Gevrek	
	0.50 IBA	32.00j	9.60±0.81l	1.05±0.56f	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert	
	0.50 NAA	40.00i	22.00±1.47i	2.42±0.24ef	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert	
	0.50 2,4-D	32.00j	16.20±1.32j	1.78±0.52f	Sarı Koyu Kırmızı-Yumuşak	
2 TDZ	1 IAA	40.00i	30.40±0.48h	3.34±0.54e	Sarı Kırmızı-Az Sert	
	1 IBA	32.00j	33.20±2.12gh	3.65±0.72e	Sarı Kırmızı-Az Sert	
	1 NAA	40.00i	24.60±0.96h	2.70±0.66ef	Sarı Kırmızı-Az Sert	
	1 2,4-D	32.00j	12.00±0.84l	1.32±0.22f	Açık Kırmızı-Yumuşak Az Dağılğan	
2 TDZ	2 IAA	20.00l	10.00±0.28l	1.10±0.21g	Sarı Kırmızı-Sert	
	2 IBA	20.00l	23.80±1.84i	2.61±0.88ef	Sarı Kırmızı-Az Sert	
	2 NAA	40.00i	28.40±2.42gh	3.12±0.84ef	Açık Sarı Kırmızı-Az Sert	
	2 2,4-D	32.00j	16.00±0.50k	1.76±0.28fg	Sarı Kırmızı-Az Yumuşak	
$X^2(df;63)$		p≤0.05				

Veriler kültürün 1. ve 28. günü 25 eksplantın ortalamasını göstermektedir. Bir kolondaki farklı harfler işlemin Duncan çoklu karşılaştırma testine göre P≤0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 4.7** irdelendiğinde, kök eksplantlarından kallus oluşumu [(0.25 mg/l 2-IP'nin 0.25 mg/l IAA), (0.25 mg/l 2-IP'nin 0.5 mg/l IAA), (0.5 mg/l 2-IP'nin 0.25 mg/l IAA ve 2,4-D), (0.5 mg/l 2-IP'nin 1 mg/l IBA), (0.5 mg/l 2-IP'nin 2 mg/l IAA), (1 mg/l 2-IP'nin 1 mg/l IAA ve 2,4-D), (2 mg/l 2-IP'nin 0.5 mg/l IAA ve IBA) kombinasyonları] destekli MS besi ortamında kallus oluşumu gözlenmezken, en yüksek kallus oluşumu %72 ile [(0.5 mg/l 2-IP ile 2 mg/l 2,4-D)] destekli MS besi ortamında hesaplanırken, en düşük kallus oluşumu %8 ile [(0.5 mg/l 2-IP ile 0.5 mg/l IAA; 1 mg/l IAA, 2,4-D)] destekli MS besi ortamında hesaplanmıştır. Belirtilen besi ortamlarında kallus yaş ve kuru ağırlıkları sırasıyla; 56.10±1.92, 6.17±1.04; 6.00±0.05, 0.66±0.45; 5.00±0.16, 0.55±0.76; 19.70±0.52, 2.36±0.47 mg olarak hesaplanmıştır. Bununla birlikte kök eksplantlarına göre yaprak eksplantlarında, 2-IP'nin 2,4-D'li kombinasyonları dışındaki diğer oksin kombinasyonlarında sert ve yeşil tekstürlü kallus gözlenirken, 2-IP ile 2,4-D kombinasyonlarında genelde daha iyi tekstürde kallus gözlenmiştir.

**Çizelge 4.7.** Juvenil kök eksplantları kullanılarak 2-IP'nin farklı konsantrasyonları (0.25-0.5-1.-2 mg/l) ile oksinlerin (IAA, IBA, NAA, 2.4 D) farklı konsantrasyonlarının (0.25-0.5-1.-2 mg/l) kombinasyonlarının kallus oluşumuna etkisi.

Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kombinasyonu (mg/l)	Kallus (%)	Ortalama Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi	
<b>0.25 2-IP</b>	<b>0.25 IAA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>0.25 IBA</b>	20.00g	32.00±1.48cd	3.52±0.12bc	Çok Açık Sarı-Sert
	<b>0.25 NAA</b>	20.00g	11.00±0.42hı	1.21±0.22ef	Sarı-Az Sert
	<b>0.25 2.4-D</b>	20.00g	22.00±1.14fg	2.42±0.46d	Beyazımsı Sarı-Az Yumuşak
<b>0.25 2-IP</b>	<b>0.50 IAA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>0.50 IBA</b>	20.00g	26.00±2.12f	2.86±0.17cd	Açık Sarı-Az Sert
	<b>0.50 NAA</b>	32.00e	27.00±0.88f	3.97±0.46bc	Sarı-Az Sert
	<b>0.50 2.4-D</b>	32.00e	12.00±0.34ı	1.32±0.12de	Sarı-Az Yumuşak
<b>0.25 2-IP</b>	<b>1 IAA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>1 IBA</b>	12.00ı	20.00±1.10fg	2.21±0.23d	Açık Sarı-Sert
	<b>1 NAA</b>	12.00ı	21.00±1.23fg	2.31±0.34d	Sarı-Az Sert
	<b>1 2.4-D</b>	32.00e	37.00±2.12c	5.17±0.59ab	Sarımsı-Az Yumuşak
<b>0.25 2-IP</b>	<b>2 IAA</b>	20.00f	17.00±0.56h	1.87±0.17de	Sarı Sert
	<b>2 IBA</b>	20.00f	42.00±0.72b	5.92±0.62ab	Açık Sarı-Sert
	<b>2 NAA</b>	32.00e	17.00±0.16h	1.87±0.32de	Sarı-Az Sert
	<b>2 2.4-D</b>	32.00e	27.00±0.54f	2.97±0.32cd	Sarı-Az Yumuşak
<b>0.50 2-IP</b>	<b>0.25 IAA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>0.25 IBA</b>	36.00d	55.00±1.12a	5.25±0.28ab	Sarı Sert
	<b>0.25 NAA</b>	36.00d	41.00±1.07b	4.51±0.72b	Açık Sarı-Sert
	<b>0.25 2.4-D</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
<b>0.50 2-IP</b>	<b>0.50 IAA</b>	8.00j	6.00±0.05k	0.66±0.45	Sarı-Az Sert
	<b>0.50 IBA</b>	20.00g	5.00±0.07k	0.55±0.82h	Açık Sarı-Sert
	<b>0.50 NAA</b>	36.00d	11.32±0.52	1.24±0.13e	Sarı-Az Sert
	<b>0.50 2.4-D</b>	12.00	2.00±0.21ı	0.22±0.35ı	Açık Sarı-Az Dağılgan
<b>0.50 2-IP</b>	<b>1 IAA</b>	8.00j	5.00±0.16k	0.55±0.76h	Açık Sarı-Sert
	<b>1 IBA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>1 NAA</b>	12.00ı	9.00±0.62j	0.99±0.08f	Sarı-Az Sert
	<b>1 2.4-D</b>	8.00j	19.70±0.52fg	2.36±0.47cd	Sarı-Az Yumuşak
<b>0.50 2-IP</b>	<b>2 IAA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>2 IBA</b>	32.00e	29.50±1.24d	3.24±0.85bc	Açık Sarı-Az Sert
	<b>2 NAA</b>	40.00c	34.30±1.27cd	3.77±0.63bc	Sarı-Az Sert
	<b>2 2.4-D</b>	72.00a	56.10±1.92a	6.17±1.04a	Sarı-Az Yumuşak
<b>1 2-IP</b>	<b>0.25 IAA</b>	12.00ı	24.00±1.15f	2.64±0.52cd	Sarı-Az Sert
	<b>0.25 IBA</b>	40.00c	43.00±2.15b	4.73±1.68b	Açık Sarı-Sert
	<b>0.25 NAA</b>	20.00g	26.00±0.87e	2.86±0.67cd	Sarı-Az Sert
	<b>0.25 2.4-D</b>	40.00c	27.00±2.05e	2.97±0.42cd	Açık Sarı-Az Yumuşak
<b>1 2-IP</b>	<b>0.50 IAA</b>	20.00g	18.00±0.87h	1.98±0.32d	Sarı Yeşil-Az Sert
	<b>0.50 IBA</b>	40.00c	55.00±2.12a	6.05±1.23a	Açık Sarı-Az Sert
	<b>0.50 NAA</b>	20.00g	37.00±1.20c	4.07±1.71b	Sarı-Az Sert
	<b>0.50 2.4-D</b>	40.00c	11.00±1.94hı	1.21±0.16ef	Sarı-Az Yumuşak
<b>1 2-IP</b>	<b>1 IAA</b>	12.00ı	37.00±1.26c	4.07±1.32b	Açık Sarı Yeşil-Sert
	<b>1 IBA</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	<b>1 NAA</b>	12.00ı	17.00±0.83h	1.87±0.37de	Sarı Kahverengi-Az Sert
	<b>1 2.4-D</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
<b>1 2-IP</b>	<b>2 IAA</b>	12.00ı	32.00±1.22d	3.52±1.22c	Sarı Yeşil Kahverengi-Az Sert
	<b>2 IBA</b>	40.00c	17.00±1.06h	1.87±0.31de	Açık Sarı-Az Sert
	<b>2 NAA</b>	40.00c	20.00±0.45fg	2.20±0.87cd	Sarı-Az Sert
	<b>2 2.4-D</b>	32.00f	34.00±1.67cd	3.74±0.22c	Sarı Yeşil-Az Sert

Çizelge 4.7. Devamı..

Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kombinasyonu (mg/l)	Kallus (%)	Ortalama Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi	
2-IP	0.25 IAA	20.00g	7.00±0.64jk	0.77±0.09h	Sarı Yeşil-Az Sert
	0.25 IBA	40.00c	8.00±0.82jk	0.88±0.06g	Açık Sarı-Az Sert
	0.25 NAA	20.00g	22.00±1.48f	2.42±0.22d	Sarı-Az Sert
	0.25 2,4-D	40.00c	23.00±1.24f	2.53±0.65d	Açık Sarı Yeşilimsi-Az Yumuşak
2 2-IP	0.50 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.50 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.50 NAA	20.00g	13.10±1.24hı	1.43±0.32e	Sarı Kahverengi-Az Sert
	0.50 2,4-D	40.00c	26.00±1.33e	2.86±0.74cd	Açık Sarı Yeşil-Az Dağılgan
2 2-IP	1 IAA	20.00g	12.30±0.56hı	1.32±0.16ef	Açık Sarı-Sert
	1 IBA	20.00g	13.00±0.82hı	1.43±0.18e	Sarı Yeşil-Sert
	1 NAA	40.00c	28.40±2.24e	3.08±0.27c	Sarı Kahverengi-Az Sert
	1 2,4-D	60.00b	37.00±1.14c	4.09±1.17bc	Açık Kahverengi-Az Yumuşak Dağılgan
2 2-IP	2 IAA	20.00g	24.30±1.81ef	2.64±0.47d	Açık Yeşil-Sert
	2 IBA	40.00c	16.40±1.33h	1.76±0.12e	Sarı Yeşil-Sert
	2 NAA	40.00c	17.20±1.26h	1.87±0.17e	Sarı-Az Sert
	2 2,4-D	60.00b	37.10±2.57c	4.07±1.02bc	Sarı Yeşil-Az Yumuşak Az Dağılgan
$X^2(df;63)$	$p \leq 0.05$				

Veriler kültürün 1. ve 28. günü 25 eksplantın ortalamasını göstermektedir. Bir kolondaki farklı harfler işlemin Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 4.8** irdelendiğinde, yaprak eksplantlarından kallus oluşumu [(0.25 mg/l 2-IP'nin 0.25 mg/l IAA) , (0.25 mg/l 2-IP'nin 0.5 mg/l IAA), (0.25 mg/l 2-IP'nin 2 mg/l NAA), (0.5 mg/l 2-IP'nin 0.25 mg/l IAA, IBA, NAA), (0.5 mg/l 2-IP'nin 0.5 mg/l IBA, 2,4-D), (0.5 mg/l 2-IP'nin 1 mg/l IBA), (0.5 mg/l 2-IP'nin 2 mg/l IBA, 2,4-D), (1 mg/l 2-IP'nin 1 ve 2 mg/l IAA, IBA, NAA ve 1 mg/l 2,4-D),] kombinasyonları ile destekli MS besi ortamlarında gözlenmemiştir. En yüksek kallus oluşumu %88 ile [(0.5 mg/l 2-IP ile 2 mg/l IAA)] destekli MS besi ortamında hesaplanırken, en düşük kallus oluşumu %12 ile [(0.25 mg/l 2-IP ile 0.25 mg/l NAA), (0.25 mg/l 2-IP ile 1 mg/l IAA), (0.25 mg/l 2-IP ile 0.5 ve 2 mg/l IBA), (0.50 mg/l 2-IP ile 0.25 mg/l 2,4-D), (1 mg/l 2-IP ile 0.25 mg/l IAA), (1 mg/l 2-IP ile 2 mg/l 2,4-D), (2 mg/l 2-IP ile 0.25 mg/l IAA), (2 mg/l 2-IP ile 1 mg/l NAA)] destekli MS besi ortamlarından elde edilmiştir. En yüksek kallus oluşumunun elde edildiği besi ortamında kallus yaş ve kuru ağırlıkları sırasıyla; 61.00±2.26, 5.61±0.67 mg olarak hesaplanmıştır. Bununla birlikte kök eksplantlarında olduğu gibi yaprak eksplantlarında da 2-IP'nin 2,4-D'li kombinasyonları dışındaki diğer oksin kombinasyonlarında sert ve sarı yeşil tekstürlü kallus oluşumu gözlenirken, 2-IP ile 2,4-D kombinasyonlarında genelde daha iyi tekstürde kallus gözlenmiştir.

**Çizelge 4.8.** Juvenil yaprak eksplantları kullanılarak 2-IP'nin farklı konsantrasyonları (0.25-0.5-1.-2 mg/l) ile oksinlerin (IAA, IBA, NAA, 2.4 D) farklı konsantrasyonlarının (0.25-0.5-1.-2 mg/l) kombinasyonlarının kallus oluşumuna etkisi.

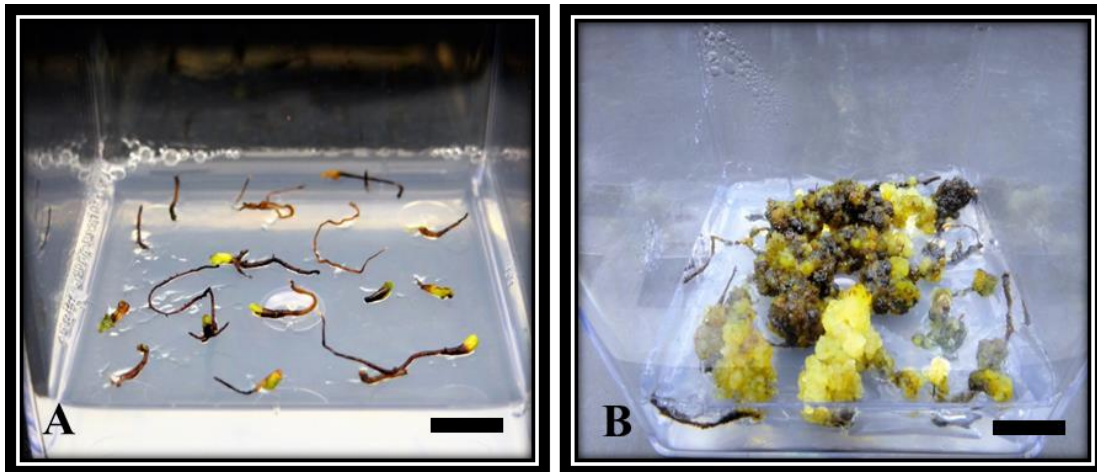
Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kombinasyonu (mg/l)	Kallus (%)	Ortalama Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi	
0.25 2-IP	0.25 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.25 IBA	20.00k	42.00±1.24f	4.62±0.05de	Sarı-Az Sert
	0.25 NAA	12.00l	15.00±0.45n	2.05±0.24gh	Sarı Kahverengi-Az Yumuşak
	0.25 2.4-D	20.00k	49.00±1.65e	5.39±0.45d	Sarı Kahverengi-Az Yumuşak
0.25 2-IP	0.50 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.50 IBA	12.00l	7.00±0.24r	0.94±0.52j	Açık Sarı-Az Sert
	0.50 NAA	20.00k	34.00±1.56gh	2.64±0.24fg	Sarı-Az Sert
	0.50 2.4-D	40.00g	59.00±1.52b	5.39±0.62bc	Sarı Kahverengi-Az Yumuşak
0.25 2-IP	1 IAA	12.00l	9.00±0.34p	1.32±0.14hı	Sarı Yeşil-Az Sert
	1 IBA	20.00k	39.00±2.17g	2.09±0.31gh	Açık Sarı-Az Sert
	1 NAA	20.00k	42.00±1.14	1.32±0.17hı	Sarı-Az Sert
	1 2.4-D	72.00c	57.00±1.44b	5.72±0.63c	Sarı-Az Yumuşak
0.25 2-IP	2 IAA	20.00k	38.00±1.38gh	1.98±0.17gh	Açık Sarı-Az Sert
	2 IBA	12.00l	12.00±0.44o	1.72±0.86ı	Sarı-Az Sert
	2 NAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 2.4-D	72.00c	65.00±2.34a	7.15±1.04a	Sarı Kahverengi-Az Yumuşak Kırılgan
0.50 2-IP	0.25 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.25 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.25 NAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.25 2.4-D	12.00l	14.00±0.62n	1.54±0.29h	Sarı Kahverengi-Az Yumuşak
0.50 2-IP	0.50 IAA	40.00g	48.00±2.54e	3.08±0.49ef	Sarı Yeşil-Az Sert
	0.50 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	0.50 NAA	64.00d	51.00±1.26de	5.28±1.17bcd	Sarı Kahverengi-Sert
	0.50 2.4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
0.50 2-IP	1 IAA	24.00j	38.00±0.74gh	4.18±0.74de	Sarı Yeşil- Sert
	1 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	1 NAA	64.00d	58.00±3.12b	6.05±1.12bc	Açık Sarı-Az Sert
	1 2.4-D	28.00ı	43.00±1.33f	4.73±0.78de	Sarı-Az Yumuşak
0.50 2-IP	2 IAA	88.00a	61.00±2.26ab	5.61±0.67bc	Sarı Yeşil-Az Sert
	2 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 NAA	60.00e	65.00±1.17a	7.15±0.73a	Yeşil-Az Sert
	2 2.4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
1 2-IP	0.25 IAA	12.00l	15.00±0.76n	1.65±0.13h	Sarı Yeşil-Az Sert
	0.25 IBA	32.00h	26.00±1.13ij	3.52±0.29e	Açık Sarı-Az Sert
	0.25 NAA	20.00k	30.00±0.83ı	3.31±0.47e	Sarı Kahverengi-Az Sert
	0.25 2.4-D	80.00b	52.00±2.83de	5.72±1.19bc	Sarı-Az Yumuşak
1 2-IP	0.50 IAA	32.00h	35.00±1.23h	3.85±0.25e	Sarı Kahverengi-Sert
	0.50 IBA	60.00e	52.00±2.43de	4.40±1.36de	Sarı Yeşil- Az Sert
	0.50 NAA	20.00k	47.00±1.27e	1.87±0.27gh	Sarı Kahverengi-Sert
	0.50 2.4-D	32.00h	45.00±1.14ef	3.85±0.86e	Sarı Kahverengi- Az Sert
1 2-IP	1 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	1 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	1 NAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	1 2.4-D	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
1 2-IP	2 IAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 IBA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 NAA	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
	2 2.4-D	12.00l	25.00±0.34k	2.75±0.53ef	Sarı Kahverengi-Az Yumuşak

Çizelge 4.8. Devamı..

Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kombinasyonu (mg/l)	Kallus (%)	Ortalama Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi	
2 2-IP	0.25 IAA	12.00l	22.00±0.26l	2.42±0.38ef	Sarı Yeşil- Az Sert
	0.25 IBA	40.00g	38.00±1.15gh	4.29±0.77de	Açık Sarı-Az Sert
	0.25 NAA	32.00h	23.00±0.26k	2.53±0.83fg	Sarı-Az Sert
	0.25 2.4-D	52.00f	40.00±1.26g	4.40±0.36de	Sarı Kahverengi-Az Yumuşak
2 2-IP	0.50 IAA	32.00h	28.00±0.42ij	3.08±0.37ef	Sarı Yeşil- Az Sert
	0.50 IBA	52.00f	41.00±1.56g	3.41±0.78e	Açık Sarı-Az Sert
	0.50 NAA	52.00f	48.00±1.48e	5.28±0.74bc	Sarı-Az Sert
	0.50 2.4-D	32.00h	35.00±0.96	3.85±0.42e	Sarı Kahverengi-Az Yumuşak
2 2-IP	1 IAA	60.00d	53.00±1.17d	5.80±1.18bc	Açık Sarı-Sert
	1 IBA	32.00h	38.00±0.34gh	4.18±0.57de	Sarı -Sert
	1 NAA	12.00l	18.00±1.33m	1.98±0.42g	Sarı -Az Sert
	1 2.4-D	72.00c	48.00±0.87e	5.28±1.03bcd	Açık Sarı Kahverengi-Az Dağılgan
2 2-IP	2 IAA	32.00h	31.00±2.07ij	3.41±0.85e	Açık Sarı-Sert
	2 IBA	40.00g	41.00±2.18g	4.51±0.87de	Sarı Yeşil-Sert
	2 NAA	60.00d	52.00±1.02d	5.72±1.13bc	Sarı Kahverengi-Az Sert
	2 2.4-D	72.00c	56.00±0.84c	5.83±1.34bc	Açık Kahverengi- Yumuşak Az Dağılgan
$X^2(df;63)$		$p \leq 0.05$			

Veriler kültürün 1. ve 28. günü 25 eksplantın ortalamasını göstermektedir. Bir kolondaki farklı harfler işlemin Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

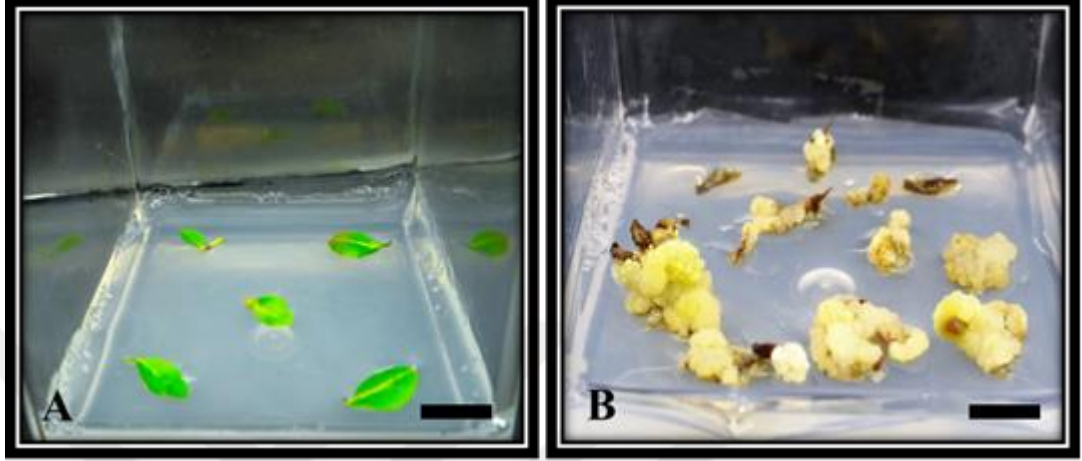
Kök ve yaprak kallus oluşturma çalışmaları genel olarak irdelendiğinde, denenen sitokinin ve oksin kombinasyonları arasında maksimum %100 kallus oluşturma oranı gözlenirken bazı sitokinin oksin kombinasyonlarında ise kallus oluşumu gözlenmemiştir.



Şekil 4.3. Juvenil sakız (*P. lentiscus* L.) bitkisine ait aksenik köklerden kallus eldesi **A.** 1 mg/l Kin 1 mg/l 2,4 D içeren MS besi ortamında kültüre alınan tohum kökenli juvenil kökler, Bar: 0.9 cm., **B.** Kültürün 42. gününde 1 mg/l Kin 1 mg/l 2,4 D içeren MS besi ortamında bulunan köklerden gelişen kalluslar, Bar: 1.2 cm.

Bununla birlikte, sitokininlerin IAA, IBA ve NAA kombinasyonlarında sarı-yeşil-kırmızı ve beyaz tonlarda yer yer kararma gösteren sert tekstürlü kallus oluştuğu gözlenirken, sitokininlerin 2,4-D'li konsantrasyonlarında sarı, yumuşak ve dağılgan bir

tekstürde kallus oluşu gözlemlendi Ancak denenen tüm sitokinin ve oksin kombinasyonları arasında hem kök (Şekil 4.3) hem de yaprak eksplantlarında (Şekil 4.4) hücre süspansiyon kültürlerinin eldesi için kullanılabilir en uygun kallus oluşumu (sarı yumuşak ve dağılgan tekstürde) 1 mg/l Kin ile 1 mg/l 2,4D destekli MS besi ortamından elde edilmiştir.



Şekil 4.4. Juvenil sakız (*P. lentiscus* L.) bitkisine ait aksenik yapraklardan kallus eldesi **A.** 1 mg/l KİN 1 mg/l 2,4 D içeren MS besi ortamında kültüre alınan tohum kökenli juvenil yaprak eksplantları, Bar: 0.9 cm., **B.** Kültürün 42. gününde yapraklardan gelişen kalluslar, Bar: 1 cm.

#### 4.2.2. Kallus kültürlerinin gelişiminin optimizasyonu çalışmalarına ait bulgular ve tartışma

##### 4.2.2.1. Farklı besi ortam tipinin etkisine ait bulgular

Juvenil kök ve yaprak eksplantlarından oluşturulan kallus dokularının en iyi gelişim ortamlarının tespit edilmesi amacıyla kök ve yaprak kökenli kallus dokuları tam güçlendirilmiş MS, SH, Gamborg-B5 ve WPM besi yerlerinin kullanıldığı ortamlarda kültüre alınmışlardır. Bu ortamlarda kültüre alınan kallus dokularının gelişimlerini ifade etmek için; kallus morfolojileri, ortalama yaş ve kuru ağırlık sonuçları kök için Çizelge 4.9 ve yaprak için Çizelge 4.10'de verilmiştir. Kallus dokularının gelişimine ait sonuçlar ise Şekil 4.3'te verilmiştir.

4 haftalık kültür gelişimi sonrasında farklı besi ortam tiplerini içeren ortamlarda büyümeye bırakılan kök eksplantlarının gelişimleri incelendiğinde, kallus eksplantlarının yaş ( $0.360 \pm 0.010$  mg) ve kuru ağırlık ( $0.035 \pm 0.010$  mg) ortalamaları bakımından en yüksek değerlerin, WPM besi yerinin kullanıldığı ortamdan elde edildiği fakat bu ortamlarda gelişen kalluslarda hacimce elde edilen büyümeyi kararmaların takip ettiği gözlenmiştir. Yine aynı şekilde Gamborg-B5 besi ortamı kullanılan ortamlarda gelişen kalluslarda da kararmalar olduğu ve bu kallusların sert bir yapı

gösterdiği tespit edilmiştir. SH besi yerinin kullanıldığı ortamda gelişen kalluslar da yine kahverengileşen ve sert yapıdaki kalluslar oluşmuştur. Kallus taze ( $0.177\pm 0.003$  mg) ve kuru ağırlıkları ( $0.018\pm 0.002$  mg) bakımından nispeten daha düşük değerler gösterse de MS besiyeri ortamında kültüre alınan kallusların morfolojik olarak istenilen nitelikte (sarı ve sert olmayan) olduğu gözlenmiştir (**Çizelge 4.9**).

**Çizelge 4.9.** Juvenil kök kalluslarının gelişimi üzerine farklı besi ortamlarının (Her biri 1 mg/l Kin + 1 mg/l 2,4 D destekli MS, SH, B5 ve WPM) etkisi

Farklı Besi ortamı	Kallus Gelişimi	Ortalama Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi
MS (Kontrol)	100.00±0.00a	0.177±0.003 d	0.018±0.002 a	Koyu Sarı-Yumuşak
SH	100.00±0.00a	0.210±0.005 c	0.020±0.005 a	Kahverengi, sert
Gamborg-B5	100.00±0.00a	0.310±0.005 b	0.025±0.010 a	Sarı-kahve, çoğunda kararmalar var, sert
WPM	100.00±0.00a	0.360±0.010 a	0.035±0.010 a	Hepsinde kararma var ancak hacimce büyüme gözlendi

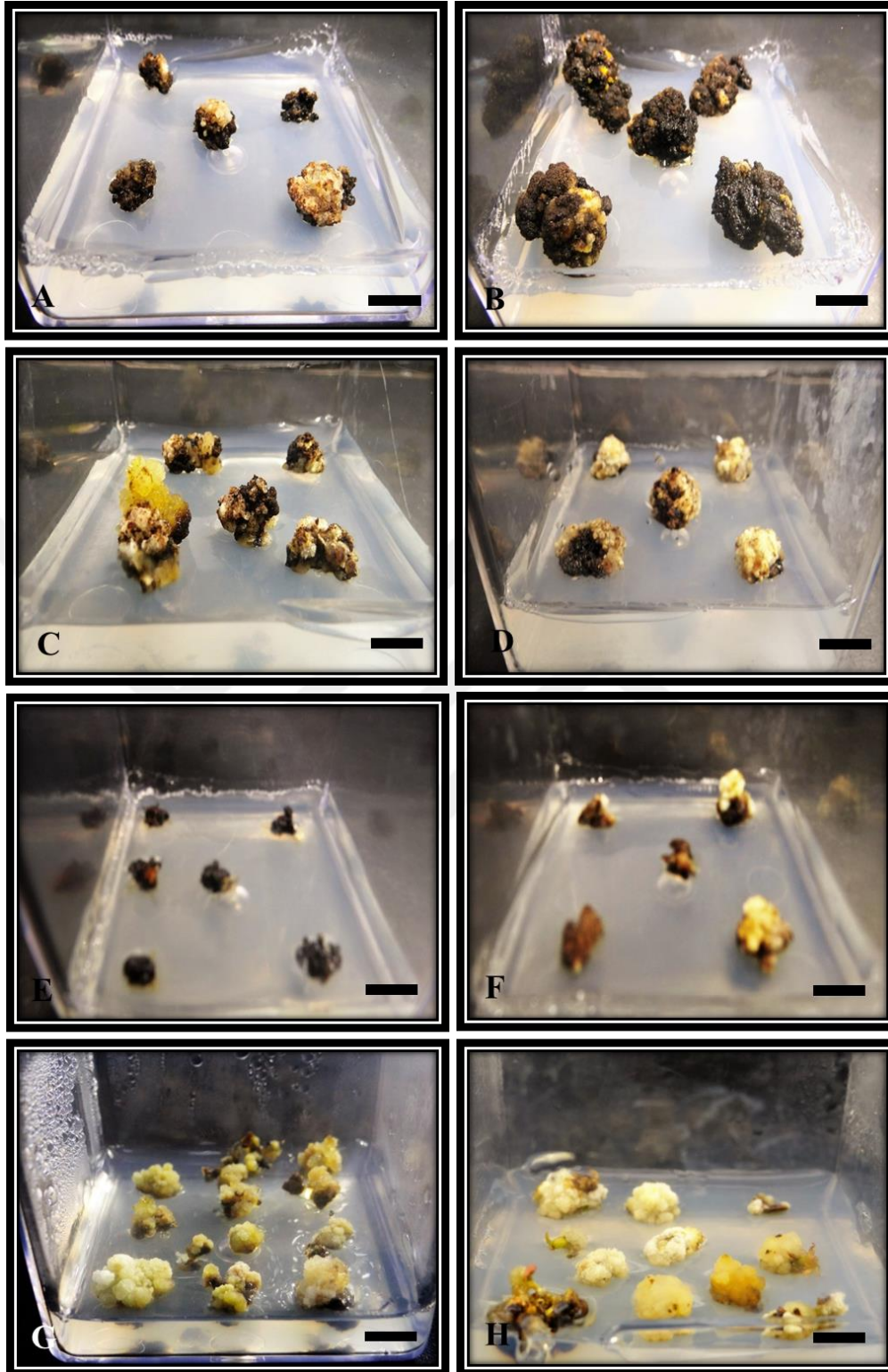
Veriler kültürün 28. gününde 25 eksplantın ortalamasını göstermektedir. Bir kolondaki farklı harfler işlemin Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

Yaprak eksplantlarından elde edilen kalluslar irdelendiğinde, en yüksek ortalama kallus taze ( $0.640\pm 0.005$  mg) ve kuru ağırlık ( $0.075\pm 0.015$  mg) değerleri Gamborg-B5 besi yerinde gelişen kallus dokularından elde edilmiştir. Fakat bu kallusların morfolojik olarak kahverengimsi ve sert yapıda olduğu gözlemlenmiştir. Aynı şekilde SH besi ortamında gelişen kallusların da MS ortamında gelişen kalluslardan taze ve kuru ağırlıkça daha yüksek miktarda olduğu, ancak bu ortamlarda kültüre bırakılan kallus yapılarının benzer şekilde kahverengi ve sert bir dokuda olduğu ve alt kültürlemede bu özelliklerini yitirmedikleri tespit edilmiştir (**Şekil 4.3 A-H**). Dolayısı ile bu çalışmada MS besi ortamında gelişen kallusların taze ( $0.460\pm 0.030$  mg) ve kuru ağırlık ( $0.043\pm 0.05$  mg) bakımından daha düşük değerlere sahip olsalar dahi morfolojik yönden istenen özellikte kalluslar oluşturduğu ve yapılan alt kültürleme çalışmalarında bu özelliklerini korudukları gözlenmiştir (**Çizelge 4.10**).

**Çizelge 4.10.** Juvenil yaprak kalluslarının gelişimi üzerine farklı besi ortamlarının (MS, SH, B5 ve WPM) etkisi.

Farklı Besi ortamı	Kallus Gelişimi	Ortalama Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi
MS (Kontrol)	100.00±0.00a	0.460±0.030b	0.043±0.05 c	Sarı, yumuşak
SH	100.00±0.00a	0.480±0.010 b	0.050±0.010 b	Sarı-kahverengi, sert
Gamborg-B5	100.00±0.00a	0.640±0.005 a	0.075±0.015 a	Sarı-kahverengi, sert
WPM	100.00±0.00a	0.190±0.010 c	0.006±0.001 d	Koyu kahverengi, sert

Veriler kültürün 28. gününde 25 eksplantın ortalamasını göstermektedir. Bir kolondaki farklı harfler işlemin Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.



**Şekil 4.3.** Farklı besi ortamlarında (MS, SH, B5 ve WPM) kültüre alınan juvenil kök ve yaprak kallus dokularının gelişimi **A.** Gamborg ortamında gelişen kök kallusları, Bar: 1 cm., **B.** Gamborg ortamında gelişen yaprak kallusları, Bar: 0.9 cm., **C.** SH ortamında gelişen kök kallusları, Bar: 0.9 cm., **D.** SH ortamında gelişen yaprak kallusları, Bar: 1.1 cm., **E.** WPM ortamında gelişen kök kallusları, Bar: 1.1 cm., **F.** WPM ortamında gelişen yaprak kallusları, Bar: 0.9 cm., **G.** MS ortamında gelişen kök kallusları, Bar: 1.1 cm., **H.** MS ortamında gelişen yaprak kallusları, Bar: 1.2 cm.

#### 4.2.2.2. Farklı besi ortamı kuvvetlerinin etkisine ait bulgular

Juvenil kök ve yaprak eksplantlarından oluşturulan kallus dokularının en iyi gelişim ortamlarının tespit edilmesi amacıyla, kök ve yaprak kökenli kallus dokuları farklı besin ortamı (1/4- 1/2- 1 ve 2) kuvvetlerine ayarlanan besi ortamlarında kültüre alınmıştır. Farklı besi ortamı kuvvetlerinin kallus gelişimi, ortalama yaş ve kuru ağırlık ile kallus morfolojileri üzerine etkisinin incelendiği sonuçlar sırasıyla kök için **Çizelge 4.11** ve yaprak için **Çizelge 4.12**'de sunulmuştur.

**Çizelge 4.11**'de sunulan sonuçlar irdelendiğinde test edilen parametreler arasında kallus gelişim oranı en yüksek %80 ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D içeren 1/2 kuvvetteki MS, 1 tam kuvvetteki MS ve 1 tam kuvvetteki SH besi ortamlarında gözlenirken, en düşük kallus rejenerasyon oranı %24 ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D içeren 1/4 ve 1/2 kuvvet Gamborg besi ortamlarından elde edildi. Çalışılan farklı kuvvetteki besi ortamlarında taze ve kuru ağırlıkları arasında da diğer denemelerde olduğu gibi genellikle bir korelasyon gözlemlendi. Tüm parametreler içinde en yüksek taze ağırlık 1856.75±17.18 mg ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D içeren tam kuvvetteki MS besi ortamından elde edilirken, buna bağlı olarak en yüksek kuru ağırlık 241.37±22.25 mg ile yine aynı ortamdan elde edildi. Yapılan bu çalışmada, kallus oluşturma çalışmalarında olduğu gibi en başarılı sonuçlar, hücre süspansiyon kültürlerinin yapılabilmesi için tam kuvvetteki MS besi ortamından elde edildi.

**Çizelge 4.11.** Kök eksplantlarından elde edilen kallusların gelişimine farklı besi ortamı tipi ve kuvvetlerinin etkisi.

Besi Ortam Tipi	Besi Ortamı Kuvveti	Kallus Gelişimi	Kallus Taze Ağırlığı (mg)	Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi
MS	1/4	76 a	803.57±58.31 c	104.46±7.58 b	Kahverengi-Dağılan
	1/2	80 a	1255.10±75.85 b	163.16±9.86 b	Sarı Az Kahverengi Dağılan
	<b>1</b>	<b>80 a</b>	<b>1856.75±17.18 a</b>	<b>241.37±22.25 a</b>	<b>Sarı Açık Sarı- İyi Derecede Dağılan</b>
	2	28 e	231.71±25.08 e	30.12±3.26 d	Kararma-Az Dağılan
SH	1/4	28 e	157.14±23.77 f	20.42±3.09 d	Kahverengi-Orta Kararma-Dağılan
	1/2	40 c	103.11±11.23 f	13.39±1.33 e	Kararmış-Az Dağılan
	1	80 a	276.00±36.03 e	35.88±4.68 d	Kahverengi-Sert
	2	36 d	206.66±23.92 e	26.86±3.10 d	Kararma-Sert
Gamborg	1/4	24 e	336.66±21.08 d	43.76±2.74 c	Kahverengi-Kararma-Az Dağılan
	1/2	<b>24 e</b>	<b>241.66±42.53 e</b>	<b>31.41±5.52 c</b>	<b>Kahverengi-Kararma-Az Dağılan</b>
	1	40 c	130.26±24.42 f	17.42±1.21 e	Kararma-Az Dağılan
	2	40 c	86.25±12.24 g	11.25±1.46 e	Kararma- Az Dağılan
WPM	1/4	44 c	149.28±11.74 f	19.40±1.52 e	Az Kararmış-Dağılan
	1/2	40 c	65.21±12.20 g	8.45±1.25 f	Kararmış- Az Dağılan
	1	76 a	447.36±45.47 d	58.15±5.91 c	Kahverengi-Orta Kararma-Dağılan
	2	68 b	186.47±14.42 f	24.24±1.87 d	Kahverengi-Orta Kararma-Dağılan

Veriler kültürün 28. gününde 25 eksplantın ortalamasını göstermektedir. Bir kolondaki farklı harfler işlemin Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 4.12'**de sunulan sonuçlar irdelendiğinde test edilen parametreler arasında kallus gelişim oranı en yüksek %100 ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D içeren tam kuvvetteki MS ile tam ve iki kat kuvvetteki Gamborg besi ortamında gözlenirken, en düşük kallus rejenerasyon oranı %64 ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D içeren çeyrek ve iki kat kuvvetteki WPM, çeyrek, tam ve iki kat kuvvetteki SH, çeyrek ve yarım kuvvetteki Gamborg besi ortamlarında elde edildi. Çalışılan farklı kuvvetteki besi ortamlarında taze ve kuru ağırlıkları arasında genellikle bir korelasyon gözlemlendi. Özellikle çalışılan bütün kombinasyonlarda kuru ağırlığın taze ağırlığın ortalama %10' a yakın civarında olduğu rapor edildi. Bu kapsamda çalışılan tüm parametreler içinde en yüksek taze ağırlık  $244.30 \pm 18.86$  mg ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D içeren yarım kuvvetteki Gamborg besi ortamında elde edilirken, buna bağlı olarak en yüksek kuru ağırlık  $34.16 \pm 2.64$  mg ile yine aynı ortamda elde edildi. Yapılan bu çalışmada, her ne kadar kallus oluşturma çalışmalarında olduğu gibi en başarılı sonuçlar MS yerine Gamborg besi ortamından elde edilse de, elde edilen kallusların kararması ve daha sert bir yapı arz etmesi nedeniyle tercih edilmedi ve 2. sırada en yüksek kallus ağırlığı elde edilen tam kuvvetteki MS ortamı her iki eksplant için en iyi kallus geliştirme besi ortamı olarak kullanıldı.

**Çizelge 4.12.** Yaprak eksplantlarından elde edilen kallusların gelişimine besi ortamı tipi ve kuvvetlerinin etkisi.

Besi Ortam Tipi	Besi Ortamı Kuvveti	Kallus Gelişimi (%)	Kallus Taze Ağırlığı (mg)	Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi
MS	1/4	84 b	$76.40 \pm 9.64$ c	$10.69 \pm 1.34$ c	Kararma-Dağılgan
	1/2	84 b	$69.60 \pm 4.26$ c	$9.74 \pm 0.59$ c	Az Kararma-Dağılgan
	1	100 a	<b><math>119.75 \pm 26.74</math> b</b>	<b><math>16.76 \pm 3.74</math> b</b>	<b>Sarı Kahverengi-Dağılgan</b>
	2	84 b	$99.00 \pm 8.91$ bc	$13.86 \pm 1.24$ bc	Az Kararma-Dağılgan
SH	1/4	64 c	$62.50 \pm 7.48$ c	$8.75 \pm 1.04$ c	Kararma-Dağılgan
	1/2	84 b	$86.33 \pm 13.53$ c	$12.08 \pm 1.89$ c	Kararma- Dağılgan
	1	64 c	$81.25 \pm 10.87$ c	$11.37 \pm 1.52$ c	Az Sarı Kahverengi- Az Kararma- Dağılgan
	2	64 c	$93.33 \pm 8.76$ c	$13.06 \pm 1.22$ c	Kararma- Dağılgan
Gamborg	1/4	64 c	$78.80 \pm 7.63$ c	$11.03 \pm 1.06$ c	Kararma- Dağılgan
	1/2	64 c	$244.30 \pm 18.86$ a	$34.16 \pm 2.64$ a	Orta Sarı Kahverengi-Az Kararma Dağılgan
	1	100 a	$72.33 \pm 8.83$ c	$10.12 \pm 1.23$ c	Kahverengi-Kararma-Sert
	2	100 a	$60.30 \pm 20.20$ c	$8.40 \pm 2.80$ c	Kahverengi-Kararma Orta Gelişim- Dağılgan
WPM	1/4	64 c	$76.66 \pm 8.81$ c	$10.73 \pm 1.23$ c	Kararma- Dağılgan
	1/2	84 b	$79.50 \pm 10.58$ c	$11.13 \pm 1.48$ c	Kararma-Gelişim Az- Dağılgan
	1	84 b	$89.75 \pm 5.94$ c	$12.56 \pm 0.83$ c	Kararma-Gelişim Az- Dağılgan
	2	64 c	$46.66 \pm 8.81$ c	$6.53 \pm 1.23$ c	Kararma- Dağılgan

Veriler kültürün 28. gününde 25 eksplantın ortalamasını göstermektedir. Bir kolondaki farklı harfler işlemin Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

#### 4.2.2.3. Farklı karbon kaynağı ve konsantrasyonun etkisine ait bulgular

Juvenil kök ve yaprak eksplantlarından oluşturulan kallus dokularının en iyi gelişim ortamlarının tespit edilmesi amacıyla kök ve yaprak kallusları, farklı karbon kaynağı (glukoz ve sukroz) ve bunların farklı konsantrasyonları (15, 30 ve 50 gr/l) ile desteklenmiş MS besi ortamında kültüre alındı. Belirtilen farklı tip ve karbon kaynaklarının kültüre alınan kallus dokularının gelişimlerine etkisini ifade etmek için; ortalama taze ve kuru ağırlık ve kallus morfolojilerine ait sonuçlar kök için **Çizelge 4.13** ve yaprak için **Çizelge 4.14**'te sunulmuştur.

Kök kalluslarının gelişimi üzerine farklı karbon kaynağı ve konsantrasyonun etkisinin sunulduğu **Çizelge 4.13** irdelendiğinde, 15 gr sukroz destekli besi ortamında  $0.498 \pm 0.04$  gr yaş ağırlık hesaplanırken,  $0.055 \pm 0.004$  gr kuru ağırlık hesaplanmıştır. Bununla birlikte normal proliferasyon besi ortamında kullanılan 30 gr sukroz destekli besi ortamında ise  $0.491 \pm 0.034$  gr yaş ağırlık hesaplanırken,  $0.054 \pm 0.004$  gr kuru ağırlık hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde kök kalluslarının gelişiminde 15 gr sukroz destekli besi ortamında en yüksek yaş ve kuru ağırlık hesaplanırsa da, 30 gr sukroz destekli besi ortamında hesaplanan yaş ve kuru ağırlık arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark gözlenmemiştir. Kallus gelişimi morfolojik bakımdan irdelendiğinde ise, yüksek glukoz ve sukroz konsantrasyonlarında (50 gr) kalluslarda kararmalar meydana geldiği görülmüştür.

**Çizelge 4.13.** Farklı şeker tipi ve miktarlarının kök kallus gelişimine etkisi

Şeker Tipi ve Miktarı (gr)	Yaş Ağırlık (gr)	Kuru Ağırlık (gr)
<b>Glukoz 15</b>	$0.133 \pm 0.006d$	$0.015 \pm 0.001d$
<b>Glukoz 30</b>	$0.245 \pm 0.019c$	$0.028 \pm 0.002c$
<b>Glukoz 50</b>	$0.160 \pm 0.010d$	$0.018 \pm 0.002d$
<b>Sukroz 15</b>	$0.498 \pm 0.040a$	$0.055 \pm 0.004a$
<b>Sukroz 30</b>	$0.491 \pm 0.034a$	$0.054 \pm 0.004a$
<b>Sukroz 50</b>	$0.337 \pm 0.022b$	$0.037 \pm 0.002b$

Veriler kültürün 28. gününde 25 eksplantın ortalamasını göstermektedir. Bir kolondaki farklı harfler işlemin Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

Yaprak kalluslarının gelişimi üzerine farklı karbon kaynağı ve konsantrasyonun etkisinin sunulduğu **Çizelge 4.14** irdelendiğinde, 15 gr sukroz destekli besi ortamında  $0.738 \pm 0.044$  gr yaş ağırlık hesaplanırken,  $0.081 \pm 0.005$  gr kuru ağırlık hesaplanmıştır. Bununla birlikte normal proliferasyon besi ortamında kullanılan 30 gr sukroz destekli besi ortamında ise  $0.311 \pm 0.021$  gr yaş ağırlık hesaplanırken,  $0.034 \pm 0.002$  gr kuru

ağırlık hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde yaprak kalluslarının gelişiminde yüksek yaş ve kuru ağırlık 15 gr sukroz destekli besi ortamı diğer besi ortamlarına göre farklılık gösterirken, en yüksek ikinci yaş ve kuru ağırlıkların hesaplandığı 15 gr glikoz ve 30 gr sukroz destekli besi ortamlarında yaş ve kuru ağırlık bakımından istatistiksel bir fark hesaplanmamıştır. Kallus gelişimi morfolojik olarak irdelendiğinde yüksek glukoz ve sukroz konsantrasyonlarında (50 gr) kalluslarda kararmalar meydana gelmiştir.

**Çizelge 4.14.** Farklı şeker tipi ve miktarlarının yaprak kallus gelişimine etkisi

Şeker Tipi ve Miktarı (gr)	Yaş Ağırlık (gr)	Kuru Ağırlık (gr)
<b>Glukoz 15</b>	0.389±0.045b	0.036±0.003b
<b>Glukoz 30</b>	0.221±0.015d	0.024±0.002d
<b>Glukoz 50</b>	0.110±0.005e	0.018±0.002e
<b>Sukroz 15</b>	0.738±0.044a	0.081±0.005a
<b>Sukroz 30</b>	0.311±0.021b	0.034±0.002b
<b>Sukroz 50</b>	0.261±0.020c	0.029±0.002c

Veriler kültürün 28. gününde 25 eksplantın ortalamasını göstermektedir. Bir kolondaki farklı harfler işlemin Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

#### 4.2.2.4. Farklı pH etkisine ait bulgular

Juvenil kök ve yaprak eksplantlarından oluşturulan kallus dokularının en iyi gelişim ortamlarının tespit edilmesi amacıyla ise, kök ve yaprak kökenli kallus dokuları farklı pH (4.5-5-5.8-6 ve 7) kuvvetlerine ayarlanan ve sırasıyla %3 ve %1,5 sukroz içeren MS besi ortamlarında kültüre alınmıştır. Belirtilen pH'larda kültüre alınan kallus dokularının gelişimlerini ifade etmek için; ortalama taze ve kuru ağırlık ile kallus morfolojilerine ait sonuçlar kök için **Çizelge 4.15** ve yaprak için **Çizelge 4.16**'da sunulmuştur.

**Çizelge 4.15**'te sunulan sonuçlar irdelendiğinde, test edilen parametreler arasında kallus gelişimi oranı en yüksek %100 ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D desteklenmiş MS besi ortamlarında, ortamın pH'sının pH 5 ve 7' ye ayarlandığı kültürlerde gözlemlendi. Özellikle kök eksplantlarında pH arttıkça kallus gelişiminde artış gözlemlendi. Farklı pH' larda kültüre alınan kök kallus kültürlerinde taze ve kuru ağırlık değerleri arasında genellikle bir korelasyon gözlemlendi. Özellikle çalışılan tüm pH'larda kuru ağırlığın taze ağırlığın ortalama %10' a yakın civarında olduğu belirlendi. Bu kapsamda çalışılan tüm parametreler içinde en yüksek taze ağırlık 1065.96±62.79 mg ile pH 7'ye ayarlanan 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D destekli MS besi ortamından elde

edilirken, buna bağılı olarak en yüksek kuru ağırlık 138.57±8.16 mg ile yine aynı pH değerinden elde edildi. Kök kalluslarında yüksek pH değerlerinden (pH 6 ve 7) elde edilen sonuçlar kallus gelişimi, taze ve kuru ağırlık denemeleri bakımından yüksek bir oran göstermiş, ancak yüksek pH kuvvetlerinde genellikle yüksek oranda kararmalar tespit edildiğinden, kallus oluşumu ve gelişimi için en iyi pH değerinin pH 5.8 kuvveti olduğuna karar verildi.

**Çizelge 4.15.** Kök eksplantlarından elde edilen kallusların gelişimine farklı pH' nın etkisi.

Farklı Ph	Kallus Gelişimi	Kallus Taze Ağırlığı (mg)	Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi
4.5	76 b	772.05±73.41 b	100.36±9.54 b	Sarı A. Kahverengi-Dağılgan-Gelişimi İyi
5	100 a	739.64±53.64 b	96.15±6.97 b	A. Sarı-Kararma-Dağılgan-Gelişimi İyi
<b>5.8</b>	<b>96 a</b>	<b>872.00±67.18 b</b>	<b>113.36±8.73 b</b>	<b>Sarı -Dağılgan-Gelişimi İyi</b>
6	76 b	912.75±44.59 ab	118.65±5.79 ab	A. Sarı-Çok Dağılgan-Gelişimi İyi
7	100 a	1065.96±62.79 a	138.57±8.16 a	Sarı Kahverengi-Kararma-Dağılgan- Gelişimi İyi

Veriler kültürün 28. gününde 25 eksplantın ortalamasını göstermektedir. Bir kolondaki farklı harfler işlemin Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 4.16'**da sunulan sonuçlar irdelendiğinde, test edilen parametreler arasında %100 kallus gelişimi oranı denenen bütün pH kuvvetlerinde, 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D destekli MS besi ortamlarında kültüre alınan kalluslardan elde edildi. Özellikle yaprak eksplantlarında pH kuvveti artıka kallus gelişimlerinde azalma gözlemlendi. Farklı pH kuvvetlerinde kültüre alınan yaprak kökenli kallusların taze ve kuru ağırlıkları arasında genellikle bir korelasyon gözlemlendi. Bu kapsamda çalışılan tüm parametreler içinde en yüksek taze ağırlık 335.64±33.55 mg ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D destekli pH 5'e ayarlanmış MS besi ortamından elde edilirken, en yüksek kuru ağırlık ise 40.27±4.02 mg ile yine aynı pH değerinden elde edildi. Yaprak ve kök kökenli kallusların tüm pH değerleri bakımından sonuçları karşılaştırıldığında, yaprak kökenli kallusların daha iyi bir gelişim gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak morfolojik olarak yüksek pH kuvvetlerinde kalluslarda kararmalar gözlemlendiğinden, kallus ve gelişimi bakımından en iyi pH kuvvetinin pH 5.8 olduğuna karar verildi.

**Çizelge 4.16.** Yaprak eksplantlarından elde edilen kallusların gelişimine farklı pH' nın etkisi.

pH	Kallus Gelişimi	Kallus Taze Ağırlığı (mg)	Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi
4.5	100 a	97.32±11.28 b	11.67±1.35 b	Az Kahverengi-Dağılgan-Gelişim İyi
5	100 a	335.64±33.55 a	40.27±4.02 a	Sarı-Dağılgan-Gelişimi Normal
5.8	<b>100 a</b>	<b>107.56±10.88 b</b>	<b>12.90±1.30 b</b>	<b>Az Kararma-Sarı Kahverengi-Gelişimi İyi</b>
6	100 a	123.44±12.03 b	14.81±1.44 b	Kararma Çok-Kahverengi-Sert
7	100 a	94.80±11.07 b	11.37±1.32 b	Az Kararma-Kahverengi-Az Dağılgan

Veriler kültürün 28. gününde 25 eksplantın ortalamasını göstermektedir. Bir kolondaki farklı harfler işlemin Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

#### 4.2.2.5. Farklı ışık yoğunluklarının etkisine ait bulgular

Kallus dokularının yine en iyi gelişim ortamlarının tespit edilmesi amacıyla, kök ve yaprak kökenli kallus dokuları bu kez farklı ışık [20 (karanlık) 40 ve 80  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-2}$ ] yoğunluklarında inkübasyona alındı. Belirtilen ışık yoğunluklarında kültüre alınan kallus dokularının gelişimlerini ifade etmek için; ortalama taze ve kuru ağırlık ile kallus morfolojilerine ait sonuçlar **Çizelge 4.17** ve **Çizelge 4.18**'de sunulmuştur.

**Çizelge 4.17**' de sunulan sonuçlar irdelendiğinde, test edilen parametreler arasında 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D destekli MS besisi ortamında denenen 3 farklı ışık yoğunluğundaki tüm kültürlerde %100 kallus gelişimi gözlemlendi. Özellikle kök eksplantlarında, yaprak eksplantlarının aksine ışık yoğunluğu azaldıkça kallus gelişiminde bir artışın olduğu gözlemlendi. Bu kapsamda çalışılan tüm parametreler içinde en yüksek taze ağırlık 597.2±45.98 mg ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D destekli MS besisi ortamında 20  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-2}$  ışık yoğunluğunda elde edilirken, en yüksek kuru ağırlık değeri 71.66±5.51 mg ile yine aynı ışık yoğunluğundan elde edildi. Gelişen kalluslarda, ışık yoğunluğu arttıkça kararmaların oluştuğu tespit edildi.

**Çizelge 4.17.** Kök eksplantlarından elde edilen kallusların gelişimine farklı ışık yoğunluğunun etkisi.

Farklı Işık Oranı Mmol	Kallus Gelişimi (%)	Kallus Taze Ağırlığı (mg)	Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi
20	100 a	597.2±45.98 a	71.66±5.51 b	İyi Gelişim-Kahverengi-Dağılgan
40	100 a	512.04±33.70 a	61.44±4.04 b	Orta Gelişim-Az Kahverengi-Orta Dağılgan-Az Kararma
80	100 a	310.68±18.93 b	37.28±2.27 a	Orta Gelişim-Kahverengi Sarı-Orta Dağılgan-Az Kararma

Veriler kültürün 28. gününde 25 eksplantın ortalamasını göstermektedir. Bir kolondaki farklı harfler işlemin Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 4.18'** de sunulan sonuçlar irdelendiğinde, kök eksplantlarında olduğu gibi farklı ışık yoğunluğu uygulanan tüm kültürlerde test edilen parametreler arasında kallus gelişimi en yüksek %100 ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D destekli MS besi ortamında gözlemlendi. Özellikle yaprak eksplantlarında kök eksplantlarının aksine ışık yoğunluğu arttıkça kararmaların azaldığı ve kallus gelişiminde artışların olduğu tespit edildi. Farklı ışık yoğunluklarında inkübe edilen yaprak kallus kültürlerinde taze ve kuru ağırlıklar arasında da genellikle bir korelasyon gözlemlendi. Bu kapsamda çalışılan tüm parametreler içinde en yüksek taze ağırlık  $311.4 \pm 26.5$  mg ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D destekli MS besi ortamı ve  $80 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-2}$  ışık yoğunluğu uygulanan kültürlerden elde edilirken, buna bağlı olarak en yüksek kuru ağırlık  $29.47 \pm 2.79$  mg ile yine ışık yoğunluğu uygulanan kültürlerden elde edildi. Gelişen kalluslarda da, ışık yoğunluğu arttıkça kararmaların azaldığı görüldü.

**Çizelge 4.18.** Yaprak eksplantlarından elde edilen kallusların gelişimine farklı ışık yoğunluğunun etkisi.

Farklı Işık Oranı $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-2}$	Kallus Gelişimi (%)	Kallus Taze Ağırlığı (mg)	Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi
20	100 a	97.3±9.23 b	9.32±0.94 b	Tam Kararma
40	100 a	84.7±7.85 b	8.92±0.72 b	Tam Kararma
80	100 a	311.4±26.5 a	29.47±2.79 a	Az Kararma

\*Veriler kültürün 28. gününde 25 eksplantın ortalamasını göstermektedir. Bir kolondaki farklı harfler işlemin Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 4.17** ve **4.18** irdelendiğinde yaprak ve kök kaynaklı kalluslarda en iyi gelişimin görüldüğü ışık yoğunlukları arasındaki farkın, köklerin toprak altı bir organ olması nedeniyle düşük şiddetteki ışık yoğunluğuna (karanlık), yaprakların ise toprak üstü bir organ olması nedeniyle görece daha yüksek şiddetteki ışık yoğunluğuna ihtiyaç duymasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

#### 4.2.2.6. Farklı sıcaklıkların etkisine ait bulgular

Kallus dokularının en iyi gelişim ortamlarının tespit edilmesi amacıyla ise, kök ve yaprak kökenli kallus dokuları farklı sıcaklıklarda (10- 20- 25- 30 ve 35 °C) inkübasyona alındı. Belirtilen sıcaklıklarda kültüre alınan kallus dokularının gelişimlerini ifade etmek için; ortalama taze ağırlık, ortalama kuru ağırlık ve kallus morfolojilerine ait sonuçlar kök için **Çizelge 4.19** ve yaprak için **Çizelge 4.20'**de sunulmuştur.

**Çizelge 4.19'**da sunulan sonuçlar irdelendiğinde, farklı sıcaklık uygulanan tüm kültürlerde test edilen parametreler arasında kallus gelişim oranı en yüksek %100 ile 1

mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D destekli MS besisi ortamında gözlemlendi. Gelişim oranı en düşük %76 ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D destekli MS besisi ortamında gözlemlendi. Özellikle kök eksplantlarında sıcaklık arttıkça kararmaların arttığı ve farklı sıcaklıklarda inkübe edilen kök kallus kültürlerinde genellikle korelasyon olduğu gözlemlendi. Bu kapsamda çalışılan tüm parametreler içinde en yüksek taze ağırlık 567.70±32.98 mg ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D destekli MS besisi ortamında 25 °C' sıcaklık uygulanan kalluslardan elde edilirken, en yüksek kuru ağırlık 73.80±4.28 mg ile yine sıcaklık uygulamasından elde edildi. Bu bağlamda her ne kadar gelişim oranı test edilen diğer parametrelere oranla düşük olsa da, en yüksek taze ve kuru ağırlık değerleri ile sarı renkli dağılgan yapıda kallus oluşumu, bu sıcaklık derecesinden elde edildiği için tez kapsamında gerçekleştirdiğimiz tüm çalışmalarda kültürler 25 °C sıcaklık uygulaması yapılmıştır.

**Çizelge 4.19.** Kök eksplantlarından elde edilen kallusların gelişimine farklı sıcaklıkların etkisi

Farklı Sıcaklık (°C)	Kallus Gelişimi	Kallus Taze Ağırlığı (mg)	Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi
10	96 a	163.75±13.47 c	21.28±1.75 c	Gelişimleri İyi Değil-Sarı Kahverengi-Dağılgan
20	100 a	229.48±16.03 c	29.83±2.08 c	Gelişimleri İyi-Sarı Kahverengi-Dağılgan
25	<b>76 b</b>	<b>567.70±32.98 a</b>	<b>73.80±4.28 a</b>	<b>Gelişimleri Çok İyi-Sarı-Dağılgan</b>
30	100 a	351.88±29.15 b	45.74±3.78 b	Gelişimleri İyi Değil-A. Sarı Kahverengi-Dağılgan-Kararmalar Var
35	100 a	380.56±31.12 b	49.47±4.04 b	Gelişimleri Az İyi-Sarı Kahverengi-Dağılgan-Kararmalar Var

Veriler kültürün 28. gününde 25 eksplantın ortalamasını göstermektedir. Bir kolondaki farklı harfler işlemin Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 4.20'**de sunulan sonuçlar irdelendiğinde ise, test edilen tüm parametreler arasında kallus gelişim oranı en yüksek %100 ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D destekli MS besisi ortamında gözlemlendi. Özellikle yaprak eksplantlarında düşük ve yüksek sıcaklıklarda kararmaların meydana geldiği gözlemlendi. Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen yaprak kökenli kallus kültürlerinde taze ve kuru ağırlıkları arasında genellikle bir korelasyon gözlemlendi. Bu kapsamda çalışılan tüm parametreler içinde en yüksek taze ağırlık 259.80±18.61 mg ile 20 °C sıcaklık uygulanan kültürlerden elde edilirken, en yüksek kuru ağırlık değeri 33.77±2.41 mg ile yine sıcaklık uygulamasından elde edildi. Bu bağlamda her ne kadar kuru ve taze ağırlık bakımından maksimum sonuçlar 20°C sıcaklık uygulamasından elde edilmiş ise de, bu sıcaklık uygulamasından elde edilen

kallusların tekstürlerinin 25°C sıcaklık uygulanan kültürlere oranla daha sert bir yapı arz etmesi nedeniyle, tez kapsamında gerçekleştirdiğimiz tüm çalışmalarda kültürlere 25°C sıcaklık uygulaması yapılmıştır.

**Çizelge 4.20.** Yaprak eksplantlarından elde edilen kallusların gelişimine farklı sıcaklıkların etkisi.

Farklı Sıcaklık (°C)	Kallus Gelişimi	Kallus Taze Ağırlığı (mg)	Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Morfolojisi
10	100 a	62.72±8.46 b	8.15±1.10 b	Kararmış Dağılgan
20	100 a	259.80±18.61 a	33.77±2.41 a	Orta Kararma-Orta Sert
25	<b>100 a</b>	<b>77.28±5.52 b</b>	<b>10.04±0.71 b</b>	<b>Orta Kararma-Dağılgan</b>
30	100 a	85.72±7.84 b	11.14±1.02 b	Kararma-Yüksek Sert
35	100 a	130.2±13.24 a	16.92±1.72 a	Kararma-Dağılgan

Veriler kültürün 28. gününde 25 eksplantın ortalamasını göstermektedir. Bir kolondaki farklı harfler işlemin Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

Aksenik juvenil eksplantlardan kallus kültürlerinin başlatılması çalışmalarında, optimizasyon uygulanmış kültürler sekonder metabolit üretimi çalışmaları için önem arz etmektedir. İlaç bileşenlerine olan ihtiyacın artması, alternatif olarak kullanılabilir diğer yöntemlerin keşfini gerektirmiştir. Bu bağlamda hammadde temininde kullanılan geleneksel yöntemlere alternatif olarak kullanılabilir diğer bir yöntem ise farklılaşmamış hücrelerden üretimdir. Başarılı bir kallus oluşumu genotipe ve dışarıdan uygulanan büyüme düzenleyicilerinin etkisine bağlıdır.

Kallus kültürlerinin başlatılması için genellikle sağlıklı ve aktif olarak bölünen (meristematik) hücreleri içeren çoğunlukla nod, yaprak ve embriyo gibi genç bitki kısımları ideal eksplant kaynaklarıdır. Ancak kallus ya da hücre süspansiyon kültüründe sekonder metabolit miktarının artırılması çalışmalarında kullanılacak eksplant tipi seçiminde, arzu edilen sekonder metabolitin bitkide sentezlendiği yer dikkate alınmalıdır. Birçok bitkide başlatılan kallus ve süspansiyon kültürlerinde kullanılan eksplant tipi çalışmanın amacına göre farklılıklar arz etmektedir. Örneğin *Allium chinense*, *Zea Mays* ve *Scrophularia striata* Boiss. bitkilerinden kallus kültürlerinin başlatılabilmesi için en uygun eksplant tipinin yapraklar olduğu bildirilirken (Yan ve ark., 2009, Omer ve ark., 2012, Khanpour-Ardestani ve ark., 2015) *Corylus avellana* bitkisinden taksol üretimi amacıyla süspansiyon kültürlerinin başlatılabilmesi için en uygun eksplant tipinin embriyo olduğu bildirilmiştir (Bestoso ve ark., 2006). *Catharanthus roseus* bitkisinin, anter, yaprak ve meristem eksplantlarıyla yapılan bir araştırmada, hücre kültürlerindeki alkaloidlerin sentez ve birikimi ile tiplerinin, farklı

orjinden gelen hücre hatlarında önemli ölçüde farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir (Constanbel, 1982). Yapısında biyoaktif bileşenler barındıran *Armeria maritima* bitkisinde kallus kültürlerinin başlatılması için ise en iyi eksplant tipinin aksenik fidelerden elde edilen genç kök ve yapraklar olduğu rapor edilmiştir (Gourguillon ve ark., 2016). Tez çalışmamızda ise eksplant tipi olarak Gourguillon ve ark., (2016)'na benzer şekilde kök ve yapraklar kullanılmış ve başarılı bir şekilde kalus kültürü başlatılmıştır.

Büyüme düzenleyici tipi ve besiyerindeki derişimi ağırlıklı olarak eksplantın türüne ve potansiyel endojen hormon içeriğine bağlıdır. Genel olarak *Pistacia* cinsi ile ilgili kallus oluşumu ve gelişimi ile ilgili sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmalardan birinde 1 mg/l BA ya da TDZ ile 1 mg/l NAA eklenmiş WPM besi ortamında kültüre alınan *Pistacia atlantica* Desf. subsp. *kurdica* Rech. (Çitlembik) bitkisinin çiçek eksplantlarından %100 kallus oluşumu rapor edilmiştir (Aghaei ve ark., 2013). Yine Sakız bitkisi ile aynı cins içerisinde yer alan antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) bitkisinde somatik embriyogenez başlatılması ile ilgili bir çalışmada yaprak eksplantlarından kallus dokularının uyarılması TDZ'nin güçlü bir ajan olabileceği rapor edilmiştir (Onay ve ark., 2011).

Sakız ağacının in vitro kriyoprezervasyonu üzerine yaptıkları çalışmada sakız tohumları BBD içermeyen MS (MS0) besi ortamında çimlendirildiği ve sitokinin içeren ortamlarda kültürlenmiş tohumlardan kallus oluşumunun meydana geldiğini rapor etmişlerdir (Koç ve ark., 2014b). Bu tez kapsamında, juvenil sakız eksplantlarından kallus dokularının oluşumu ile ilgili yaptığımız denemelerde ise, test edilen tüm eksplant tiplerinde en iyi kallus oluşum oranının genellikle 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D içeren MS besi ortamından elde edildiği gözlenmiştir.

Kallus kültürlerinin optimizasyonu çalışmalarında test ettiğimiz bir diğer parametre olan farklı besi ortamlarının kallus oluşumuna etkisinin incelendiği çalışmalar irdelendiğinde ise, farklı bitki türlerinde kullanılan farklı besi ortam tiplerinin, kallus oluşumu bakımından farklı sonuçlar verdiği görülmektedir. Bu durumun nedenleri arasında kullanılan besi ortamlarının içeriklerinin ve konsantrasyonlarının farklı olması ve kallus gelişimi üzerinde bu faktörlerin etkilerinin olması sayılabilir. Bais ve ark. (2001), çalışmalarında kullandıkları diğer ortamlarla karşılaştırıldığında en yüksek kallus oluşum oranının, 2,4-D ve Kin ile desteklenmiş MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarından elde edildiğini rapor etmiştir. Literatür bilgileri ışığında, kallus oluşturma çalışmalarında, düşük ve yüksek

konsantrasyonlarında oksin-sitokin kombinasyonları kullanılarak kallus oluşturma çabalarında hem nicelik hem de nitelik bakımından farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Bununla birlikte tez çalışmamızda yaptığımız denemeler kapsamında elde edilen verilerin paralelinde, literatürde, *Melissa officinalis* L. ile yapılan hipokotillerden kallus oluşturma çalışmalarında, 0.5 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D kombinasyonundan en yüksek (%80 oranında) kallus oluşumu sağlanırken, 0.5 mg/l BAP ve 2 mg/l NAA kombinasyonundan %28 kallus elde edilmiştir (Meftahizade ve ark., 2010). Yine, *Allium chinense*'de 0.1 mg/l BAP ile 0.5 mg/l 2,4-D'de kallus oluşumu %41.8 iken aynı BAP konsantrasyonu ile 3 mg/l 2,4-D kombinasyonunda ise kallus oluşumu %11'e düşmüştür (Yan ve ark., 2010). Farklı sitokin-oksin kombinasyonlarının yaprak eksplantlarından kallus oluşumuna etkisinin incelendiği bir diğer çalışmada ise *Catharanthus roseus* bitkisi 2 mg/l Kin ve 2 mg/l 2,4-D içeren MS besi ortamında kültüre alındığında ortalama 100 mg kuru kallus ağırlığı elde edilirken, 3 mg/l Kin ve 3 mg/l 2,4-D kombinasyonundan ise ortalama 25 mg kuru kallus ağırlığı elde edilmiştir (Kalidass ve ark., 2010). Tez bulgularımıza paralel olarak, Farjaminezhad ve ark., (2013) İran gelinciği (*Papaver bracteatum*) bitkisinin hücre süspansiyon kültürlerini başlatmak için, farklı BBD (2,4-D, NAA, BAP ve Kin)'lerin kallus oluşumu üzerindeki etkilerini değerlendirdikleri çalışmada, maksimum kallus oluşum yüzdesinin (% 86.67) ve yaş kallus ağırlığının, 1 mg/l 2,4-D, 0,2 mg/l Kin ve 15 mg/l askorbik asit ile desteklenmiş MS ortamından elde edildiğini, ortama 15 mg/l askorbik asit eklenmesinin kallusların kahverengileşmesini azaltmada etkili olduğunu rapor etmişlerdir. *Zataria multiflora* bitkisinde MS besi ortamı ile karşılaştırıldığında, en iyi kallus gelişim oranının 0.75 mg/l BAP ve 75 mg/l glukoz ile desteklenmiş Gamborg B5 besi ortamından elde edildiği rapor edilmiştir. *Barringtonia racemosa* bitkisine ait yaprak eksplantlarının ise, 2 mg/l 2,4-D destekli WPM besi ortamında kırılğan yapıda kallus dokusu oluşturduğu bildirilmiştir (Behbahani ve ark., 2011).

Doğada bazı bitkiler daha asidik yada daha alkali seviyelere ihtiyaç duyabilmelerine rağmen, çoğu bitki için, optimum pH aralığı 5.5 ila 7.0 arasındadır. Bitki besin maddeleri, 5.0 'ten daha düşük bir pH değerine sahip ortamlarda genellikle yarayışsız olmakla birlikte, bu maddeler bitkiler tarafından en fazla 5.5 ila 7.0 pH aralığında kullanılabilirler (Perry, 2013). Ortam pH'sının sekonder metabolitlerin oluşumunu etkilediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin; *Bridelia retusa* (L.) Spreng bitkisinin süspansiyon kültürlerinde pH, ışık ve karbon kaynağı derecelenmelerinin antosiyanin sentezi üzerine olan etkilerinin incelendiği çalışmada

pH 5.0'te kültüre alınan hücrelerin daha fazla antosiyanin ürettiği rapor edilmiştir (Aswathy vd., 2018). Yine aynı araştırmacılar, pH 1 ve pH 4 aralığında ise artan sıcaklıkta birlikte antosiyanin bozunma oranının da arttığını bildirmişlerdir. Tatlı glikozitler bakımından zengin olmasının yanı sıra aynı zamanda flavonoid ve fenollerin bir kaynağı olan *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinde, çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri ve farklı pH düzeylerinin, toplam fenol ve flavonoidleri artırma potansiyelinin değerlendirildiği çalışmada pH 4.6 değerinin, yaprakta lokalize fenol ve flavonoidleri önemli derecede arttırdığını, farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin ve orta derecedeki pH değerlerinin ise sekonder metabolitlerin birikimini kuvvetle etkilediği tespit edilmiştir (Radić vd 2016). Tez çalışmamızda ise hem kök hem de yaprak kökenli kallusların oluşumu ve gelişiminin pH 5.8 kuvvetinde olumlu sonuçlar verdiği belirlenmiştir.

Kültüre edilen bitki kısımlarının büyümesi için optimal sıcaklık genellikle 17-25 °C aralığındadır. Ancak, her bitki türü farklı sıcaklıklarda optimum büyüme sergileyebilir. *Dolanigitalis trojana* Ivanina'nın kallus kültürlerinde, kardenolid birikimini ve termotoleransı indükleyen salisilik asit (SA) ve yüksek sıcaklık uygulamalarının etkileri test edilmiş, kallus kültürleri, SA ile ön muameleden sonra 2 saat boyunca yüksek sıcaklığa maruz kaldıklarında, kardenolid üretiminde önemli artışlar gözlenmiştir.

Kallus kültürlerinde önemli bir diğer parametre olan ışık, bitkilerin karbon fiksasyonu (fotosentez) için gerekli olup ışığın aynı zamanda kalitesi de önem taşımaktadır. Örneğin, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze bitkisinde kallus oluşumu için karanlığın ışıktan dört kat daha iyi sonuçlar verdiği rapor edilmiştir. Yine aynı çalışmada yüksek sükroz konsantrasyonlarının kallus oluşumunu olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (Kumar ve Rakhi 2008). Çalışmamızda ise 25 °C sıcaklık ve 15 gr sukroz destekli MS besi ortamı kallusların gelişimi bakımından en ideal sonuçları vermiştir.

Bu nedenle sözü edilen tüm bu kimyasal ve çevresel şartların optimizasyonunun yapılması kültürlerin devamlılığı ve sekonder metabolit üretiminin stabilitesi açısından bir ön koşuldur.

### 4.2.3. Optimize edilmiş juvenil kök ve yaprak kalluslarının büyümesinin karakterizasyonu

Yukarıda ayrı ayrı sonuçları sunulan veriler ışığında test edilen parametreler genel olarak değerlendirildiğinde, kallus gelişim oranı yaprak eksplantları için en yüksek %44 ile 0.5 mg/l BAP – 0.25 mg/l 2,4 D içeren MS besi ortamında gözlenirken, kök eksplantları için en yüksek %16 ile 0.5 mg/l BAP – 0.25 mg/l NAA içeren MS besi ortamından elde edildi (Tablo 4.8.). Her iki eksplant tipi için de çalışılan BBD kombinasyonlarının taze ve kuru ağırlıkları arasında genellikle bir pozitif korelasyon olduğu tespit edildi. Bu kapsamda kallus kültürlerinde büyümenin bir ifadesi olarak, çalışılan tüm parametreler içinde yaprak eksplantları için en yüksek taze ağırlık  $68.20 \pm 2.1$  mg ile 0.25 mg/l BAP ile 1 mg/l IBA kombinasyonundan elde edilirken, buna bağlı olarak en yüksek kuru ağırlık  $6.5 \pm 0.20$  mg ile yine aynı kombinasyondan elde edildi. Kök eksplantları için ise en yüksek taze ağırlık  $4.20 \pm 0.10$  mg ile 0.5 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA kombinasyonundan elde edilirken, buna bağlı olarak en yüksek kuru ağırlık  $0.3 \pm 0.02$  mg ile yine aynı kombinasyondan elde edildi. Yapılan çalışmada yaprak eksplantları için her ne kadar 0.5 mg/l BAP ve 0.25 mg/l 2,4-D'li ortamda yüksek miktarda kallus elde edildi ise de kallusların dağınık bir yapıda olmaması, nedeniyle kullanıma uygun olmadığı kararına varıldı. Aynı şekilde kök eksplantları için de 0.5 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA'lı ortamda yüksek miktarda kallus elde edildi ise de yine dağınık bir yapıda olmadıkları için, bu kallusların da kültürlerle alınması açısından uygun olmadığı değerlendirilerek kullanılmamıştır. Sonuç olarak hem kök hem de yaprak kökenli kallusların üretiminde özellikle daha uygun tekstürlü kallusların elde edildiği 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D destekli MS besi ortamının, optimum kallus oluşum ve gelişim ortamı olduğu sonucuna varıldı.

Juvenil kök ve yaprak eksplantlarından geliştirilen kallus kültürlerinde büyümenin karakterizasyonunu ifade eden kuru ağırlıklara ilişkin çalışılan tüm parametrelere ait veriler aşağıda bir bütün halinde **Çizelge 4.21**' de sunulmuştur.

**Çizelge 4.21.** Juvenil kök ve yaprak eksplantlarından gelişen kallus kültürlerinde büyümenin karakterizasyonu

Uygulama tipi	En Başarılı Uygulama		Uygulama sonucu	
	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak
			Max. Kuru Ağırlık (mg)	Max. Kuru Ağırlık (mg)
<b>Farklı Besi Ortamlarının ve Konsantrasyonlarının Etkisi</b>	MS (Tam)	MS (Tam)	241.37±22.25	16.76±3.74
<b>Farklı Karbon Kaynağının Tipi Ve Konsantrasyonunun Etkisi</b>	Sukroz 15 gr/l/ Sukroz 30 gr/l	Sukroz 15 gr/l	0.054±0.004	0.081±0.005a
<b>Farklı pH Etkisi</b>	5.8 pH	5.8 pH	113.36±8.73	12.90±1.30
<b>Farklı Işık Yoğunluklarının Etkisi</b>	20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-2}$	80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-2}$	71.66±5.51	29.47±2.79
<b>Farklı Sıcaklıkların Etkisi</b>	25 °C	25 °C	73.80±4.28	10.04±0.71

Genellikle kök kökenli eksplantlardan gelişen kallusların maksimum kuru ağırlıkları bakımından, test edilen tüm uygulamalarda yaprak kökenli eksplantlardan gelişen kalluslara oranla çok daha iyi sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Juvenil kök ve yaprak kökenli kallus kültürlerinin gelişiminin optimizasyonu çalışmalarında test edilen uygulama sonuçları değerlendirildiğinde ise, büyümenin bir ifadesi olarak maksimum kuru ağırlık bakımından hem kök hem de yaprak kökenli kallusların tam kuvvetteki MS besisi ortamında en iyi geliştikleri tespit edilmiştir. Farklı karbon kaynaklarının ve konsantrasyonları bakımından kök ve yaprak kökenli kallus kültürlerinin gelişimi için 15 gr/l sukrozun en iyi karbon kaynağı olduğu tespit edildi. Ancak kök kökenli kallus kültürlerinin gelişimi için 30 gr/l sukrozun da kullanılabileceği belirlenmiştir. Farklı pH oranlarının etkileri bakımından ise hem yaprak hem de kök kökenli kallus kültürlerinin gelişimi için en iyi pH oranı olarak 5.8 tespit edilirken, ışık yoğunluklarının etkisi bakımından ise kök kökenli kallus kültürlerinin gelişimi için 20  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-2}$ , yaprak kökenli kallus kültürlerinin gelişimi için ise 80  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-2}$  ışık yoğunluğunun en iyi ortam olduğu tespit edildi. Farklı sıcaklıkların etkileri bakımından hem yaprak hem de kök kökenli kallus kültürlerinin gelişimi için en iyi sıcaklık uygulaması olarak 25 °C tespit edilmiştir.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 5.1. Sonuçlar

Sakız bitkisi başta tıp, gıda, kozmetik ve kimya endüstrisi gibi birçok sektörde yaygın kullanım alanları bulunan ve yapısında barındırdığı önemli metabolitler nedeniyle oldukça önemli ekonomik ve faydalı bir bitkidir. Tez çalışmamızda, ülkemizde Ege bölgemizde doğal olarak yetişen sakız ağacı (*P. lentiscus* L.) bitkisinden, biyoteknolojik olarak kallus kültürlerinin başlatılması ve optimizasyonunu içeren etkin bir protokol tanımlanmıştır. Kallus kültürleri sakız bitkisinin farklı eksplantlarından (kök ve yaprak) başarılı bir şekilde başlatılmış ve kültür şartları optimize edilmiştir. Özellikle *Pistacia* cinsine bağlı sakız bitkisinde kallus kültürlerinin optimize edilerek başlatılması daha önce çalışılmamış olup, ülkemizde bilimsel olarak yeni teknoloji geliştirmek bakımından özgünlük taşımaktadır.

Ana başlıklar halinde tez çalışmamızda elde ettiğimiz veriler değerlendirildiğinde aşağıdaki bulgulara ulaşılmıştır:

- Öncelikle sürgün kültürlerinin eldesi çalışmalarında dış kabukları kırıldıktan sonra mezokarplarından uzaklaştırılan olgun *P. lentiscus* L. tohumları, %20'lik NaOCl ile 20 dk çalkalanmak ve 5'er kez 5 dk. steril distile su ile çalkalanmak suretiyle 1 mg/l IBA destekli MS besi ortamında çimlendirildi.
- Aksenik apikal ve nodal sürgünlerin proliferasyonu ise 1 mg/l BAP ve 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> ile destekli MS besi ortamında gerçekleştirildi. Elde edilen gövdelerden alınan sürgünler, yine aynı besi ortamında çoğaltılarak stok kültürlerin muhafazası sağlandı.
- BAP'ın farklı konsantrasyonları ile oksinlerin farklı konsantrasyonlarının kallus oluşumuna etkisinin araştırıldığı çalışmada, kök eksplantlarından en yüksek kallus oluşumu %96 ile 0.25 mg/l BAP ve 2 mg/l IBA kombinasyonu destekli MS besi ortamından elde edilmiştir. Genel olarak kallus morfolojileri irdelendiğinde 2,4-D destekli kombinasyonlarda yumuşak ve sarımsı kalluslar elde edildi (**Çizelge 4.1**).
- Yaprak eksplantlarından en yüksek kallus oluşumu %80 ile 2 mg/l BAP 0.5 mg/l 2,4-D kombinasyonu destekli MS besi ortamında tespit edilmiştir. Genel olarak kallus morfolojileri irdelendiğinde BAP'ın 2,4-D destekli kombinasyonlarda yumuşak ve sarımsı kalluslar elde edilirken, BAP'ın IAA, IBA ve NAA'lı kombinasyonlarda genelde yeşil ve sert kalluslar elde edildi (**Çizelge 4.2**).

- Kinetinin farklı konsantrasyonları ile oksinlerin farklı konsantrasyonlarının kallus oluşumuna etkisinin araştırıldığı çalışmada, kök eksplantlarından en yüksek kallus oluşumu %80 ile 1 mg/l Kin ile 1 mg/l 2,4-D kombinasyonu destekli MS besi ortamında hesapladı. Genel olarak kallus morfolojileri irdelendiğinde, en yüksek kallus yüzdesinin elde edildiği Kin'nin 2,4-D destekli kombinasyonlarda yumuşak ve sarımsı kalluslar elde edildi. Bununla birlikte, Kin'nin diğer oksinlerle olan kombinasyonlarından da dağılgan ve az dağılgan kalluslar elde edilmiş ise de Kin'nin 2,4-D kombinasyonlarında daha uygun tekstürde kallus oluşumu elde edildi (**Çizelge 4.3**).
- Yaprak eksplantlarından kallus oluşumunun, kök eksplantlarına göre daha başarılı olduğu, en yüksek kallus oluşumunun %100 ile [(0.5 mg/l Kin ile 2 mg/l IAA), (2 mg/l Kin ile 0.25 mg/l IAA; 2,4-D), (2 mg/l Kin ile 1 mg/l IAA; 2,4-D)] destekli MS besi ortamından elde edildi. Bununla birlikte kök eksplantlarına göre yaprak eksplantlarında, 2,4-D kombinasyonlu dışındaki Kin'nin diğer oksin kombinasyonlarında sert ve yeşil tekstürlü kallus gözlenirken, Kin 2,4-D kombinasyonlarında genelde sarımsı ve yumuşak dağılgan kallus gözlendi (**Çizelge 4.4**).
- TDZ'nin farklı konsantrasyonları ile oksinlerin farklı konsantrasyonlarının kallus oluşumuna etkisinin araştırıldığı çalışmada, kök eksplantlarından en yüksek kallus oluşumu %90 ile [(0.25 mg/l TDZ ile 0.5 mg/l IBA)] destekli MS besi ortamından elde edildi. Diğer bitki büyüme düzenleyecilerine göre TDZ uygulamalarının kök eksplantlarında kırmızımsı kalluslar oluşturduğu gözlenirken, aynı şekilde 2,4-D kombinasyonlu dışındaki TDZ'nin diğer oksin kombinasyonlarında sert ve sarı kırmızı tekstürlü kallus oluşumu gözlendi. TDZ'nin 2,4-D kombinasyonlarında ise genelde kırmızı sarı yumuşak dağılgan kalluslar elde edildi (**Çizelge 4.5**).
- Kök eksplantlarından kallus oluşumuna oranla yaprak eksplantlarından kallus oluşumunun daha başarılı olduğu, en yüksek yaprak kallus oluşumunun %100 ile [(1 mg/l TDZ ile 0.5 mg/l IBA)] destekli MS besi ortamından elde edildiği tespit edildi. Yine diğer bitki büyüme düzenleyecilerine göre kök eksplantlarında olduğu gibi TDZ uygulamalarında yaprak eksplantlarında kırmızımsı kalluslar oluştuğu gözlenirken, aynı şekilde 2,4-D kombinasyonlu

dışındaki TDZ'nin diğer oksin kombinasyonlarında sert ve sarı kırmızı tekstürlü kalluslar elde edildi (**Çizelge 4.6**).

- 2-IP'nin farklı konsantrasyonları ile oksinlerin farklı konsantrasyonlarının kallus oluşumuna etkisinin araştırıldığı çalışmada, kök eksplantlarında en yüksek kallus oluşumu %72 ile (0.5 mg/l 2-IP ile 2 mg/l 2,4-D) destekli MS besi ortamından elde edildi. Kök eksplantlarına göre yaprak eksplantlarında, 2-IP'nin 2,4-D'li kombinasyonları dışındaki diğer tüm oksin sitokin kombinasyonlarında sert ve yeşil tekstürlü kallus gözlenirken, 2-IP ile 2,4-D kombinasyonlarında genelde daha iyi tekstürde kallus gözlendi (**Çizelge 4.7**).
- Yaprak eksplantlarından en yüksek kallus oluşumu %88 ile (0.5 mg/l 2-IP ve 2 mg/l IAA) destekli MS besi ortamından elde edildi. Yine kök eksplantlarında olduğu gibi yaprak eksplantlarında da 2-IP'nin 2,4-D'li kombinasyonları dışındaki diğer oksin kombinasyonlarında sert ve sarı yeşil tekstürlü kallus oluşumu gözlenirken, 2-IP ile 2,4-D kombinasyonlarında genelde daha iyi tekstürde kalluslar elde edildi (**Çizelge 4.8**).
- Kök ve yaprakta kallus oluşturma çalışmaları genel olarak irdelendiğinde, denenen sitokin ve oksin kombinasyonları arasında maksimum oranda %100 kallus oluşum yüzdesi gözlenirken, bazı sitokin oksin kombinasyonlarında ise kallus oluşumu gözlenmedi. Bununla birlikte, sitokinlerin IAA, IBA ve NAA kombinasyonlarında sarı-yeşil-kırmızı ve beyaz tonlarda yer yer kararma gösteren sert tekstürlü kallus oluştuğu gözlenirken, sitokinlerin 2,4-D'li konsantrasyonlarında sarı, yumuşak ve dağılgan bir tekstürde kallus oluşumu gözlendi. Ancak denenen tüm sitokin ve oksin kombinasyonları arasında hem kök (**Şekil 4.3**) hem de yaprak eksplantları (**Şekil 4.4**) için kullanılacak en uygun kallus oluşumu (sarı yumuşak ve dağılgan tekstürde) 1 mg/l Kin ile 1 mg/l 2,4D destekli MS besi ortamından elde edildi.
- 4 haftalık kültür gelişimi sonrasında farklı besi ortam tiplerini içeren ortamlarda büyümeye bırakılan kök eksplantlarının gelişimleri incelendiğinde, kallus eksplantlarının yaş ( $0.360 \pm 0.010$  mg) ve kuru ağırlık ( $0.035 \pm 0.010$  mg) ortalamaları bakımından en yüksek değerlerin, WPM besi yerinin kullanıldığı ortamdan elde edildiği fakat bu ortamlarda gelişen kalluslarda büyümeyi malesef kararmaların takip ettiği gözlendi. Kallus taze ( $0.177 \pm 0.003$  mg) ve kuru ağırlıkları ( $0.018 \pm 0.002$  mg) bakımından nispeten daha düşük değerler gösterse

de, MS besiyeri ortamında kültüre alınan kallusların morfolojik olarak istenilen nitelikte (sarı ve sert olmayan) olduğu gözlemlendi (**Çizelge 4.9**).

- Yaprak eksplantlarından elde edilen kalluslar bakımından, en yüksek ortalama kallus taze ( $0.640 \pm 0.005$  mg) ve kuru ağırlık ( $0.075 \pm 0.015$  mg) değerleri Gamborg-B5 besi yerinde gelişen kallus dokularından elde edildi. Fakat bu kallusların morfolojik olarak kahverengimsi ve sert yapıda olduğu gözlemlendi. Dolayısı ile bu çalışma da MS besi ortamında gelişen kallusların taze ( $0.460 \pm 0.030$  mg) ve kuru ağırlık ( $0.043 \pm 0.05$  mg) bakımından daha düşük değerlere sahip olsalar dahi morfolojik yönden istenen özellikte kalluslar oluşturduğu ve yapılan alt kültürleme çalışmalarında bu özelliklerini korudukları gözlemlendi (**Çizelge 4.10**).
- Test edilen parametreler arasında kök kallus gelişim oranı en yüksek % 80 ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D içeren  $\frac{1}{2}$  kuvvetteki MS, 1 tam kuvvetteki MS ve 1 tam kuvvetteki SH besi ortamlarında gözlemlendiği tespit edildi. Bu parametreler arasından kallus oluşturma çalışmalarına 1 tam kuvvetteki MS besi ortamını ile devam edilmesine karar verildi (**Çizelge 4.11**).
- Test edilen parametreler arasında yaprak kallus gelişim oranı en yüksek %100 ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D içeren tam kuvvetteki MS ile tam ve iki kat kuvvetteki Gamborg besi ortamında gözlemlendiği tespit edilmiştir. Çalışılan tüm parametreler içinde en yüksek taze ağırlık  $244.30 \pm 18.86$  mg ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D içeren yarım kuvvetteki Gamborg besi ortamında elde edilirken, buna bağlı olarak en yüksek kuru ağırlık  $34.16 \pm 2.64$  mg ile yine aynı ortamda elde edildi. Her ne kadar kallus oluşturma çalışmalarında olduğu gibi en başarılı sonuçlar MS yerine Gamborg besi ortamından elde edilse de, elde edilen kallusların kararması ve daha sert bir yapı arz etmesi nedeniyle tercih edilmedi ve 2. sırada en yüksek kallus ağırlığı elde edilen tam kuvvetteki MS ortamı her iki eksplant için en iyi kallus geliştirme besi ortamı olarak kullanıldı (**Çizelge 4.12**).
- Kök kalluslarının gelişimi üzerine farklı karbon kaynağı ve konsantrasyonunun etkisi değerlendirildiğinde ise, 15 gr sukroz destekli besi ortamında  $0.498 \pm 0.04$  gr yaş ağırlık hesaplanırken,  $0.055 \pm 0.004$  gr kuru ağırlık hesaplandı. Bununla

birlikte 30 gr sukroz destekli besi ortamında ise  $0.491\pm 0.034$  gr yaş ağırlık hesaplanırken,  $0.054\pm 0.004$  gr kuru ağırlık hesaplandı. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde kök kalluslarının gelişiminde yaş ve kuru ağırlık değerleri bakımından en yüksek değerler 15 gr sukroz destekli besi ortamından elde edildi ise de, 30 gr sukroz destekli besi ortamından elde edilen yaş ve kuru ağırlık arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark gözlenmediği ve yüksek glukoz ve sukroz konsantrasyonlarında (50 gr), kalluslarda kararmalar meydana geldiği görüldü (**Çizelge 4.13.**)

- Yaprak kalluslarının gelişimi üzerine farklı karbon kaynağı ve konsantrasyonunun etkisi değerlendirildiğinde ise, 15 gr sukroz destekli besi ortamında  $0.738\pm 0.044$  gr yaş ağırlık hesaplanırken,  $0.081\pm 0.005$  gr kuru ağırlık hesaplandı. Bununla birlikte normal proliferasyon besi ortamında kullanılan 30 gr sukroz destekli besi ortamında ise  $0.311\pm 0.021$  gr yaş ağırlık hesaplanırken,  $0.034\pm 0.002$  gr kuru ağırlık hesaplandı. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde yaprak kalluslarının gelişiminde en yüksek yaş ve kuru ağırlık değerleri 15 gr sukroz destekli besi ortamından elde edildi (**Çizelge 4.14.**)
- Test edilen parametreler arasında kök kallus gelişim oranı en yüksek %100 ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D desteklenmiş MS besi ortamlarında, ortamın pH'sının pH 5 ve 7' ye ayarlandığı kültürlerde gözlemlendiği tespit edildi. Yüksek pH kuvvetlerinde genellikle yüksek oranda kararmalar tespit edildiğinden, kallus oluşumu ve gelişimi için en iyi pH değerinin pH 5.8 kuvveti olduğuna karar verildi (**Çizelge 4.15.**)
- Denenen bütün pH kuvvetleri arasında %100 yaprak kallus gelişim oranı, 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D destekli MS besi ortamlarında kültüre alınan kalluslardan elde edildi. Yaprak ve kök kökenli kallusların tüm pH değerleri bakımından sonuçları karşılaştırıldığında, yaprak kökenli kallusların daha iyi bir gelişim gösterdiği tespit edildi. Ancak morfolojik olarak yüksek pH kuvvetlerinde kalluslarda kararmalar gözlemlendiğinden, kallus oluşum ve gelişimi bakımından en iyi pH kuvvetinin pH 5.8 olduğuna karar verildi (**Çizelge 4.16.**)
- 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D destekli MS besi ortamında denenen 3 farklı ışık yoğunluğundaki tüm kültürlerde %100 kallus gelişim oranı gözlemlendi. Özellikle kök eksplantlarında, yaprak eksplantlarının aksine ışık yoğunluğu azaldıkça

kallus gelişiminde bir artış olduğu ışık yoğunluğu arttıkça ise kararmaların olduğu tespit edildi.

- Kök eksplantlarında olduğu gibi farklı ışık yoğunluğu uygulanan tüm kültürlerde test edilen parametreler arasında kallus gelişim oranı en yüksek %100 ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D destekli MS besi ortamında gözlemlendi. Özellikle yaprak eksplantlarında kök eksplantlarının aksine ışık yoğunluğu arttıkça kararmaların azaldığı ve kallus gelişiminde artışların olduğu tespit edildi (**Çizelge 4.18**).
- Farklı sıcaklık (10-20-25-30 ve 35°C) parametreleri uygulanan tüm kültürlerde test edilen parametreler arasında ise kallus gelişim oranı en yüksek %100 ile yine 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D destekli MS besi ortamında gözlemlendi. Özellikle kök eksplantlarında sıcaklık arttıkça kararmaların arttığı, tüm parametreler içinde en yüksek taze ağırlık 567.70±32.98 mg ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D destekli MS besi ortamında 25 °C' sıcaklık uygulanan kalluslardan elde edilirken, en yüksek kuru ağırlık 73.80±4.28 mg ile yine sıcaklık uygulamasından elde edildiği tespit edildi. Bu bağlamda her ne kadar gelişim oranı test edilen diğer parametrelere oranla düşük olsa da, en yüksek taze ve kuru ağırlık değerleri ile sarı renkli dağılgan yapıda kallus oluşumu, bu sıcaklık derecesinden elde edildiği için tez kapsamında gerçekleştirdiğimiz tüm çalışmalarda kültürler 25 °C sıcaklık uygulaması yapıldı (**Çizelge 4.19**).
- Sıcaklık uygulamalarının etkisi genel olarak değerlendirildiğinde, test edilen tüm parametreler arasında kallus gelişim oranı en yüksek %100 ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D destekli MS besi ortamında gözlemlendi. Özellikle yaprak eksplantlarında düşük ve yüksek sıcaklıklarda kararmaların meydana geldiği gözlemlendi. Çalışılan tüm parametreler içinde en yüksek taze ağırlık 259.80±18.61 mg ile 20 °C sıcaklık uygulanan kültürlerden elde edilirken, en yüksek kuru ağırlık değeri 33.77±2.41 mg ile yine aynı sıcaklık uygulamasından elde edildi. Her ne kadar kuru ve taze ağırlık bakımından maksimum sonuçlar 20°C sıcaklık uygulamasından elde edilmiş ise de, bu sıcaklık uygulamasından elde edilen kallusların tekstürlerinin 25°C sıcaklık uygulanan kültürler oranla daha sert bir yapı arz etmesi nedeniyle, tez kapsamında gerçekleştirilen tüm çalışmalarda kültürler 25°C sıcaklık uygulaması yapılmasının daha uygun ve doğru olduğu sonucuna varıldı (**Çizelge 4.20**).

## 5.2. Öneriler

Tez konumuz özellikle sağlık alanında yerel kaynaklardan biyoteknolojik yöntemlerle farmasötik sanayiye hammadde temini ve artırımı yönünde yapılacak olan hücre süspansiyon kültürleri gibi biyoteknolojik çalışmalara temel oluşturması potansiyelinden dolayı önem arz etmektedir.

Optimize edilmiş kallus kültürlerinden metabolit biyosentezi, alternatif bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmakta ve bitki bünyesinde sekonder metabolit üretiminin artışına yol açacak metotların uygulanması için ayrı bir platform oluşturmaktadır. Sekonder metabolitlerin üretiminde rol alan genler, proteinler ve bu proteinlerin düzenleyici işlevlerinin ve rollerinin karakterizasyonu da dahil olmak üzere metabolik süreci açıklığa kavuşturmak önemlidir. Hedef ürünlerin hücre içi lokalizasyonu da metabolik mühendislik için diğer önemli bir hedef olabilir. Bütün bu biyosentetik yollar açıklandıktan sonra, metabolik mühendislik yoluyla manipülasyon daha doğru ve yararlı bir yaklaşım olacaktır.

Sekonder metabolit yollarının modifikasyonu da dahil olmak üzere transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi mühendislik tekniklerinin uygulanması, endüstriyel ölçekte ekonomik olarak önem arz eden ikincil metabolitlerin üretilmesi için biyoteknolojik süreçlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak, yukarıda değindiğimiz ileri düzey mühendislik çalışmalarına temel teşkil edecek olan çalışmamız *Pistacia* cinsine ait diğer türler ve tıbbi öneme sahip bitkiler için bir model oluşturacaktır.

## KAYNAKLAR

- Acar, İ., 1988, (*Pistacia lentiscus* L. var. chia) sakızı üretiminin geliştirilmesine esas olmak üzere sakızın fiziko-kimyasal yönden incelenmesi, *Ormancılık Araştırma Ens., Teknik Rap. Ser. No.35*.
- Aghaei, P., Bahramnejad, B., Mozafari, A.A., 2013, Effect of different plant growth regulators on callus induction of Stevens m explants in *Pistacia atlantica* subsp. kurdica, *Plant Knowledge Journal*, 2(3), 108-112.
- Akdemir, Ö. F., 2013, In vivo ve in vitro şartlarda yetiştirilen *Pistacia lentiscus* L. (Sakız Ağacı)'nın yağ asiti ve uçucu yağ içeriklerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi *Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 120p.
- Akdemir, Ö., Tilkat, E., Onay, A., Kılınç, F., Süzerer, V. and Çiftçi, Y., 2013, Geçmişten günümüze sakız ağacı *Pistacia lentiscus* L., *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 3 (2), 1-28.
- Akdemir, Ö.F., Onay, A., Tilkat, E., 2015, *Pistacia lentiscus* L. (Sakız ağacı)'nın etnomedikal kullanımları ve fitokimyasalları, *VII. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi*, Çanakkale.
- Aktaş, T. ve Çölgeçen, H., 2017, Farklı bitki türlerinden bitki doku kültürü teknikleriyle flavonoidlerin üretimi, *Karaelmas Fen ve Müh. Dergisi*, 7(2):665-673, 2017.
- Al-Habbal, M.J., Al-Habbal, Z. and Huwez, F.U., 1984, A double-blind controlled clinical trial of mastic and placebo in the treatment of duodenal ulcer, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 11, 541-544.
- Ali, F., Ahsan, M., Saeed, N.A., Ahmed, M., Ali, Q., Kanwal, N., Tehseen, M.M., Ijaz, U., Bibi, I. and Niazi, N.K., 2014, Establishment and optimization of callus-to-plant regeneration system using mature and immature embryos of maize (*Zea mays*), *International Journal of Agriculture and Biology*, 16(1), 111-117.
- Al-Saghir, M.G. and Porter D.M., 2012, Taxonomic revision of the genus *Pistacia* L. (Anacardiaceae), *AJPS*, 3 (1), 12-32.
- Al-Said, M.S., Ageel, A.M., Parmar, N.S. and Tariq, M., 1986, Evaluation of mastic, a crude drug obtained from *Pistacia lentiscus* for gastric and duodenal anti-ulcer activity, *J Ethnopharmacol*, 15, 271-278.
- Andrikopoulos, N.K., Kaliora, A.C., Assimopoulou, A.N. and Papapeorgiou, V.P., 2003, Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against in vitro LDL oxidation, *Phytother Res*, 17, 501-507.
- Anonim, 2008a, [http://www.ibiblio.org/pfaf/cgi-bin/arr\\_html?Pistacia+lentiscus](http://www.ibiblio.org/pfaf/cgi-bin/arr_html?Pistacia+lentiscus) [Ziyaret tarihi: 31.05.2018].
- Anonim, 2008b, <http://www.nutricology.com/proddesc/discuss/NC+Mastic+Gum+PDF+Product+Sheet031605.pdf> [Ziyaret tarihi: 31.05.2018].

Anonim, 2011, <http://www.damsak.com.tr> [Ziyaret tarihi: 20.06.2018].

Anonim, 2014, Sakız Eylem Planı, 2014-2019, Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Orman Genel Müdürlüğü, Odun Dışı Ürün ve Hizmetler Dairesi Başkanlığı Yayınları. Web: <https://www.ogm.gov.tr/ekutuphane/Yayinlar/Sak%C4%B1z%20Eylem%20Plan%C4%B1.pdf>, [Ziyaret tarihi: 28.05.2018].

Anonim, 2015, European Medicines Agency, Science Medicines Health, EMA/HMPC/46756/2015 Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) Assessment report on *Pistacia lentiscus* L., resin (mastix), 1-43. Web: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Herbal\\_-\\_HMPC\\_assessment\\_report/2015/07/WC500190097.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2015/07/WC500190097.pdf), [Ziyaret tarihi: 05.06.2018].

Anonim, 2017, Dış mekan bitki bakımı, sakız ağacı bakımı, Web: <https://www.cicekal.net/blog/sakiz-agaci-bakimi/>, [Ziyaret tarihi: 30.08.2018].

Assimopoulou, A.N., Papageorgiou, V.P., 2005, GC-MS analysis of penta- and tetracyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species, Part I. *Pistacia lentiscus* var. chia, *Biomed Chromatogr.*, 19, 4, 285–311.

Aswathy, J.M., Sumayya, S.S., Lawrence, B., Kavithaand, C.H., Murugan, K., 2018, Purification, fractionation and characterization of anthocyanin from in vitro culture of *Bridelia retusa* (L.) Spreng, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(1), 52-64.

Bais, H.P., Loyola Vargas, V.M., Flores, H.E., Vivanco, J.M., 2001, Root-specific metabolism: the biology and biochemistry of underground organs, *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 37, 730-741.

Balan, K.V., Prince, J., Han, Z., Dimas K. and Cladaras, M., 2007, Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. chia, *Phytomedicine*, 14, 263–272.

Baytop, T., 1968, Türkiye’de sakız (mastix) elde etme imkanları, İstanbul Üniversitesi, *Eczacılık Fakültesi Mecmuası*, 4 (1), 31-35.

Behbahani, M., Mehrnaz, S. and Javad, H.M., 2011, Optimization of callus and cell suspension cultures of *Barringtonia racemosa* (Lecythidaceae family) for lycopene production, *Scientia Agricola*, 68 (1), 69-76.

Benhammou, N., Bekkara, F.A. and Panovska, T.K., 2008, Antioxidant and antimicrobial activities of the Pistachio lentiscus and Pistachio atlantica extracts.

Bestoso, F., Ottaggio, L., Armirotti, A., Balbi, A., Damonte, G., Degan, P., Mazzei, M., Cavalli, F., Ledda, B. and Miele, M., 2006, In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellanaproduce* Taxol and taxanes, *BMC Biotechnology* 6:45.

- Bilgin, D.C., 2009, 20 bin sakız ağacı dikecek, Türkiye'yi Yunan'a rakip yapacak. Web: <http://www.hurriyet.com.tr/ekonomi/20-bin-sakiz-agaci-dikecek-turkiye-yi-yunan-a-rakip-yapacak-12192244>, [Ziyaret tarihi: 31.05.2018].
- Bouque, V., Bourgaud, F., Nguyen, C., Guckert, A., 1998, Production of Daidzein by Callus Cultures of Psoralea Species and Comparison with Plant, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 53: 35-40.
- Boztok, Ş. ve Zeybek, U., 2004, *Pistacia* cinsine dahil bazı doğal bitkilerin sakız reçinesi kalitesi açısından irdelenmesi, Gıda ve İlaç Sanayinde Değerlendirilmesi Üzerine Araştırma, *Ege Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi*, İzmir.
- Browicz, F.A., 1987, *Pistacia lentiscus* L. var. chia (Anacardiaceae) on Chios island, *Pl. Sys. Evol.*, 155(1-4), 189-195.
- Ch'avez, I.O., Apan, T.R. and Mart'inez-V'azquez, M., 2005, Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes, *J Pharm Pharmacol*, 57, 1087–1091.
- Ciddi, V., Shuler, M.L., 2000, Camptothecine from callus cultures of *Nothapodytes foetida*., *Biotech. Letters*, 22:129-132.
- Cortina J., Green J.J., Baddeley J. A., Watson C. A., 2007, Root morphology and water transport of *Pistacia lentiscus* seedlings under contrasting water supply: A test of the pipe stem theory, *Environmental and Experimental Botany* 62, 343–350.
- Costable, F., Gaudet-Laprairie P., Kurz, K.G.W., Kutney, J.P., 1982, Alkaloid production in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don IV: variation in alkaloid spectra of cell lines derived from one single leaf, *Plant Cell Reports* 1, 139-142.
- Çetin, E.S., Uzunlar, F., Baydar, N.G., 2011, UV-C uygulamasının Gamay üzüm çeşidine ait kalluslarda sekonder metabolit üretimi üzerine etkileri, *Gıda*, 36(6) 319-326.
- Dalby, A., 2003, Food in the ancient world. from a to z. London: *Taylor and Francis Group*.
- Dalila, Z.D., Fahmi, A.B.M., Nurkhalida, A.K.S., 2015, Optimization of sterilization method and callus induction of *Cocos nucifera* Linn. var. matag from inflorescence, international conference on plant, *Marine and Environmental Sciences*, Jan. 1-2, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Davis, P.H., 1967, *Linum* L. In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands. *Edinburgh University Press*, Edinburgh, 2, 425–450.
- Duke, J.A., 1983, Medical plants of the bible, *Conch Publishers*, New York.

- Erdemel, B.H., ve Aygün, A., 2016, Bazı Prunus Spp Türlerinin Tohumlarından Kallus Kültürlerinin Oluşturulması, *Akademik Ziraat Dergisi* 5(1):9-12.
- Erkoyuncu, M.T. and Yorgancılar, M., 2016, Bitki doku kültürü yöntemleri ile sekonder metabolitlerin üretimi, *Selçuk Tar Bil Der*, 2 (1), 66-76.
- Farjaminezhad, R., Zare, N., Asghari-Zakaria, R. and Farjaminezhad, M., 2013, Establishment and optimization of cell growth in suspension culture of *Papaver bracteatum*: a biotechnology approach for thebaine production, *Turk J Biol.* 37, 689–697.
- Fazelzadeh Dezfuli, S. A., Habibi Khanyani, B., Karimaneh, Z., 2013, Optimization of callus induction and seedling regeneration in *Asparagus (Asparagus officinalis)*, *Bulletin Enviromental Pharmacology and Life Science*, 2(2), 05- 08.
- Francoise, B., Hassan poor, H., Shaker, H. and Nejad Fallah, Z., 2007, Growth optimization of *Zataria multiflora* boiss. tissue culture and Rosmarinic acid production improvement, *Pakistan Journal of Biological science*, 10 (19): 3395-3399.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K., 1968, Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Exp Cell Res.*, 50(1): 151–158.
- Giaginis, C. and Theocharis, S., 2011, Current evidence on the anticancer potential of chios mastic gum, *Nutrition and Cancer*, 63 (8), 1174-1184.
- Gourguillon, L., Lobstein, A., Gondet, L., 2016, Effects of explant type, culture media and growth regulators for callus induction of a potential bioactive halophyte: *Armeria maritima* (Plumbaginaceae), *Planta Medica* 81(S 01):S1-S381.
- Gürel, S., Gürel, E., Kaya, Z., 2002, Protoplast fusion in sugar beet (*Beta vulgaris* L.), *Turk J Biol* 26: 163-170.
- Güven, A. ve Gürsul, I., 2014, Bitki doku kültürlerinde sekonder metabolit sentezi, *Gıda*, 39 (5), 299-306.
- Huwez, F.U., Thorwell, D., Cockayne, A., and Ala'Aldeen D.A, 1998, Mastic gum kills *Helicobacter pylori*, *N. Engl. J. Med.*, 346, 19-46.
- Iriawati A.R. and Rizkita R.E., 2014, Analysis of secondary metabolite production in somatic embryo of pasak bumi (*Eurycoma Longifolia*Jack.), *Procedia Chemistry* 13 (2014) 112 – 118.
- İmtiyaz, S., Tariq, M., Ali, S.J., Chaudhary, S.S., Baig, M.G., 2013, *Pistacia lentiscus* Linn: Gum with immense medicinal potential, *Spatula DD.*, 3(2),69-73.
- Jordano, P., 1988, Polinizacion y variabilidad de la produccion de semillas en *Pistacia lentiscus* (L) (Anacardiaceae), *Anales Jará. Bot. Madrid*, 45 (1), 213-231.

- Kalidass, C., Mohan, V.R., Arjunan Daniel, A., 2010, Effect of auxin and cytokinin on vincristine production by callus cultures of *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae), *Tropical Subtropical Agroecology*, 12, 283–288.
- Kaliora, A.C., Stathopoulou, M.G., Triantafillidis, J.K., Dedoussis, G.V. and Andrikopoulos, N.K., 2007a, Alterations in the function of circulating mononuclear cells derived from patients with Crohn's disease treated with mastic, *World J Gastroenterol*, 13, 6031–6036.
- Kaliora, A.C., Stathopoulou, M.G., Triantafillidis, J.K., Dedoussis, G.V. and Andrikopoulos, N.K., 2007b, Chios mastic treatment of patients with active Crohn's disease, *World J Gastroenterol*, 13, 748–753.
- Karataş, İ., Elmastaş, M. ve Karataş, R., 2014, Siyah havuç (*Daucus carota* ssp. sativus var. atropubens Alef) kallus kültüründe antosiyanin üretimine bazı uygulamaların etkisi, *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, (9), 62-73.
- Karuppusamy, S., 2010, A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures, *Journal of medicinal plant research* 3(13):1222-1239.
- Keller, M., Steel, C.C., Creasy, G.L., 2000, Stilbene accumulation in grapevine tissues: developmental and environmental effects, XXV. International horticultural congress, part 4: culture techniques with special emphasis on environmental implications, *ISHS Acta Hort*, 514: 275-286.
- Keskin, N., Kunter, B., 2007, Erciş üzüm çeşidinin kallus kültürlerinde uv ışını etkisiyle resveratrol üretiminin uyarılması, *A.Ü Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 13(4), 379-384.
- Khanpour-Ardestani, N., Sharifi, M., Behmanesh, M., 2015, Establishment of callus and cell suspension culture of *Scrophularia striata* Boiss.: an in vitro approach for acteoside production, *Cytotechnology*, May; 67(3): 475–485.
- Kılınç, F.M., 2013, Sakız ağacı (*Pistacia lentiscus* L.)'nin in vitro klonal mikroçoğaltılması, Yüksek Lisans Tezi, *Dicle Üniversitesi Basımevi*, Diyarbakır.
- Kılınç, F.M., Süzerer, V., Özden Çiftçi, Y., Koç, I., Akdemir, H., Yıldırım, H., Tilkat, E., Onay, A., 2014, Improved shoot multiplication of lentisk (*Pistacia lentiscus* L.) using different carbohydrates and media, *Acta Horticulturae*, 1028,145-151.
- Kılınç, F.M., Süzerer, V., Özden Çiftçi, Y., Onay, A., Yıldırım, H., Uncuoğlu Altınkut, A., Tilkat, E., Koc, I., Akdemir, Ö.F. and Metin Karakaş, Ö., 2015, Clonal micropropagation of *Pistacia lentiscus* L. and assessment of genetic stability using IRAP markers, *Plant Growth Regul*, 75, 75-88.
- Kıvçak, B., Akay, S., 2004, Quantitative determination of  $\alpha$ -tocopherol in *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. chia, and *Pistacia terebinthus* by TLC-densitometry and colorimetry, *Fitoterapia* 76, 62–66.

- Koc, I., Onay, A. and Çiftçi, Y. Ö., 2014, In vitro regeneration and conservation of the lentisk (*Pistacia lentiscus* L.). *Turkish Journal of Biology*, 38(5), 653-663.
- Koç, I., Onay A., Özden Çiftçi, Y., 2014b, In vitro regeneration and conservation of the lentisk (*Pistacia lentiscus* L.), *Turk J Biol.*, 38: 653-663, Doi:10.3906/biy-1401-69.
- Koo, J.Y., Hwang, E.Y., Cho, S., Lee, J.H., Lee, Y.M., Hong, S.P., 2005, Quantitative determination of amygdalin epimers from armeniacaee semen by liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, 814, 69–73.
- Karadağ, A., Şerbetçi, A., Alemdar, B., Güllükaya, B., Tuncalı, D., 2012, Sakız ağaçlarının tarihi, Özel Ege Lisesi, Sosyal Bilgiler Yıllık Projesi, Web: <https://slidex.tips/download/sakiz-aalarinin-tarih>, [Ziyaret Tarihi: 01.06.2018].
- Kumar, V. M. and Rakhi, C., 2008, Evaluation of chemical and physical parameters for callus induction from anther cultures of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), *Research journal of biotechnology*, 1-13.
- Lila, M.A., 2005, Valuable secondary products from in vitro culture. P: 285-289. In: Plant Development and Biotechnology, Eds. Trigiano, R.N. and Gray D. CRC Pres, London, New York, Washington.
- Lloyd, G. and McCown, B.H., 1980, Commercially feasible micropropagation of the mountain laurel, *Kalmia latifolia* Linn. by using shoot-tip culture, *Combined Proceedings International Plant Propagators' Society*, 30, 421–427.
- Luczkiewicz, M., Glod, D., 2003, Callus cultures of Genista plants-in vitro material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity. *Plant Sci.*, 165: 1101-1108.
- Luczkiewicz, M., Zarate, R., Dembin'ska-Migas, W., Migas, P., Verpoorte, R., 2002, Production of pulchelin E in hairy roots, callus and suspension cultures of *Rudbeckia hirta* L. *Plant Sci.*, 163: 91-100.
- Maharik, N., Elgengaih, S., Taha, H., 2009, Anthocyanin production in callus cultures of *Crataegus sinaica* Boiss. department of plant biotechnology, *National Research Center Department of Cultivation and Production of Medicinal and Aromatic Plants*, 1(1), 30-34.
- Marone, P., Bono, L., Leone, E., Bona, S., Carretto, E. and Perversi, L., 2001, Bactericidal activity of *Pistacia lentiscus* mastic gum against *Helicobacter pylori*, *J Chemother*, 13, 611-4.
- Martinez-Palae, E. and Aronne, G., 2000, Reproductive cycle of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) in Southern Italy, *Plant Biosystems*, 134, 365-371.
- Mattia, C., Bischetti, G.B., Gentile, F., 2005, Biotechnical characteristics of root systems of typical Mediterranean species, *Plant and Soil*, 278 (1-2), 23-32(10).

- Meftahizade, H., Lotfi, M., Moradkhani, H., 2010, Optimization of micropropagation and establishment of cell suspension culture in *Melissa officinalis* L., *Afr. J. Biotechnol.*, 9(28), 4314-4321.
- Mills, J.S. and White, R., 1977, Natural resins of art and archaeology: their sources, chemistry and identification, *Stud Conserv*, 22, 12-31.
- Mills, J.S. and White, R., 1989, The identity of the resins from the Late Bronze Age shipwreck at Ulu Burum (Kas), *Archaeometry*, 31, 37-44.
- Ming, T.L., 1980, The geographic distribution and floristic character of Chinese Anacardiaceae, *Acta Botanica Yunnanica*, 2, 390-401.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant*, 15 (3), 473-497.
- Nartop, P., Gürel, A., Akgün, İ.H., Bedir, E., 2014, Astragaloside IV and cycloastragenol production capacity of *Astragalus trojanus* Calli, *Records of Natural Products*, 9: 49-61.
- Omer, R.A., Matheka, J.M., Runo, S., Ali, A.M., and Kuria, E., 2012, Effects of auxin and source of explants on callus induction of tropical maize., *Biotechnology*, 11: 225-231.
- Onay, A., Tilkat, E., Isikalan, C., Namlı, S., 2007, Micrografting of Pistachio (*Pistacia vera* L. cv. Siirt), protocols for micropropagation of woody trees and fruits, S. Mohan Jain H. Häggman, *Switzerland*, pp.289-298.
- Onay, A., Süzerer, V., Akdemir, H., Yildirim, H., Ozden Tokatlı, Y., Tilkat, E., 2011, Somatic embryogenesis in Pistachios, *Acta Horticulturae*, 912:587-592.
- Onay, A., Yıldırım, H., Uncuoğlu, A.A., Çiftçi, Y.Ö. ve Tilkat, E., 2016a, Sakız Ağacı (*Pistacia lentiscus* L.) Yetiştiriciliği, *Dicle Üniversitesi Basımevi*, s. 106.
- Onay, A., Yıldırım, H., Yavuz, M.A., 2016b, Sakız ağacı (*Pistacia lentiscus* L.) yetiştiriciliği ve reçenesi, *Batman University, Journal of Life Sciences*; 6 (2), 133.
- Özçağırın, R., Ünal, A., Özeker, E. ve İsfendiyaroğlu, M., 2005, Ilıman iklim meyveleri (Sert Kabuklu Meyveler Cilt III), *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*. İzmir.
- Padulosi, S. and Hadj-Hassan, A.. 1998, Towards a comprehensive documentation and use of pistacia genetic diversity in central and west asia, north africa and europe, *Report of the IPGRI Workshop*, 14-17 December 1998, Irbid, Jordan.
- Palli E. M., Aronne G., 2000, Reproductive cycle in Southern Italy of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae), *Plant Biosystems*, 134 (3) 365- 371.

- Paraskevopoulou, A. and Kiosseoglou, V., 2016, Chios mastic gum and its food applications, in: kristbergsson k., ötles s. (eds) functional properties of traditional foods, *integrating food science and engineering knowledge into the food chain*, vol 12. *Springer*, Boston, MA.
- Parr, A.J., 1989, The production of secondary metabolites by plant cell cultures. *J. Biotech*, 10: 1-26.
- Perikos, J., 1993, The chios gum mastic, *Print All Ltd.*, Athens.
- Prada, M.A. and Arizpe, D., 2008, *Pistacia lentiscus* L. In: Riparian tree and shrub propagation handbook. 90-93.
- Radić, S., Vujčić, V., Glogoški, M., Radić-Stojković, M., 2016, Influence of pH and plant growth regulators on secondary metabolite production and antioxidant activity of *Stevia rebaudiana* (Bert), *Periodicum Biologorum*, 118(1): 9–19.
- Ramachandra, R.S., Ravishankar, G.A., 2002, Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnology Advances*, 20, 101-153.
- Schenk, R.U. and Hildebrandt, A.C., 1972, Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Can. J. Bot.*, 50, 199-204.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Leblebici, E. ve Bekat, L., 2008, Tohumlu bitkiler sistematiği, *Ege Univ. Yayınları*, İzmir, s. 446.
- Sökmen, A., Gürel, E., 2001, Sekonder metabolit üretimi, bitki biyoteknolojisi, doku kültürü ve uygulamaları, Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. Konya, 211-261.
- Stella, A. and Braga, M.R., 2002, Callus and cell suspension cultures of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 68, 271-276.
- Stevens, P.F., 2008, Angiosperm phylogeny website, version 9, Web: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/Apweb/>, [Ziyaret Tarihi: 05.07.2018].
- Sundaram, U., Anupama, V., Gurumoorthi, P., 2013, Optimization of pH and sucrose in the callus culture for the micro propagation of *Mucuna pruriens* using response surface methodology, *International Journal of Pharmalogical Pharmaceutical Science*, 5, 420–426.
- Şenyay, D., 2008, Sakız ağacının (*Pistacia Lentiscus* L.) *in vitro* koşullarda rejenerasyonu üzerine araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, 6-7.
- Talhok, S.N., Lubani, R.T., Baaldaki, R., 2000, Phenotypic diversity and morphological characterization of *Amygdalus* L. species in Lebanon, *Genet Resour Crop Evol*, 47, 93–104.

- Taşkın, T. and İnal, A., 2005, The researches on in vitro micropropagation of mastic tree (*Pistacia lentiscus* var. chia Duhamel), *Anadolu J of AARI*, 15, 1–15.
- Verdu, M., Garcia–Fayos, P., 2002, Ecologia reproductiva de *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae): anacronismo evolutivo en el matorral mediterranes. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 75(1), 57-65.
- Yağcı, C., Toker, M.C., Toker, G., 2008, Bitki doku kültürü yoluyla üretilen flavonoitler, *Türk Bilimsel Derlemler Dergisi*, 1 (1) 47-58.
- Yalçın Gözde, 2011, *In vitro*'da Sakız ağacı (*Pistacia lentiscus* var. Chia) eksplantlarında görülen kararmaların çözümü üzerine araştırmalar, Lisans Bitirme Tezi, *Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü*, İzmir.
- Yan, M.M., Xu, C., Kim, C.H., Guo, D.P., 2009, Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou ( *Allium chinense*). *Scientia Horticulturae* 123(1):124-128.
- Yan, S. L., Huang, C. Y., Wu, S. T., Yin, M.C., 2010, Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines, *Toxicol In Vitro*, 24, 842–848.
- Yıldırım, H., 2012, Micropropagation of *Pistacia lentiscus* L. from axenic seedling-derived explants, *Scientia Horticulturae*, 137, 29-35.
- Zang, Q., Zhou, L., Zhuge, F., Yang, H., Wang, X., Lin, X. 2016, Callus induction and regeneration via shoot tips of *Dendrocalamus hamiltonii*, *Springerplus* 5, 1799.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Elif DEMİR  
**Uyruğu** : T.C.  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : BATMAN 1991  
**Telefon** : 05458636001  
**Faks** :  
**e-mail** : [mbelifdemir@gmail.com](mailto:mbelifdemir@gmail.com)

### EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Batman Fatih Lisesi	2009
Üniversite	: Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi	2014
Yüksek Lisans :		
Doktora :		

### İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2017	MEB	Öğretmen

### UZMANLIK ALANI

### YABANCI DİLLER

### BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

#### YAYINLAR

Elif Demir, Ayşe Hoşer, Hilal Surmuş Aşan, Engin Tilkat, Veysel Süzerer, Abdulsalam Ertaş and Ahmet Onay. 2017. Establishment of Callus Cultures from Different Axenic Leaf Explant Types of Lentisk (*P. lentiscus* L.). June 2017, In vitro Biology Meeting of the SIVB, pp 49-49, Raleigh, North Carolina, USA.

Ayşe Hoşer, Elif Demir, Hilal Surmuş Asan, Veysel Süzerer, Engin Tilkat, Abdulsalam Ertaş and Ahmet Onay. 2017. Initiation of Cell Suspension Cultures from Axenic Leaf Explants of Lentisk (*Pistacia lentiscus* L.). June 2017, In vitro Biology Meeting of the SIVB, pp 38-38, Raleigh, North Carolina, USA.

Engin Tilkat, Serkan Yiğitkan, Hilal Surmuş Aşan, Abdulsalam Ertaş, Elif Demir, Mustafa Abdullah Yılmaz, Veysel Süzerer, Ahmet Onay. April 2017. Antioxidant Activities and Fatty Acid Profile of the Petroleum Ether Extracts From Different Parts of In vivo and In vitro Grown *Pistacia lentiscus* L. April 2017, The Third International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, pp 300-300, Girne-Turkish Republic of Northern Cyprus.

Engin Tilkat, Veysel Süzerer, Ayşe Hoşer, Elif Demir, Hilal Surmuş Asan, Ahmet Onay. 2017a. Development of Cell Suspension Cultures: - A case study in Lentisk. September 2017, International Green Biotechnology Congress-2017, pp 52-52, Bostancı-İstanbul, Turkey.