



T.C.

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

**JÜVENİL AKSENİK SAKIZ AĞACI**  
**EKSPLANTLARINDAN (*Pistacia lentiscus* L.)**  
**SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNİN**  
**BAŞLATILMASI ve OPTİMİZASYONU**

**AYŞE HOŞER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Haziran-2018**  
**BATMAN**  
**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ KABUL VE ONAYI

Ayşe HOŞER tarafından hazırlanan “JÜVENİL SAKIZ AĞACI EKSPANTLARINDAN (*Pistacia lentiscus* L.) SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNİN BAŞLATILMASI VE OPTİMİZASYONU” adlı tez çalışması 20/06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

**Başkan**  
Prof.Dr. Ahmet ONAY

**Danışman**  
Prof.Dr. Engin TILKAT

**Üye**  
Doç.Dr. Filiz AKBAŞ

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.



## **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.

AYŞE HOŞER

20.06.2018

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS

#### JÜVENİL AKSENİK SAKIZ AĞACI (*Pistacia lentiscus* L.) EKSPANTLARINDAN SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNİN BAŞLATILMASI ve OPTİMİZASYONU

AYŞE HOŞER

Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Engin TILKAT

2018, 74 Sayfa

Jüri  
Prof. Dr. Engin TILKAT  
Prof. Dr. Ahmet ONAY  
Doç. Dr. Filiz AKBAŞ

Bu çalışmada, *Pistacia lentiscus* L. (Sakız ağacı)'nın *in vitro* çimlendirilmiş tohumlarından hücre süspansiyon kültürlerinin başlatılması ve optimizasyonu için bir protokol geliştirilmiştir. *In vitro* çimlendirilen sakız fidelerine ait aksenik yaprak ve kök eksplantlarından öncelikle kallus dokusu elde edilmiş, bu kallus hatlarından ise hücre süspansiyon kültürleri başlatılmıştır. Süspansiyon kültürlerinin başlatılması için, ilk olarak *P. lentiscus* L. tohumları 1 mg/l IBA içeren Murashige ve Skoog (MS) besi ortamında çimlendirildi. Kallus üretmek için kök ve yaprak eksplantları, BAP, Kin ve 2,4-D (her biri 1 mg/l) kombinasyonlarını içeren MS besi ortamında kültüre alındı. Kallus oluşumu için en iyi bitki büyüme düzenleyicisi (BBD) kombinasyonu sarı renkli ve yumuşak tekstürde kallusların elde edildiği 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D içeren yarı katı MS besi ortamı olarak tespit edildi ve yine aynı BBD kombinasyonu içeren ancak agar içermeyen MS besi ortamında süspansiyon kültürleri başlatıldı. Süspansiyon kültür koşullarının optimize edilebilmesi amacıyla farklı BBD [BAP, Kin (1.0 ve 0.5 mg/l) ile 2,4-D (1 mg/l)] kombinasyonları içeren, farklı çalkalama hızları (90, 95, 100 ve 110 rpm), farklı ışık yoğunlukları (karanlık ve ışık), farklı sıcaklık dereceleri (4, 25, 37 °C), farklı pH ortamları (4,5, 5, 5.8, 6,5 ve 7.0), farklı şeker tipleri (sukroz ve glukoz) ile bunların farklı kombinasyonlarına (15, 30, 50 mg/l) tabii tutulan MS besi ortamında kültüre alınarak ayrı ayrı test edildi. Test edilen farklı BBD kombinasyonları arasındaki en etkili ortamın, paketlenmiş hücre hacmi (PHH, ml/l), taze ve kuru ağırlık (g/l) değerleri açısından 1 mg/l BAP ve 1 mg/l 2,4-D ile desteklenen MS besi ortamı olduğu tespit edildi. Ancak kültürlerin sürdürülebilirliği ve somaklonal varyasyonlara sebebiyet vermemek adına optimizasyon çalışmalarına test edilen parametreler bakımından aralarında istatistiksel olarak fark bulunmayan 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D BBD kombinasyonu ile devam edilmiştir. Kök ve yaprak süspansiyon kültürlerinin optimizasyonu üzerine denenen söz konusu parametreler bakımından en yüksek PHH, taze ve kuru ağırlık sonuçları 25 °C sıcaklık, 95 rpm çalkalama hızı, pH 5 ile 15g/l (kök) ya da 30 g/l sukroz (yaprak) destekli MS besi ortamından elde edilmiştir. Elde edilen bu veriler ışığında sakız hücre süspansiyon kültürüne ait büyüme fazlarının her birine (lag fazı, eksponansiyel veya log fazı, lineer faz, yavaşlama fazı ve durağan faz) ilişkin zamana bağlı olarak PHH'yi gösteren bir büyüme eğrisi oluşturulmuştur. Hücre süspansiyon kültürleri her 28 günde bir alt kültüre alınarak % 3 sukroz, 1 mg /l 2,4-D ve 1 mg/l Kin destekli MS besi ortamında düzenli olarak muhafaza edilmiştir. Tez çalışmamızdan elde ettiğimiz bu bulgular, sakız hücre süspansiyon kültürlerinin, biyoreaktörlerde değerli kimyasalların büyük ölçekli üretimi için uygun olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Hücre süspansiyon kültürleri, optimizasyon, PHH, *Pistacia lentiscus* L., sakız.

## ABSTRACT

## MS THESIS

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

Ayşe HOŞER

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

Advisor: Prof. Dr. Engin TILKAT

2018, 74 Pages

Jury

Prof. Dr. Engin TILKAT

Prof. Dr. Ahmet ONAY

Doç. Dr. Filiz AKBAŞ

In this study, a protocol was developed for the initiation and optimization of cell suspension cultures from *in vitro* germinated seeds of *Pistacia lentiscus* L. (mastic tree). Callus tissue was first obtained from axenic leaves and root explants of mastic seedlings germinated *in vitro* and then cell suspension cultures were initiated from these callus lines. To initiate suspension cultures, *P. lentiscus* L. seeds were first germinated in Murashige and Skoog (MS) medium containing 1 mg / l IBA. Root and leaf explants were cultured in MS medium containing BAP, Kin and 2,4-D (1 mg/l each) to produce callus. The best plant growth regulator (BBD) combination for callus formation was determined as an agar-free liquid MS medium containing 1 mg/l Kin and 1 mg/l 2,4-D and suspension cultures were initiated. In order that the suspension culture conditions can be optimized, the combinations of different BBD (BAP, Kin (1.0 and 0.5 mg/l) and 2,4-D (1 mg/l)), different shaking speeds (90, 95, 100 and 110 rpm), different light intensities (dark and light), different temperature grades (4, 25, 37 ° C), different pH media (4,5, 5 and 7.0), different types of sugar (sucrose and glucose) and their different combinations (15, 30, 50 mg / l) were separately tested by cultured on a MS medium. The most effective medium among the different BBD combinations tested was determined as MS medium supplemented with 1 mg/l BAP and 1 mg/l 2,4-D in terms of packed cell volume (PCV, ml/l) and fresh and dry weight (g/l). However, in order not to cause somaclonal variations at the same time in terms of sustainability of cultures, optimization studies were continued with the combination of 1 mg/l Kin and 1 mg/l 2,4-D, which is no statistical difference between the combination of 1 mg/l BAP and 1 mg/l 2,4-D. In terms of the parameters tested on the optimization of root and leaf derived suspension cultures; the highest PCV, fresh and dry weight results were obtained from MS medium applied 25 °C temperature, 95 rpm agitation speed, pH 5 and supplemented with 15g/l or 30 g/l sucrose (for root and leaf derived cultures, respectively). In the light of the data obtained, a growth curve showing PCV depending on the time for each of the growth phases (lag phase, exponential or log phase, linear phase, deceleration phase and stationary phase) of the mastic cell suspension cultured was created. Cell suspension cultures were maintained regularly by subcultured every 28 days in MS medium supplemented with 3% sucrose, 1 mg/l 2,4-D and 1 mg/l Kin. These findings from our studies suggest that cell suspension cultures of mastic tree may be suitable for large-scale production of fine chemicals in bioreactors.

**Keywords:** Cell suspension cultures, optimization, PCV, *Pistacia lentiscus* L., mastic.

## ÖNSÖZ

Hücre süspansiyon kültürleri, kallus kültürleri yoluyla direkt olarak yapılması mümkün olmayan birçok çalışma ve hücre fizyolojisi, biyokimya, metabolik mühendisliği çalışmaları için, tek hücre ve küçük hücre agregatları seviyesinde gerçekleşen metabolik olaylar hakkında birçok önemli bilgiye ulaşmamızı sağlayan önemli bir tekniktir. Tek hücre veya küçük hücre agregatlarından başlayarak bir organ veya embriyo oluşumu, tıbbi olarak önemli bitkilerden elde edilen süspansiyon kültürleri yoluyla, fenolik bileşenler, terpenler ve alkaloidler gibi sekonder metabolitlerin üretimi, mutant bitkilerin yetiştirilebileceği mutant hücre klonlarının üretilmesi, sonrasında bu klonlardan mutant bitkilerin elde edilmesi ve böylece hem morfolojik hem de metabolik/biyokimyasal farklılıklar elde edilmesi bu yöntemin sunduğu avantajlardan bazılarıdır. Triterpenoidler gibi tıbbi öneme sahip daha pek çok önemli sekonder metaboliti bünyesinde barındıran *Pistacia lentiscus* L., kanserle mücadele çalışmaları için de alternatif bir hammadde kaynağıdır. Bu nedenle bitkinin içerdiği bu değerli sekonder metabolitlerin, hücre süspansiyon kültürleri yoluyla üretilme ve/veya arttırılma olanaklarının araştırılması için optimize edilmiş bir hücre süspansiyon kültürü protokolünün geliştirilmesi önem arz etmektedir.

Tez konumun belirlenmesi ve yürütülmesi aşamalarında tecrübe ve bilgisinin yanında, her türlü yardımlarını esirgemeyen danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Engin TİLKAT'a şükranlarımı sunarım. Tez çalışmalarım boyunca güleryüz, samimiyet ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Emine AYAZ TİLKAT'a ve çalışma tecrübelerini paylaşan, çalışma ortamımızı güzel bir paylaşım ortamına dönüştürmesinde büyük katkısı olan Öğr. Gör. Veysel SÜZERER'e ve tez çalışmamın yürütülmesinde 114Z842 Nolu proje ile destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkürü bir borç bilirim. Son olarak her zaman fedakârlık ve desteklerini yanımda hissettiğim canım aileme sonsuz teşekkür ve minnettarlığımı sunarım.

Ayşe HOŞER  
BATMAN-2018

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	ix
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	8
2.1. <i>P. lentiscus</i> ile İlgili Sistematik Bilgiler .....	8
2.1.1. Anacardiaceae familyası .....	8
2.1.2. <i>Pistacia</i> L. cinsi .....	8
2.1.3. Türkiye’de yayılış gösteren <i>Pistacia</i> türlerinin teşhis anahtarı .....	8
2.1.4. <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....	9
2.2. Hücre Süspansiyon Kültürleri ile İlgili Çalışmalar.....	13
2.2.1. Süspansiyon kültürlerinin başlatılması ve bitki rejenerasyonu çalışmaları ..	13
2.2.2. Süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolitlerin tespiti ve artırılması çalışmaları .....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
3.1. Materyal .....	19
3.2. Yöntem.....	19
3.2.1. Hücre süspansiyon kültürü için ön hazırlıklar .....	19
3.2.1.1. Stok solüsyonların hazırlanması .....	19
3.2.1.2. Sterilizasyon işlemleri .....	21
3.2.2. Doku kültürü çalışmaları .....	22
3.2.2.1. Tohumların yüzey sterilizasyonu ve çimlendirilme çalışmaları .....	22
3.2.2.2. Juvenil sürgünlere ait stok kültürlerin elde edilmesi ve proliferasyon çalışmaları .....	23
3.2.2.3. Kallus kültürlerinin başlatılması çalışmaları.....	23
3.2.3. Süspansiyon kültürü çalışmaları .....	24
3.2.2.1. Süspansiyon kültürlerinin başlatılması.....	25
3.2.2.2. Süspansiyon kültürlerinin optimizasyonu .....	25
3.2.2.2.1. Farklı şeker tiplerinin etkisi .....	26
3.2.2.2.2. Farklı ışık yoğunluklarının (karanlık ve aydınlık) etkisi .....	26
3.2.2.2.3. Farklı çalkalama hızlarının etkisi.....	26
3.2.2.2.4. Farklı BBD kombinasyonlarının etkisi .....	27
3.2.2.2.5. Farklı pH uygulamalarının etkisi .....	27
3.2.2.2.6. Farklı sıcaklık uygulamalarının etkisi.....	27
3.2.2.3. Süspansiyon kültürlerinde taze ve kuru ağırlıkların hesaplanması ve büyüme parametreleri.....	28

<b>4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>30</b>
4.1. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu ve Kültür Başlatma Çalışmalarına ait Bulgular ve Tartışma .....	30
4.2. Kallus Kültürlerinin Başlatılması, Çoğaltılması ve Muhafazası Çalışmalarına ait Bulgular ve Tartışma .....	32
4.3. Süspansiyon Kültürlerinin Başlatılması, Çoğaltılması ve Optimizasyon Çalışmalarına ait Bulgular ve tartışma.....	36
4.3.1. Kültürlerinin gelişimine farklı BBD kombinasyonlarının etkisi .....	38
4.3.2. Farklı sıcaklık uygulamalarının etkisi.....	39
4.3.3. Farklı çalkalama hızlarının etkisi.....	41
4.3.4. Işık koşullarının etkisi.....	42
4.3.5. pH'ın etkisi .....	44
4.3.6. Farklı şeker tipi ve konsantrasyonlarının etkisi .....	45
4.4. Juvenil Kök ve Yaprak Orjinli Süspansiyon Kültürlerinde Büyüme .....	47
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>51</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>56</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>62</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
2,4-D	: 2,4 Diklorofenoksi asetik asit
2iP	: 2-izopentiladenin
AgNO <sub>3</sub>	: Gümüş nitrat
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
CHN	: Kitosan oligomerleri
cm	: Santimetre
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	: Kobalt klorür hegzahidrat
CuSO <sub>4</sub>	: Bakır sülfat
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	: Bakır sülfat pentahidrat
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiriboz nükleik 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
KPa	: Kilopaskal
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografisi-Kütle spektrometresi
Lux	: Lüks
m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>	: metre <sup>2</sup> /saniye
MeJA	: Metil jasmonat
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	: Amonyum nitrat
NO	: Nitrik oksit
PAL	: Fenilalanin amonyum liyaz
pH	: Hidrojen iyon konsantrasyonu
PHH	: Paketlenmiş Hücre Hacmi
RA	: Rosmarinik asit
rpm	: Rotate per minute (dakikadaki dönüş sayısı)
s	: Saat
Sn	: Saniye
TDZ	: Thidiazuron
UHPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
UV	: Ultraviyole
YHA	: Yaş hücre ağırlığı
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	: Çinko sülfat heptahidrat
µM	: Mikromolar
BBD	: Bitki Büyüme Düzenleyicileri
MS	: Murashige ve Skoog Besi Ortamı
BAP	: Benzylaminopurine
KIN	: Kinetin
2,4-D	: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

## 1. GİRİŞ

Son yıllarda bitki biyoteknolojisi ve uygulamaları arasında özellikle moleküler genetik, rekombinant DNA teknolojisi ile doku ve hücre kültürü tekniklerinin yaygın bir şekilde kullanımı, ekonomik, tıbbi ve zirai açıdan önem arzeden ürün ve fitokimyasalların üretilmesinde yeni imkânlar sağlamıştır. Bitki doku kültürü teknikleri, binlerce biyoaktif kimyasalın üretimine olanak sağlayan, tarıma dayalı endüstri açısından katma değeri çok yüksek ürünlerin eldesine yönelik bir ileri teknoloji uygulamasıdır. Bitki, hücre ve süspansiyon kültürleri; bitki biyoteknolojisi uygulamalarının yanısıra bitki biyokimyası ve moleküler biyoloji ile ilgili çok çeşitli temel çalışmalarda sıklıkla kullanılan önemli bir araç olup, farklılaşmış (tüm bitki ve organ kültürleri) veya farklılaşmamış kültürlerle (Kallus, hücre süspansiyonları ve protoplast kültürleri) ait tek veya çok hücreli agregatların, çalkalanan sıvı bir ortam içerisinde süspansiyon halinde yüksek miktarda üretilebildiği bir kültür tekniğidir. Kültüre edilmiş bitki hücreleri iki biçimde saklanabilir; ilki aseptik koşullarda agar gibi uygun katı besiyerlerinde kallus şeklinde, ikincisi ise aseptik koşullarda sıvı besiyerlerinde süspansiyon kültürü adı verilen küçük hücre kümeleri şeklindedir.

Bitki hücre süspansiyon kültürü yöntemlerinin; (1) mevsimden ve çiçeklenme döneminden bağımsız olarak sürekli taze materyal temini; (2) Optimum yetiştirme koşullarının doğada yetiştirilen bitkilerle kıyaslandığında kolaylıkla standardize edilebilmesi; (3) ekstrakte edilen bileşenlerin, patojen veya çevresel kontaminasyon riski taşımayacak şekilde güvenli ve temiz olarak elde edilmesi; (4) herhangi bir tarım arazisine ihtiyaç duyulmadan, çok daha az su tüketimi sayesinde son derece sürdürülebilir üretim sistemi oluşturması; (5) genetik veya biyokimyasal araçlar kullanılarak kültürlerde çok yönlülük sağlanabilmesi: İstenen bileşiklerin konsantrasyonu kültür koşullarının ve fiziksel parametrelerin değiştirilmesi veya kültür ortamına indükleyici bir bileşiğin eklenmesi yoluyla arttırılabilir ve optimize edilebilir. (6) çoğu durumda ekstraksiyon işleminin daha kolay ve daha az zaman alıcı olması, gibi birçok avantaja sahip olduğu bilinmektedir (Barbulova ve ark., 2014). Bitki hücre süspansiyon kültürü yöntemleri istenilen aktif bileşiklerin bitkilerdeki biyosentez yolunun anlaşılması, sekonder metabolit üretimi ve bir bitki çoğaltım yöntemi olması nedeniyle de önem taşımaktadır.

Birçok yüksek yapılı bitki, çeşitli bilimsel, teknolojik ve ticari uygulamalar için hammadde oluşturmak üzere ekonomik açıdan önemli fitokimyasal maddeler (örn.,

Alkaloidler, terpenler, fenolik bileşikler, vb.) içerir. Bitki sekonder metabolitleri, bitki savunma sisteminde önemli işlevleri olan organik kimyasallar olup insan sağlığı açısından birtakım koruyucu işlevlere sahiptirler ve aktif farmasötiklerin önemli bir kaynağını temsil etmektedirler. Bitki hücre süspansiyon kültürleri, ticari olarak yüksek değere sahip olan bu sekonder metabolitlerin üretimi için çok değerli imkânlar sağlar.

Her ne kadar başarısızlıkla sonuçlanmış olsa da, ilk kez izole edilmiş bitki hücrelerinin kültüre alınması Haberlandt (1902) tarafından gerçekleştirilmiş ve böylece hücre süspansiyon kültürlerinin temelleri atılmıştır. Daha sonra Muir (1953), *Nicotiana tabacum* bitkisinin kallus parçalarının hücre süspansiyonu şeklinde kültürlenebileceğini rapor etmişlerdir. 1956 yılına gelindiğinde ise, Steward ve Shantz, havuç kök eksplantlarından süspansiyon kültürlerinin başlatıldığını ve kültürlerden çok sayıda bitkicik elde ettiklerini bildirmişlerdir. Günümüze değin pek çok bitkinin, hücre süspansiyon kültür teknikleri kullanılarak hücre metabolizmasının indüklenmesi ve sekonder metabolit üretimi gibi çok çeşitli amaçlarla kullanıldığı bilinmektedir. Bunların arasında ürünün iyileştirilmesi için kullanılan tek hücre hatlarının eldesi, metabolik yolların aydınlatılması, yüksek verimli kültürler ve üstün tarımsal özelliklere sahip bitkilerin üretilmesi de sayılabilir. Hücre süspansiyon kültürleri, araştırma konusuna uygun olarak istenen hücre hatlarının oluşturulmasına ve seçimine imkân sağladığı gibi ekonomik öneme sahip sekonder metabolitlerin ve diğer doğal bileşiklerin üretilmesi için de değerli bir platform sağlar (Moscetiello ve ark., 2013; Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2016). Bu bağlamda, tıbbi öneme sahip bitkilerden elde edilen süspansiyon kültürleri; özellikle alkaloidler, uçucu yağlar, reçineler, tanenler, glikozitler ve saponinler gibi sekonder metabolitlerin üretimi ve arttırılması çalışmaları için uzun yıllar boyunca uygulanmıştır (Akçam-Oluk, 2006). Literatürlerde hücre süspansiyon kültürleri aracılığı ile yüksek miktarda üretilen çok sayıda ekonomik öneme sahip sekonder metabolit mevcuttur. Bunlara örnek olarak, şikonin (*Lithospermum erythrorhizon*), ginsenosid (*Panax ginseng*), rosmarinik asit (*Coleus blumei*) ve nikotin (*N. tabacum*) verilebilir (Topçu ve Çölgeçen, 2015).

Araştırma materyalimizi oluşturan sakız ağacı (*Pistacia lentiscus* L.), Sapindales takımının Anacardiaceae familyasından *Pistacia* cinsine dâhil bir türdür (Stevens, 2008). Sakız (*P. lentiscus* L.) *Pistacia* familyasının diğer üyelerinden (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. palaestina*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk* vb.) herdem yeşil olması ve kendine özgü aromatik ve tıbbi önemi olan reçinesi sayesinde farklılık arz eder (Onay ve ark., 2016a). Sakız ağacı hemen hemen bütün Akdeniz kıyılarında özellikle Ege kıyı ve



mastikadienonik asit, isomastikadienonik asit, mastikadienolik asit, isomastikadienolik asit olduğu rapor edilmiştir (Giaginis ve Theocharis, 2011; Bozorgi ve ark, 2013). Oleanolik asit ve ursolik asit triterpenoidlerinin, sentetik türevleri yüksek antitümör aktivite gücüne ve normal dokularda düşük toksisiteye sahip olmasıyla karakterize edilen yeni anti-kanser terapötik maddelerin son derece güçlü bir sınıfı olarak kabul edilmiştir (Liby ve ark., 2007; Setzer ve Setzer, 2003; Kress ve ark., 2007; Sun, 2008; Petronelli ve ark., 2009). Tanımlanan uçucu bileşenler arasında  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -myrcene,  $\beta$ -pinene ve limonene majör bileşenler olarak bulunmuştur. Ayrıca sakız yağının antimikrobiyal aktivitesine önemli katkıda bulunduğu bilinen Verbenone,  $\alpha$ -terpineol ve linalool gibi çok sayıda iz bileşen de bulunmuştur. Sakız reçinesinin %3'ünün esansiyel yağ, % 25'inin polimer poli  $\beta$ -myrcene ve % 72'sinin polimer içermeyen sakız ekstraktından meydana geldiği rapor edilmiştir (Sarantinidis ve Smyrnioudis, 2011).

Ülkemizde hobi amaçlı üretim haricinde ticari sakız reçinesi üretimi yapılmamaktadır. Sakız adasında 1500'lü yıllardan beri ticari olarak sakız reçinesi üretiminin yapıldığı ile ilgili literatür bilgileri mevcuttur. 1550 yılında adayı ziyaret eden Avrupalı yazar De Nicolai tarafından sakız üretiminin 7.200 kg olduğu, 1630 yılında ise yıllık üretimin 12.000 kg olduğu De Stoochove tarafından rapor edilmiştir. Sakız adasında yapılan reçine üretim miktarları incelendiğinde; 2003 yılında 83.389 kg ile en düşük ve 2005 yılında ise 158.390 kg ile en yüksek oranda gerçekleşmiştir. 2012 yılındaki büyük yangına rağmen üretim miktarı 116.563 kg olmuştur. 2011 yılından itibaren üretimdeki dalgalanmanın azaldığı görülmektedir. 1930-2000 yıllarında değişik kaynaklarda verilen üretim miktarlarının 2000'li yıllarda düşük olarak gerçekleşmesi, sakız reçinesi üretiminin yıllık iklim koşullarına bağlı olarak gerçekleştiği kanısını desteklemektedir. Özellikle düşük kış sıcaklıkları ve yaz döneminde meydana gelen yağışlar sakız kalitesinin düşmesine neden olduğu gibi üretim miktarının da önemli derecede azalmasına neden olduğu düşünülmektedir (Onay ve ark., 2016a).

Sakız reçinesi, daha çok erkek sakız ağacının gövdesinde yapılan çiziklerden damlacıklar halinde sızan aromatik bir bileşiktir (Mills ve White, 1977; Duke, 1983; Mills ve White, 1989; Dalby, 2003). Erkek bitkilerin sakız üretim potansiyelinin dişilerden fazla olduğu belirlenmiştir (Boztok, 1999).

Sakız ağacı, kutsal kitaplarda adından bahsedilen (Duke,1983; Włodarczyk, 2007) ve reçinesi tarih boyunca geleneksel tıpta birçok hastalığın tedavisinde kullanılan bir bitkidir. İlk tarihi kayıt MÖ 5. yüzyılda Herodot tarafından rapor edilmiştir. Hipokrat sakız reçinesini jinekolojik hastalıklara karşı bir ilaç olarak kabul etmiştir. Yunan hekim

ve botanikçi Discorides, "De Materia Medica" isimli çalışmasında, sindirim sistemi rahatsızlıklarına karşı sakızın tıbbi özelliklerinden bahsetmiştir. Galen; sakızın, kan miktarını artırdığını, kronik öksürüğün, bronşit ve zatürre tedavisinde kullanıldığını rapor etmiştir. Ayrıca yılan sokması, uyuz, mide ve bağırsak iltihapları ve kellik tedavisinde kullanıldığına dair bilgiler vermiştir. Pliny ve Theophrastus sakız reçinesinin, sıkılaştırma, yatıştırıcı ve antiseptik özellikler gösterdiğini bildirmişlerdir. Roma dönemi doktorları Sakız reçinesini diğer otlar ile birlikte ilaç olarak reçetelemişlerdir. Eski Mısır'da Firavunların mumyalanması işlemlerinde de sakız kullanılmıştır (Paula Alexandra da Silva Veiga, 2018). Tarihsel kaynaklara göre Sakız ağacı 1. yüzyıldan itibaren Sakız adasında kültüre alınarak farmasötik amaçlar için kullanılmıştır. Sakız ticareti, Bizans imparatorluğu döneminde imparatorluğun toplam gelirlerinin yaklaşık 1/5'i gibi yüksek bir oranını oluşturmuştur. Cenevizliler (1346-1566) tarafından Sakız adasının fethedilmesinin amacı aslında sakız reçine ticaretinin kontrol altına alınmasıdır. Türk egemenliği sırasında ise Sakız üretimi yapılan Mastihohoria köylerine özel ayrıcalıklar tanınmıştır. Sakız reçinesi ekonomik anlamda yalnızca adada yetişen belirli bir varyete (*Pistacia lentiscus* var. chia) tarafından üretildiği için Sakız Adasına Fenike dilinde sakız anlamına gelen Chios denilmiştir. İbn Sînâ El-Kânûn Fî't-Tıbb Adlı Eserinin "Geriatrı" ile ilgili bölümlerinde sakızın bağırsak düzenleyici olarak yaşlılık döneminde kullanılması gerektiğini vurgulamıştır (Acıduman ve İlgili, 2010). Yine İbn Sînâ tedavilerinde Hipokrat'a benzer olarak sakız reçinesini [mastika] jinekolojik hastalıklara karşı tedavi amaçlı kullanmıştır. Sakız reçinesinin Hipokrat'tan günümüze kadar ilaç hammaddesi olarak sanayide gıda, içki, tekstil, kozmetik, deri boyalarında kullanıldığı bilinmektedir. Sakızın tıp tarihinde binlerce yıllık geçmişi vardır. MS 4.yüzyıldan 7. yüzyıla kadar mide iltihabı, öksürük, bağırsak ve ciğer hastalıklarında iyileştirici özelliğinden dolayı kullanıldığı bilinmektedir (Onay ve ark., 2016b).

Sakız reçinesinin Hipokrat, Dioscorides, Theophrastus ve Galenos gibi antik Yunan bilim adamları zamanından beri gastralja, dyspepsia ve peptik ülser gibi değişik gastrointestinal rahatsızlıkların tedavisi için kullanıldığı bilinmektedir (Mills ve White, 1997; Duke, 1983; Mills ve White, 1989; Dalby, 2003). Günümüzde ise sakız reçinesi likör, içecek, yiyecek, ciklet, diş macunu, losyon ve diğer kozmetiklerde destekleyici olarak ve sakız adasında yaşayan insanlar tarafından peptik ülsere karşı korunma ve karın ağrısının giderilmesinde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Grieve, 1994; Serpico, 2000). Son 30 yıl içerisinde, sakız reçinesinin yaygın olarak çeşitli insan

rahatsızlıklarına karşı potansiyel tedavi edici özellikleri için çalışılmıştır. Birçok araştırmacı sakız reçinesinin gastrointestinal rahatsızlıklara yararlı etkilerini ve *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, ve *Porphyromonas gingivalis* suşlarına karşı antimikrobiyal özelliklerini araştırmıştır (Al-Habbal ve ark., 1984; Al-Said, 1986; Huwez ve Al-Habbal, 1986; Iauk ve ark., 1996; Koutsoudaki ve ark., 2005; Sterer, 2006; Paraschos ve ark., 2007). Antibakteriyel özelliklerinin ötesinde, sakız reçinesinin ayrıca antiinflamatuvar, antioksidan, antiaterojenik olarak fonksiyon gösterdiği, hepatoprotektif, kardiyoprotektif özelliklere sahip olduğu da rapor edilmiştir (Janakat ve Al-Merie, 2002; Ljubuncic ve ark., 2005; Triantafyllou ve ark., 2007; Andrikopoulos ve ark., 2003; Dedoussis ve ark., 2004; Assimopoulou ve ark., 2005; Zhou ve ark., 2009; Kim ve Neophytou, 2009; Loizou ve ark., 2009; Orhan ve ark., 2006). Diş hekimliğinde, sakız reçinesi bakteri büyümesine karşı oral antiseptik olarak kullanılarak dişlerde plak oluşumuna karşı koruma sağlamaktadır (Aksoy ve ark., 2007; Takahashi ve ark., 2003). Sakız reçinesinin Crohn hastalığına sahip insanların plazma inflamatuvarının düzenlenmesi ve hastalığın klinik seyri üzerine faydalı etkileri de rapor edilmiştir (Kaliora ve ark., 2007a; Kaliora ve ark., 2007b). Son birkaç yılda giderek artan sayıdaki çalışmalarla, sakız reçinesinin gelecekte kimyasal yolla kanserin engellenmesi uygulamalarına temel oluşturmak için, insanda kansere neden olan çeşitli tipte tümörlere karşı potansiyel antiproliferatif özellikler gösterdiği tespit edilmiştir (Giaginis ve Theocharis, 2011).

Hücre süspansiyon kültürleri, sekonder metabolit üretimi ve artırılması bakımından en çok tercih edilen yöntemlerden biridir ve gerekli optimizasyonlar sağlanırsa biyoreaktör sistemlerinde çok yüksek miktarda bu metabolitlerin üretimi mümkün olabilmektedir. Bu çalışmaların çoğunda, her bitkinin etkin bir hücre süspansiyon kültürü başlatılması ve optimizasyonu tekniğinin oluşturulması ön koşuldur. Bununla birlikte yaptığımız literatür taramalarında gerek *P. lentiscus* L. bitkisinden süspansiyon kültürlerinin başlatılması ve gerekse de kültür şartlarının optimizasyonu ile ilgili herhangi bir çalışmanın bulunmadığı belirlenmiştir. Sakız ağacı ve reçinesinin içerdiği yukarıda değindiğimiz pek çok uçucu ve uçucu olmayan tıbbi öneme sahip sekonder metabolitler nedeniyle, bu bitki türünde hücre süspansiyon kültürlerinin başlatılması ve optimizasyonunun gerçekleştirilmesi, bu değerli metabolitlerin kitlesel ölçekte üretimi için gerekli temel bilgilerin elde edilmesi bakımından önem arz etmektedir.

Bu bağlamda **tez çalışmamızın amacı**, *in vitro* çimlendirilmiş tohumlardan elde edilen sakız bitkisine ait aksenik yaprak ve kök eksplantlarından, hücre süspansiyon kültürlerinin başlatılması ve optimizasyonu için bir protokol geliştirmektir. Tez çalışmamızda bu amaç doğrultusunda sakız bitkisine ait aksenik yaprak ve kök eksplantlarından, hücre süspansiyon kültürleri başlatılmış ve optimizasyonu için bir protokol tanımlanmıştır.



## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

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

#### 2.1.1. Anacardiaceae familyası

Çoğu ılıman bölgelerde yetişen, genellikle tüysüz, bir veya çok yıllık otsu bitkilerdir. Genellikle kabukları reçineli ağaçlar veya çalılardır. Yapraklar alternat, basit, trifoliat veya pinnat, stipülsüz, çiçekler uçta veya yaprak koltuklarında panikula durumunda, erdişi veya tek eşeyli, çoğunlukla aktinomorf simetrlili, sepallar 3-5, kaidede birleşmiş veya nadiren hiç yoktur. Petaller 3-5 adet, serbest veya kaidede birleşik veya nadiren hiç yok, stamenler petallerin iki katı kadar, nadiren daha çok veya az, iki halkada dizilmişlerdir. Pistil 1, ovaryum üst durumlu, genellikle bir lokuluslu ve 3 karpelli, nadiren 5 lokulus ve karpelli, ovüller her lokulusta tek, anatrop, plesantasyon parietal veya bazal görünüşlü, meyve drupa'dır (Seçmen ve ark., 2008). Dünyada hemen her bölgeye yayılmış olup yaklaşık 77 cins ve 600'ün üzerinde türü barındıran Anacardiaceae familyasının Türkiye'de 7 cinsi ve 80'e yakın türü bulunmaktadır (Ming, 1980; Stevens, 2008; Kılınç, 2015; Davis 1967).

#### 2.1.2. *Pistacia L. cinsi*

2 evcikli (dioik), yaprak döken veya herdem yeşil ağaçlar veya çalılardır. Yapraklar pinnat, nadiren trifoliat veya basit yapıdadır. Kaliks 5 parçalı, apetal ve meyve bir tohumlu drupa'dır. Akdeniz ve Asya bölgesinde yayılış gösteren 20 kadar türü vardır.

#### 2.1.3. Türkiye'de yayılış gösteren *Pistacia* türlerinin teşhis anahtarı (Onay ve ark 2016.)

1. Yapraklar büyük, 8 - 23 cm uzunlukta, 5.2 - 23 cm genişlikte
  2. Yaprak orta damarı kanatsız
    3. Yapraklar derimsidir veya derimsi duruma gelir
      4. Petiyol yassı; yaprakçık 3 – 5 adet, obtuz veya küçük mukrolu .....P. vera
      4. Petiyol yuvarlak, nadiren yassı; yaprakçık (3-)6-11adet, mukrolu.....P. terebinthus
    3. Yapraklar zarımsı
      5. Petiyol köşeli veya yuvarlak; yaprakçık 1-9 adet, akuminat .....P. khinjuk
      5. Petiyol köşeli veya yassı; yaprakçık 6-15 adet, daralmış....P. chinensis sbsp. falcata
    6. Yapraklar imparipinnat
      6. Yaprakçıklar paripinnat
        7. Yaprakçıklar geniş mızraksı, 6-11.5 cm uzunluğunda, 2 - 4 cm genişliğinde, ortalama oran 3.4-1.....P. chinensis subsp. integerrima
        7. Yaprakçıklar mızraksı, 4-10 cm uzunluğunda 9 – 24 mm genişliğinde, ortalama oran 4.1-1.....P. chinensis subsp. chinensis
  2. Yaprak orta damarı kanatlı.
    8. Yapraklar derimsi, 10 cm'ye kadar uzunlukta, her dem yeşil....P. saportae

8. Yapraklar zarımsı, 8 -18.2 cm uzunluğunda, düşücü  
 9. Yaprakçıklar (1-3-)5-7, 4.5 - 6.5 cm uzunluğunda, 1.5 - 3.8 cm genişliğinde, ortalama oran 2.3-1 .....*P. eurycarpa*  
 9. Yaprakçıklar (5-)7-11, 3 - 7 cm uzunluğunda, 5 - 20 mm genişliğinde, ortalama oran 3.5-1.....*P. atlantica*
1. Yapraklar küçük, 2 - 15.1 cm uzunluğunda, 1.8-10 cm genişliğinde  
 10. Yapraklar zarımsı.  
 11. Yaprakçıklar 4-10 adet, mukrolu, büyük belirgin damarları yok .....*P. lentiscus* subs *P. lentiscus*  
 11. Yaprakçıklar 6-16 adet tepede girintili büyük belirgin damarlı .....*P. lentiscus* subsp. *emarginata*  
 10. Yapraklar zarımsı.  
 12. Yapraklar paripinnat; yaprakçıklar (4-6)12-20 adet, genelde almaşık .....*P. weinmannifolia*  
 12. Yapraklar imparipinnat; Yaprakçıklar 10-30 adet, hiçbir zaman almaşık değil .....*P. mexicana*

#### 2.1.4. *Pistacia lentiscus* L.

Tez çalışmamızda kullanılan *P. lentiscus* L.'un sistematik hiyerarşisi aşağıda verilmiştir (Çizelge 2.1.).

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

Kingdom (Alem):	Plantae
Divisio (Bölüm):	Magnoliophyta
Clasis (Sınıf):	Magnoliopsida
Subclasis (Alt sınıf):	Rosidae
Ordo (Takım):	Sapindales
Famılya (Aile):	Anacardiaceae
Genus (Cins):	<i>Pistacia</i>
Species (Tür):	<i>Pistacia lentiscus</i> L.

##### 2.1.4.1. Morfolojik, biyolojik ve ekolojik özellikleri

1-5 metre yüksekliğinde, bazen 6 m'ye ulaşabilen boyu, genellikle çalı ve küçük ağaç yapısında her dem yeşil bir bitkidir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Çeşme Çiftlikköy'de yetişen dişi bir sakız ağacının genel görünümü, Bar: 66 cm (Onay vd., 2016)

**Gövde:** Dik ve silindir şeklinde, juvenil bireylerde açık gri renkte iken olgun bireylerde füme rengini alır. Ağacın gövdesi altı yaşından itibaren sakız vermeye başlar, 12-15. yaşlarında normal sakız verimine ulaşırlar (Perikos 1993; Anonim, 2014; Onay ve ark. 2016a). **Kök:** Uzunluğu 20-25 metre derinliğe ulaşabilir. Juvenil dönemde genellikle kazık kök yapısı olmakla birlikte çok sayıda adventif kök meydana getirebilir. Olgun dönemde ise; saçak kök oluşumu meydana gelir (Mattia ve ark., 2005). **Yaprak:** Yapraklar paripinnat 2-4, nadiren 3-5-7 yaprakçıktan oluşur (**Şekil 2.2.**). Bir ağaç farklı gelişim dönemlerinde değişik yaprak morfolojisine sahip olabilir. Lamina dikdörtgen, mızraksı veya oval şekilde iken uçları genelde sivrilerek sonlanır. *P. lentiscus*, cinsin en kalın yaprakçıklara sahip türüdür. Bazen aynı yaprağın üst ve alt morfolojileri dahi birbirinden farklılık gösterebilir. Erkek ağacın yaprak yapısı; genellikle paripinnat 1-3 çift yaprakçıklı, bazen imparipinnattır (3-5 yaprakçıklı). Dişi ağacın yaprak yapısı; genellikle paripinnat 2-3 çift yaprakçıklı ve yaprakçıklar eşit büyüklüktedir (Onay ve ark., 2016a)



**Şekil 2.2.** Dişi sakız ağacı yaprakları

**Çiçek:** İnfloresens gösteren çiçekler, koyu kırmızımsı veya sarımsı renkte olup bir panikuladır. Erkek çiçekler 8-10 stamenli, dişi çiçekler 2-3 karpelli, 1 ovül içeren ovaryumu kırmızı renkli stigmaya bağlayan kısa 3 loblu bir stilus mevcuttur. Dişi ağaçta her bir panikula için 8-24 adet çiçek bulunurken erkek ağaçlarda 11-23 adet çiçek bulunmaktadır (**Şekil 2.3.**). *Pistacia lentiscus*, cinsin diğer türlerinde olduğu gibi rüzgârla tozlaşan bir bitkidir (Whitehouse, 1957). Hem erkek hem de dişi ağaçlar için çiçeklenme dönemi mart ayının sonlarından mayıs ayının başına kadar sürer (Grundwag 1976; Martinez-Palie ve Aronne, 2000).



Şekil 2.3. Dişi sakız ağacı çiçek yapısı

**Meyve:** 4-7 mm çapındaki Drupa (eriksi) tipi meyveler, olgunlaştıkça kırmızıdan siyaha dönerler (Şekil 2.4.). Meyve gelişimi genellikle sonbahar mevsimini bulmaktadır.

**Tohum:** Çok sayıda çiçek ve meyve vermesine karşın çiçeklerin büyük kısmı meyve oluşturmamakta ve oluşan meyvelerin önemli bir kısmında içi boş tohum bulunmaktadır. Tohumlar olgunlaşma döneminde yuvarlak ve düz yüzeylidirler. Olgun tohumlar ekim-ocak ayları arasında toplanabilir (Onay ve ark., 2016). Bu türde yüksek oranda çiçek ve meyve meydana gelmesine rağmen tohum bulunan meyve sayısı düşük miktardadır (Martinez-Palle ve Aronne, 2000).



Şekil 2.4. Sakız ağacı meyveleri

Sakız ağacı, genellikle kalkerli, çakıl, toprak, kayalık, kireçtaşı ve tınlı kum, bir dizi habitatta oluşur; esas olarak kıyı bölgeleri ile sınırlıdır (Padulosi ve Hadj-Hasan 1998, Al-Saghir ve Porter 2012). Yunanistan'da bu tür zeytin ağaçlarının dağılımıyla örtüşmektedir (Zakynthinos ve Rouskas 2001). Lübnan'da, Lübnan Dağı bölgesinde, genellikle yıllık 800-1200 mm yağış alan bölgelerde 0-500 m'lik yüksekliklerde bulunur; Bu alanda ormanlık ve çalılık habitatlarda, yamaçlarda veya orman kenarlarında yetişir ve *Quercus*, *Pinus*, *Ceratonia*, *Olea* ve *Amygdalus* türleri ile ilişkilidir. Sıcak ve kurak Akdeniz ikliminde, 0 - 500 m yükseltilerde, deniz kıyılarında; sığ, taşlı, kayalık ve fakir topraklar üzerinde gelişebilir; kireç, deniz suyu ve rüzgâra

dayanır. Düşük sıcaklığın yansira yüksek sıcaklık ve aşırı kuraklıktan olumsuz etkilenir. Deniz kıyılarında tuzlu suya toleransı iyidir. Yetiştigi yerler itibariyle sakız ağacı kimi zaman kurak yamaçlarda maki bitkileriyle bir arada görülürken, kimi zaman nadiren de olsa kızılçam ormanlarının altlarında bulunur (Talhok ve ark. 2000).

#### **2.1.4.2. Ekonomik önemi**

Sakız ağacı'nın gövde ve dallarından yaralama ile “**Mastik**” adı verilen ve bileşiminde rezin ve uçucu yağ (% 1-2) taşıyan damla sakızı elde edilir. Sakız ağacından elde edilen sakız birçok amaç için kullanılmaktadır. Bunlar arasında doğal çiklet olarak, içeceklere aroma vermek, sakız yağı elde etmek, parfüm yapımı, diş macunu yapımı, cila yapımı, gıda sanayii ve tıbbi amaçlar sayılabilir (Paraskevopoulou ve Kiosseoglou, 2016). Ekonomik anlamda sakız üretimi sadece ağaç formundaki var. chia'dan elde edilmektedir. Chia'yı diğer yabani sakızlardan ayıran en önemli özellik, sahip olduğu ağaçsı büyüme karakteridir (Taşkın ve İnal, 2005). Sakız ağacı yetiştirme alanlarının daralması ve sayılarının azalması nedeniyle ülkemizde bir üretim potansiyeli oluşturmamaktadır. Yıllık 250 tonluk dünya üretiminin tamamı Yunanistan tarafından karşılanmakta olup üretim ve pazarlama etkinlikleri Sakız Adası'ndaki üreticiler birliğinin kontrolü altındadır (Bilgin, 2009). Aslında İzmir'in Çeşme ve Alaçatı ilçelerindeki sakız ağacı potansiyeli, Sakız Adası'ndan daha fazladır. Ancak bu yörelerde bitkiler ya üretim yapılamayan ya da terbiye edilmemiş bozuk nitelikte çalı formunda ağaçlardır. Dişi ağaçlarda az sakız salgılanmaktadır, ancak elde edilen sakız erkek ağaçtan alınan sakız ile karşılaştırıldığında daha kalitesiz olduğu görülmektedir. (Kılınç, 2013). 2009 verilerine göre Türkiye'nin yıllık sakız reçinesi gereksinimi yaklaşık olarak 18 ton civarındadır. Bu ihtiyaç, 2008 yılında 8 tonu ithal edilerek, TEMA'ya göre 10 tonu da kaçak olarak ülkemize sokularak temin edilmektedir (Akdemir ve ark., 2013).

#### **2.1.4.3. Tıbbi önemi**

Sakız reçinesinin tıbbi olarak günümüzde çok sayıda kullanım alanı bulunmaktadır. Peptik ülser, deri hastalıklarında, yanıklarda, egzama, kanser gibi hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Kolesterolü azalttığı ve yüksek kan basıncını düşürerek kalp krizi riskini düşürdüğü kanıtlanmıştır. Uçucu yağlarından kuduz hastalığı, uyuz ve yılan ısırılmaları tedavisinde faydalanılmıştır. Sakız ağacının toprak üstü kısımları, idrar söktürücü özelliklerinden dolayı uyarıcı olarak

kullanılmasının yanı sıra hipertansiyon, öksürük, boğaz ağrıları, ekzama, karın ağrısı, böbrek taşları ve sarılık tedavisinde de kullanılmıştır. Ayrıca Sakız ağacının fenolik bileşenlerinin de önemli derecede antimikrobiyal aktivite ve özellikle de antifungal etki gösterdiği rapor edilmiştir (Akdemir ve ark., 2013).

## 2.2. Hücre Süspansiyon Kültürleri ile İlgili Çalışmalar

Yapılan literatür incelemelerinde *Pistacia* cinsine ait türlerle ilgili olarak yapılmış bir hücre süspansiyon kültürü çalışmasına henüz rastlanmamıştır. Bu nedenle tez çalışmamın konusu ile ilgili olarak diğer odunsu ve otsu türlerde kaynak araştırması yapılmış olup 2 alt başlık halinde verilmiştir.

### 2.2.1. Süspansiyon kültürlerinin başlatılması ve bitki rejenerasyonu çalışmaları

**Falco ve ark., (1996)** şeker kamışı (*Saccharum* sp., var. SP 79-1011) hücre süspansiyonlarını, % 5 (v/v) hindistancevizi özü, 3 mg/L 2,4-D ve 500 mg /L kazein hidrolizat ile destekli MS ortamından elde edilen kalluslardan köken alan genç yaprakları kullanarak oluşturmuşlardır. Embriyojenik hücre sayısı, paketlenmiş hücre hacmi ve hücrelerin taze ve kuru ağırlıklarının ölçüldüğü çalışmada bitki rejenerasyonunun düşük oranda 2,4-D içeren ve içermeyen ile homojen olmayan sadece genç kültürlerden elde edildiği rapor edilmiştir.

**Sajid ve Aftab (2016)**, patates (*Solanum tuberosum* L.cv. Desiree) 'de hücre süspansiyon kültürlerinin geliştirilmesi üzerine yaptıkları çalışmada farklı kallus kültürlerinden sağlıklı, iyi beslenen dokular (kompakt, ufalanabilir, embriyojenik veya embriyojenik olmayan), 18.09µM, 2,4-D içeren MS, MS2 veya AA sıvı ortamlarında kültüre alınmış, sonuç olarak 25 ± 2 ° C'de fotoperiyod ve 120 rpm'de çalkalayıcı üzerinde, sekiz haftalık yarı saydam, kırılğan, kirli beyaz kallus kültürlerinin, diğer test edilen parametrelere kıyasla hücre süspansiyonu kültürlerinin başlatılması için en uygun materyal ve MS2 besi ortamının en uygun ortam olduğunu tespit etmişlerdir.

**Morais-Lino ve ark., (2008)** Brezilya'da yetişen bir muz çeşidi olan Terra Maranhão AAB (*Musa* spp. cv.Terra Maranhão, AAB)'nin somatik embriyojenezi yoluyla hücre süspansiyonu kültürü ve bitki rejenerasyonu üzerine yaptıkları çalışmada farklılaşma, olgunlaşma, somatik embriyonun çimlenmesi ve bitki rejenerasyonu için beş yarı katı kültür ortamı test edilmiştir. Sonuç olarak 11.4 µM IAA

ve 2.2  $\mu\text{M}$  BAP ile desteklenmiş MS ortamında Terra Maranhão AAB çeşidinin hücre süspansiyonlarından bitkilerin rejenere edilmesi mümkün olduğu rapor edilmiştir.

**Rahman ve ark., (2012)** tıbbi öneme sahip bir bitki olan *Abrus precatorius*'un *in vitro* rejenerasyonu için süspansiyon kültürü protokolü geliştirdikleri çalışmada kallusları, 0.5 mg/l BAP destekli MS sıvı ortamında kültüre almışlardır. Çalışma sonuçlarına göre, izole edilen hücrelerden en yüksek kallus üretimi, 0.5 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA destekli MS besi ortamından elde edilmiştir. En yüksek embriyo oluşumu ise 2.0 mg/l BAP ve 0.2 mg /l NAA içeren MS besi ortamından ve tek hücreden türetilen kalluslardan elde edilmiştir. 2.0 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA ile desteklenmiş MS ortamından optimum sürgün oluşumu kaydedilmiş ve optimum kök indüksiyonu ise, 1.0 mg/l IBA ile desteklenmiş MS besi ortamından alınmıştır. Köklenmiş bitkicikler başarılı bir şekilde saksı toprağına aktarılmış ve dış koşullara alıştırmıştır.

**Al-Khayri, (2012)** Hurma (*Phoenix dactylifera* L.)'da hücre süspansiyonu kültürleri ve mikroçoğaltımı üzerine yaptığı araştırmada sürgün uçlarından elde edilen kallusları 10 mg l<sup>-1</sup> NAA ve 1.5 mg l<sup>-1</sup> 2-iP içeren MS ortamında kültüre almıştır. Çalışma sonucunda en yoğun hücre plaklarını % 14.6 ve 10,000 hücre/ml<sup>-1</sup> ile katı besin ortamından elde etmiştir. Süspansiyon kütleleri fitohormon içermeyen katı ve sıvı ortamlara aktardıktan sonra, sıvı ortam içinde süspansiyon kütlelerinin, katı besi ortamına göre 3.5 kat daha fazla somatik embriyo oluşumu ile sonuçlandığını rapor etmiştir.

**Turgut-Kara ve Arı (2008)**, *Astragalus chrysochlorus*'un embriyojenik hücre süspansiyon kültürü aracılığı ile *in vitro* rejenerasyon protokolünü araştırmışlardır. 30 günlük aseptik fideler, 0.1 mg /lNAA, 1.0 mg/l BA içeren MS besi ortamında kültüre alınmış iki hafta içinde kallus oluşumu gözlemişlerdir. Kalluslar, 2,4-D, IAA veya NAA içeren MS sıvı ortamına aktarıldıktan iki hafta sonra, torpedo aşamasında somatik embriyoların oluştuğunu bildirilmişlerdir. Somatik embriyoların 0.5 mg/l IAA içeren MS ortamına aktarıldıktan iki hafta sonra % 2 oranında globüler embriyoların geliştiğini ve bu ortamda kültüre alınan embriyoların flow sitometri ile ölçümleri yapıldıktan sonra %81 oranında diploid kromozom sayısına sahip olduğunu, bitki rejenerasyonlarının %3 sukroz destekli ½ oranındaki MS sıvı besiyerinde gerçekleştirildiğini ve bir ay sonra 71 sürgünden 29'unun ½ oranındaki MS besi yerinden (% 1.5 sakaroz ve % 0.8 agar destekli) elde edildiğini belirtmişlerdir.

**Kermanee (2004)**, Khao Dawk Mali 105 ve Suphanburi 1 pirinç çeşitlerinin hücre süspansiyon kültürlerini sekiz farklı besi ortamında test etmiştir. Her iki çeşitte 2.0 veya 4.0 mg/l 2,4-D destekli N6 besi ortamında başarıyla kültüre almıştır. Çalışma sonucunda Khao Dawk Mali 105 pirinç çeşidinden elde edilen kalluslardan oluşturulan süspansiyon kültürlerinin (% 83.3), Suphanburi 1 pirinç çeşidine oranla (% 67.8) daha yüksek bir rejenerasyona sahip olduklarını bildirmiştir.

**Castellar ve ark., (2011)**, *Petiveria alliacea* L.'nin nodal segmentlerin MS0 besi ortamında kültüre alınması sonucunda elde edilen aksiller tomurcukların geliştirilmesi ile *in vitro* çoğaltımını gerçekleştirmişlerdir. 0.6 µM IAA içeren ½ oranındaki MS besi ortamında köklendirilen sürgünleri sera koşullarına transfer etmişler ve bu bitkilerin yaprak parçalarını, farklı NAA (2.7; 5.4; 10.7; 16.1 ve 26.9 µM), BAP (2.2; 4.4; 8.9; 13.3 ve 22.2), Kinetin (Kin) (2.3; 4.6; 9.2; 13.8; ve 23.0 µM), Picloram (PIC) (2.0; 4.0; 8.0; 12.0; ve 20.0 µM) veya 2,4D (2.2; 4.5; 9.0; 13.6 ve 22.6 µM) destekli MS ortamında kültüre alarak kallus oluşumunu sağlamışlardır. En yüksek kallus oluşumunu 13.6 ve 22.6 µM 2,4D ve 20.0 µM PIC varlığında elde ettikten sonra bu kalluslardan hücre süspansiyon kültürlerini de yine aynı besi yerlerinden oluşturmuşlardır.

### 2.2.2. Süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolitlerin tespiti ve arttırılması çalışmaları

**Chaudhry ve ark., (2014)** *Nigella sativa* Linn.'in *in vitro* olarak yetiştirilen fidelerinde farklı kısımlarından (yaprak, epikotil, hipokotil ve kök) süspansiyon kültürü aracılığıyla aktif bir bileşen olan timolün kalitatif tespitini araştırmışlardır. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, epikotil bölgesinden alınan kısımlarının Kin (2 mg/L) + NAA (1 mg/L) MS besi ortamında en iyi kallus oluşumu gözleendiği ve Kin (2 mg/L) + NAA (1 mg/L) ve BAP (2 mg/L) + IAA (1 mg/L) kombinasyonunun bulunduğu MS besi ortamından ise *N. sativa* 'da terpenoid üretimini arttırdığı sonucuna varıldığı bildirilmiştir.

**Stella ve Braga (2002)**, mantar enfeksiyonuna karşı fitoaleksinin kaynağı olan *Rudgea jasminoides* 'de öncelikle kallus kültürlerini, petiyol eksplantlarından tek başına PIC veya kinetin ile kombinasyonunu içeren modifiye MS besi ortamında başlatmışlardır. En yüksek kallus oluşumu 2.22 µM kinetin ve 2.07 µM PIC içeren katı besi ortamından elde etmişlerdir. Hızlı büyüyen ve beyaz renkli, kırılabilir kallus gelişimi ise sadece 8.28 µM PIC ile desteklenmiş kültürlerden elde edilmiştir. Hücre süspansiyon kültürleri, bu kırılabilir kallus parçalarının doğrudan agar içermeyen sıvı besi

ortamına aktarılmasıyla oluşturulmuştur. Bu sonuçların, *R. jasminoides*'in hücre süspansiyon kültürlerinin, Rubiaceae türleri tarafından üretilen indüklenmiş savunma metabolitlerini analiz etmek için yararlı bir sistemi temsil ettiğini ortaya çıkarmıştır.

**Escoriaza ve ark., (2013)**, yaptıkları çalışmada, asma hastalıklarıyla ilişkili mantarlardan biri olan *Phaeacremonium parasiticum* ile enfekte edilmiş *Vitis vinifera* cv. Chardonnay'ın kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinde, terpen sentaz (TPS) aktivitesi ve antifungal terpenoid metabolitlerin miktarlarını araştırmışlardır. Hem kallus hem de hücre süspansiyon kültürlerinde yüksek TPS aktivitesi gözlenmiştir. Hücre süspansiyon kültürlerinde TPS aktivitesinin elisitör uygulamasından sonraki ilk 8 saatte maksimum seviyeye ulaştığı, kallus kültürlerinde ise  $\alpha$ -pinene, nerolidol ve squalen bileşenlerinin elisitörden bağımsız olarak sentezlendiği ve elisitör miktarının artışı ile eş zamanlı olarak sözkonusu üç bileşenin de konsantrasyonunun arttığı tespit edilmiştir. Çalışma sonunda asma dokularının elisitör konsantrasyonuna cevabının de novo sentezi yoluyla TPS aktivitesinin artırılması yoluyla karakterize edildiği sonucuna varılmıştır.

**Chintalwar ve ark., (2008)** *Tinospora cordifolia* bitkisinin kök eksplantlarından kallus ve hücre süspansiyon kültürlerini başlatmışlardır. Hem kallus hem de hücre süspansiyon kültürlerinde berberin ve jatrorrhizine (protoberberine alkaloidler) birikimi olduğunu, kök ekstraktlarında berberin seviyelerine oranla daha yüksek seviyelerde jatrorrhizine bulunduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca bu alkaloidlerin ayrılması, tanımlanması ve kantitesi için bir HPLC yönteminin standardize edildiği bildirilmiştir.

**Behbahani ve ark., (2011)** yapraklarını eksplant olarak kullandıkları *Barringtonia racemose* bitkisini karanlık hem de ışık altında olmak üzere, değişik konsantrasyonlarda 2,4-D ile desteklenmiş MS, WPM ve B5 besi ortamlarında kültüre almışlardır. Kültür başlangıcından üç hafta sonra 2.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D içeren WPM besi ortamında hızlı büyüyen, kırılğan kallus oluşumu başlarken diğer tüm ortamlarda kültüre alınan eksplantlardan beş hafta sonra kallus oluşumunun başladığını bildirmişlerdir. HPLC analizi ile likopen içeriğinin tespit edildiği çalışmada ışık altında kültürlen bitkilerde likopen seviyesi ve üretimi karanlıkta kültüre alınan bitkilerden daha yüksek olduğunu ve en iyi büyüme oranlarının sırasıyla WPM ve B5 ortamlarından elde edildiğini ve likopen üretiminin hem kallus hem de süspansiyon kültürlerinde büyümeye bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

**Farjaminezhad ve ark., (2013)** kodein, morfin ve thebaininin ana kaynağı olan afyon alkaloidlerini bünyesinde barındıran ve tıbbi bitki olan İran gelinciği (*Papaver bracteatum*)'nde hücre süspansiyon kültürü için etkili bir protokol oluşturmak amacıyla,

farklı BBD (2,4-D, NAA, BAP ve kinetin)'lerinin kallus oluşumu ve hücre süspansiyon kültürü üzerindeki etkilerini değerlendirdikleri çalışmada maksimum kallus oluşum yüzdesinin (% 86.67) ve taze kallus ağırlığının, 1 veya 2 mg/L 2,4-D, 0,1 veya 0,2 mg/L kinetin ve 15 mg/L askorbik asit ile desteklenmiş MS ortamından elde edildiği, ortama 15 mg/L askorbik asit eklenmesinin eksplantların ve kallusların kahveringileşmesini azatmada etkili olduğunu, hücre süspansiyon kültürlerinde, 1 mg/L NAA, 1 mg/L BAP ve 15 mg/L askorbik asit ile desteklenmiş MS ortamının, değerlendirilen diğer parametrelere kıyasla maksimum hücre büyümesi ve çoğalmasını sağladığını rapor edilmiştir. Ayrıca uygulanan oksinler arasında NAA'in *P.bracteatum* hücre süspansiyon kültürlerinin büyümesinde 2,4-D'den daha etkili olduğu da belirtilmiştir.

**Surmuş-Asan ve ark., (2017)** tıbbi bitki olarak potansiyel bir öneme sahip *Hypericum retusum* üzerine BAP ve kinetin'in 2,4-D ile kombinasyonlarının, farklı sukroz konsantrasyonlarının (15, 30 ve 50 g L<sup>-1</sup>), farklı ışık uygulamalarının (Sürekli karanlık, Sürekli aydınlık ve kontrol) ve farklı başlangıç pH değerlerinin (pH 4.5, 5.8 ve 6.5), hücre süspansiyon kültürlerinde biyokütle birikimi ve farmakolojik olarak önemli beş adet fenolik bileşiğin (hiperisin, hiperosid, klorogenik asit, kuersetin ve psödohiperisin) miktarları üzerine etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak en iyi biyokütle birikiminin, 0.5 mg/l KİN+ 1.0 mg/l 2,4-D ve 30 g/l destekli MS besi ortamında, 5.8 pH'da ve sürekli karanlık şartlar altında olan ortamdan elde edildiğini, en yüksek fenolik bileşik içeriğinin, 0.1 mg/l BAP+ 0.5 mg/l 2,4-D ve 15 g/l sukroz ilaveli ve 4.5 pH'da olan ortamdan elde edildiğini rapor etmişlerdir.

**Nartop ve ark., (2015)** *Astragalus trojanus* Stev.,'a ait tohumları *in vitro* koşullarda çimlendirmiş en yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip 3 klonu ait gövde ve yaprak eksplantlarını farklı BBD (kinetin, NAA, 2,4-D, TDZ ve IAA) içeren besin ortamlarında, çevre koşulları (1000 ve 4000 lux ışık ve karanlık) besin ortamı bileşimlerine (MS ve WPM) maruz bırakarak kallus oluşturma kapasitelerini araştırmış ve hem MS hem de WPM besin ortamlarının kallus oluşumunu tetiklediğini bildirmiştir. Gövde eksplantlarında yaprak eksplantlarına göre daha yüksek miktarlarda kallus rejenerere olduğunu 4 ve 8 mg/L 2,4-D içeren WPM besin ortamlarında %100 kallus oluşumu tespit ettiğini, 100 µg/L selenyum ve iki kat WPM vitaminlerinin eklenmesiyle karanlık koşullarda kallus biyokütlesinin (78 mg) arttığını rapor etmiştir. Hücre süspansiyon kültürlerinde farklı elisitörler (MeJA, jasmonik asit, salisilik asit ve pektin) ve prekürsör ( $\beta$ -sitosterol) uygulamasını yaptığını, süspanse hücrelerde, 50 mM MeJA ile elisite edilmiş kültürlerin 14. gününde en yüksek astragalozit-IV içeriği, en yüksek

sikloastragenol içeriği 50 mM jasmonik asit eklenen kültürlerin 28. gününde saptadığı rapor etmiştir.

**Çetin ve Baydar (2016)**, asmada hücre süspansiyon kültürleri ile sekonder metabolit üretimini aydınlık, kadmiyum sülfat, metil jasmonat ve sakkaroz uygulamaları ile artırmaya yönelik yaptığı çalışmada, Gamay, Kalecik Karası ve kzgz zm çeşitlerine ait yaprak sapı orjinli kalluslardan hücre süspansiyon kültürlerini başlatmış ve farklı elisitör uygulamalarının genel olarak sekonder metabolit birikimini teşvik ettiğini rapor etmiştir. Aydınlık koşulların toplam fenolik madde, toplam flavonol ve antosiyanin miktarları üzerine olumlu etkileri olduğunu, karanlık uygulamasının ise trans-resveratrol birikimini arttırdığını gözlemlemiştir.

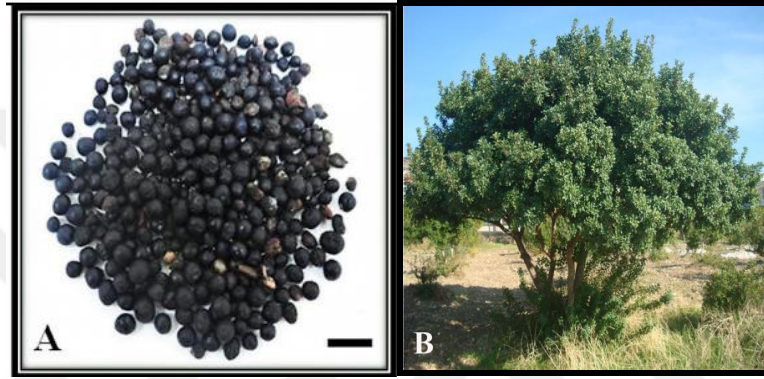
Literatür incelenmesinde görüldüğü gibi her bitki türü için süspansiyon kültürlerinin başlatılması ve optimizasyonu için her bir parametre ayrı ayrı çalışılmalıdır. Bu kapsamda bu çalışmada *P. lentiscus* eksplantlarından hücre süspansiyon kültürü başlatılması ve optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

### 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 Jüvenil 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. Jüvenil 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. Hücre süspansiyon kültürü için ön hazırlıklar

###### 3.2.1.1. Stok solüsyonların hazırlanması

Olgun tohumların *in vitro* ortamda çoğaltılması ve *in vitro* aksenik materyallerden kallus ve süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasında kullanılan MS (Murashige ve Skoog, 1962) besi ortamının stok solüsyonlar aracılığı ile hazırlanması ve kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin tip ve miktarlarına ait çizelgeler aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.1., 3.2. ve 3.3.).

Çizelge 3.1. MS Besi ortamının hazırlanmasında kullanılan stok solüsyonlar\* (g/l)

Stok solüsyonlar	Konsantrasyon (g/L)
<b>Makro Elementler Ana Solüsyonu</b>	
Amonyum nitrat (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	16.5 g
Potasyum nitrat (KNO <sub>3</sub> )	19.0 g
Kalsiyum klorür (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	4.4 g
Magnezyum sülfat (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	3.7 g
Potasyum dihidrojen fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.7 g
Distile Su	1000 cc.'ye tamamlanır

<b>Mikro Elementler-1 Ana Solüsyonu</b>	
Borik asit ( $H_3BO_3$ )	62
Mangan sülfat ( $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ )	223
Sodyum molibdat ( $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ )	2.5
Çinko sülfat ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ )	86
Potasyum iyodür (KI)	8.3
Borik asit ( $H_3BO_3$ )	62
Distile su	1000 cc.'ye tamamlanır
<b>Mikro Elementler-2 Ana Solüsyonu</b>	
Kobalt klorür ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ )	0.25
Bakır sülfat ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ )	0.25
Distile su	1000 cc.'ye tamamlanır
<b>Kompleks Kelatör Ana Solüsyonu</b>	
Demir sülfat ( $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$ )	2.78
Sodyum EDTA ( $Na_2EDTA$ )	3.72
Distile su	1000 cc.'ye tamamlanır
<b>Vitamin Karışımı</b>	
Nikotirik Asit	5
Glisin	20
Piridoksin HCl	5
Distile su	1000 cc.'ye tamamlanır
<b>B1 Vitamini Ana Solüsyonu</b>	
Tiamin HCl	0.1
Distile su	1000 cc.'ye tamamlanır
<b>Myo-inositol</b>	
Myo-inositol	10
Distile su	1000 cc.'ye tamamlanır

Çizelge 3.2. 1 Litre Standart Murashige ve Skoog Besi Ortam İçeriği\* (g/l)

<b>Besi Ortamı İçeriği</b>	<b>Miktarı</b>
MS ana solüsyonu	100 cc
MS mikroelementler-1	10 cc
MS mikroelementler-2	1 cc
Kompleks kelatör	10 cc
Vitamin karışımı	1 cc
B <sub>1</sub> vitamini ana solüsyonu	1 cc
Agar	5.5 g
Sakkaroz	30 g
Distile su	1000 cc.'ye tamamlanır.

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

**Çizelge 3.3.** Besi ortamlarına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicisi tip ve çeşitleri.

<b>BAP (6-Benzylaminopürin) Ana Solüsyonu</b>	
<b>BAP</b>	<b>100 mg</b>
<b>1N NaOH</b>	<b>2-3 ml</b>
<b>Steril saf su</b>	<b>100 ml'ye tamamlanır.</b>
<b>KIN (Kinetin) Ana Solüsyonu</b>	
<b>Kin</b>	<b>100 mg</b>
<b>Steril saf su</b>	<b>100 ml</b>
<b>2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetik asit) Ana Solüsyonu</b>	
<b>2,4 D</b>	<b>100 mg</b>
<b>Steril saf su</b>	<b>100 ml</b>
<b>IBA (Indol Bütirik Asit) Ana Solüsyonu</b>	
<b>IBA</b>	<b>100 mg</b>
<b>%95'lik Etil Alkol</b>	<b>3-5 ml</b>
<b>Steril saf su</b>	<b>100 ml</b>

### 3.2.1.2. Sterilizasyon işlemleri

#### 3.2.1.2.1. Cam malzemelerin sterilizasyonu

Erlenler, cam pipetler ve diğer cam malzemeler, ağızları alüminyum folyo ile paketlenerek bir sıcak hava fırınında (etüv) 3 saat süre ile 180 °C'de sterilize edilmiştir.

#### 3.2.1.2.2. Kültür kaplarının sterilizasyonu

Magenta GA7 kültür kapları otoklava dayanıklı poşetler içine konulduktan ve ağızları kapatılıp, otoklav bandı ile yapıştırıldıktan sonra, 105kPa basınç altında, 121°C'de 20 dk boyunca sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur.

#### 3.2.1.2.3. Pens ve bistürilerin sterilizasyonu

Pens ve bistürilerin sterilizasyonu için ise kültür öncesi %70'lik teknik alkol ile silinen pensler ile bıçakları yeni değiştirilmiş bistüriler, ya çift katlı bir alüminyum folyo ile sarılarak, 200 °C'deki bir fırın içerisinde 45 dk. boyunca; ya da 250 °C'ye kadar ısıtılmış bir cam boncuklu sterilizatör içerisinde 15-20 sn boyunca bekletmek suretiyle sterilize edilmişlerdir.

#### 3.2.1.2.4. Transfer odasının hazırlanması ve sterilizasyonu

Steril çalışma alanında kullanılan yüzeyler (steril kabin içi) kullanımdan en az 10-15 dakika önce %10'luk Benzalkonyum Klorür içeren ticari Zefiran antiseptik

çözeltisi ve sonrasında %70'lik etilalkol ile silinmiş, akabinde kabin içinde bulunan UV lambası 30 dk boyunca açılmak suretiyle sterilize edilmiştir. Transfer odasında bulunan UV lamba açılmadan en az yarım saat önce bençler teknik alkol ile, zemin ise ticari çamaşır suyu ile silinerek, oda kültüre hazır hale getirilmiştir.

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

Kültürler genellikle 25±2 0Cde 40 mM m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> yoğunluklu 16/24 s fotoperiyot altında büyümeye bırakıldı. Işık kaynağı olarak 3500 lüks ışık şiddetine sahip floresan lambalar (400W MBFR/U, Thorn) kullanıldı. Tüm eksplantlar için 50 ml sıvı besi yeri içeren 250 ml'lik erlenler kültür kapları olarak kullanıldı. Kültüre alınan süspansiyonları içeren erlenmayerler genellikle 100 rpm'e ayarlanmış çalkalayıcılar üzerinde 28 gün boyunca kültüre alınmıştır.

## **3.2.2. Hücre Süspansiyon Kültürü Çalışmaları**

### **3.2.2.1. Tohumların yüzey sterilizasyonu ve çimlendirilme çalışmaları**

Etkili bir yüzey sterilizasyon yöntemi *in vitro* klonal çoğaltım için geliştirilecek olan mikroçoğaltım protokolünün ilk ve en önemli aşamasıdır. Tez kapsamında eksplant kaynağı olarak *in vitro* şartlarda çimlendirilmiş juvenil sakız tohumlarının sterilizasyonu için (Yıldırım, 2012; Onay ve ark., 2014; Kılınç, 2013; Kılınç ve ark., 2015; Onay ve ark., 2016b) çalışmalarında geliştirilen, başarılı yüzey sterilizasyon protokolleri modifiye edilerek kullanıldı.

#### **3.2.2.1.1. Tohumların yüzey sterilizasyonu**

Yüzey sterilizasyonu öncesi mezokarplarından arındırılan *P. lentiscus* L. tohumları dış kabukları kırıldıktan sonra, yukarıda ifade edilen çalışmalar kapsamında geliştirilen sterilizasyon metodu kullanılarak sterilize edildi. Bu metoda göre; tohumlar %20'lik Sodyum Hipoklorit (NaOCl) Ticari ACE ile 20 dakika boyunca çalkalandı. Ardından, tohumlar her seferinde 5 dakika olacak şekilde 5 defa steril distile su ile çalkalanarak sterilant kalıntılarından arındırıldı.

#### **3.2.2.1.2. Tohumların çimlendirilmesi ve aksenik kültürlerin 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, 1 mg/l BAP ve BBD içermeyen MS besi ortamlarına ayrı denemeler halinde aktarıldı. Tohumların besi ortamlarına aktarılmalarının ardından 4 hafta boyunca 25±2 °C 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyodu bulunan bitki büyütme odasında gelişimleri izlendi. 28 günlük kültür periyodu sonrası çimlenen tohumlara ait çimlenme yüzdesi, gövde/eksplant oranı, ortalama gövde uzunluğu, kök/eksplant oranı ile ortalama kök uzunluklarına ait veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

### **3.2.2.2. Juvenil sürgünlere ait stok kültürlerin elde edilmesi ve proliferasyon çalışmaları**

4 haftalık kültür periyodu sonrasında 1 mg/l IBA destekli MS besi ortamında çimlenen bitkiciklerden alınan eksplantlar (gövde ucu ve nodal tomurcuklar), yine Kılınç vd., (2015)'te başarılı sürgün çoğaltımının gerçekleştiği rapor edilen 1 mg/l BAP ve 0.5 mg/l GA3 destekli MS besi ortamına aktarıldı ve gelişen sürgünler 4 haftalık kültür periyotları halinde sürekli alt kültürlenerek proliferasyonla elde edilerek stok kültürler elde edildi.

### **3.2.2.3. Kallus kültürlerinin başlatılması çalışmaları**

Süspansiyon kültürlerinin başlatılmasında kullanılacak kallus hatları, tohumların çimlendirilmesi yoluyla oluşturulan sürgünlere ait yaprak ve kök kısımlarından, elde edilmiştir. Kallus kültürlerinin başlatılması çalışmalarında yalnızca farklı bitki büyüme düzenleyicileri uygulamalarının etkisi test edilmiştir. Bu bağlamda genellikle literatür bilgileri ışığında birçok bitki türünde kallus oluşumuna neden olan iki farklı sitokininin (BAP, Kin) ve bir oksinin (2,4 D) farklı kombinasyonlarının (0.5, 1.0 mg/l) etkileri araştırılmıştır.

#### **3.2.2.3.1. Farklı bitki büyüme düzenleyicileri uygulamalarının kallus kültürlerinin başlatılmasına etkisi**

Kallus kültürlerinin başlatılması için 28 günlük bitkiciklere ait aksenik juvenil yapraklar ve tohumların çimlendirilmesi ile elde edilen aksenik kökler eksplant kaynağı olarak kullanıldı. Juvenil hatlara ait yapraklar ile çimlenen tohumlardan izole edilen kök eksplantları, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonları ile desteklenmiş MS besi ortamlarında kültüre alındı. Kallus kültürlerinin başlatılmasında juvenil yapraklar anaç bitkiden steril pens ve bisturiler kullanılarak izole edilerek, steril kurutma kağıtları üzerinde, üzerlerindeki suyun uzaklaştırılması için bekletildikten sonra, kallus

oluşturmak için bütün yaprak ayaları yaralanarak MS besi ortamında kültüre alındı. En iyi kallus oluşumunu sağlayacak olan ortamı belirlemek amacıyla kallus oluşturulmasına BBD'lerin etkisi çalışıldı. Kallus dokularını elde etmek amacıyla, çimlenme sonucu gelişen kökler ile sürgünlerin proliferasyonundan elde edilen yapraklar, farklı sitokin (BAP ve KIN; 0.5 ve 1 mg/l) ve oksin (2,4-D; 0.5 ve 1 mg/l) kombinasyonlarını içeren MS besi ortamına aktarılarak, kallus oluşumu için 4 hafta süreyle  $25\pm 2$  °C, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyodu bulunan bitki büyütme odasında kallus oluşumuna bırakıldı.

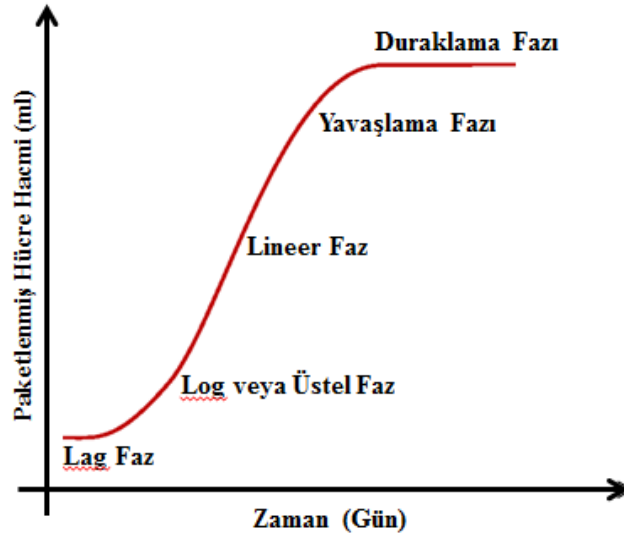
### 3.2.3. Süspansiyon kültürü çalışmaları

Hücre süspansiyon kültürü, bir bitkiden hücrelerin izole edilmesi ve daha sonra bu hücrelerin yapay bir sıvı besi ortamında aksenik olarak üretilmesini ve homojen olarak çoğaltılması şeklinde tanımlanır (Nuñez-Palenius ve ark., 2005). Süspansiyon kültürleri yaprak, kök, embriyo gibi farklılaşmış dokulardan mekanik yöntemlerle elde edildiği gibi, dağılgan yapıda yumuşak ya da kırılğan bir kallus parçasının, çalkalayıcı üzerine yerleştirilen bir erlenmayer şişesi içerisinde bir sıvı ortama aktararak da başlatılabilir. Süspansiyon kültürlerinin optimizasyonu kullanılan bitki türüne, kullanılan eksplant tipine, hücrelerin buldukları ortama ait çevresel ve kimyasal faktörlerin iyileştirilmesine bağlıdır. Süspansiyon kültürleri genellikle 20-100 hücreden oluşan hücre agregatlarından başlatılmaktadır. Süspansiyon kültürlerinde hücreler genellikle oda sıcaklığında, 50-200 rpm'ye ayarlanan bir çalkalayıcı üzerinde kültüre alınmakta ve periyodik alt kültürlemeler yoluyla da çoğaltılır. Özellikle sekonder metabolitlerin üretilmesinde önemli rol oynayan süspansiyon kültürlerinde büyük ölçekli üretimler için biyoreaktörler, fermentörler ve tanklar da kullanılmaktadır. Hücrelerin büyüme oranı bakımından, katı ve yarı-katı kültür ortamlarına oranla genellikle daha yüksek sonuçlar elde edilir. Değerli bir sekonder metabolitin üretilmesi sürecinde, hücre süspansiyon kültürlerinde üretim daha güvenilir, daha basit ve daha öngörülebilirdir. Bitki hücre kültürlerinde büyüme-süre grafiği, sigmoidal bir eğri oluşturur (Şekil 3. 2.). Kültür büyümesi esas alındığında hücre gelişiminin sigmoidal davranışı beş tane karakteristik büyüme fazından oluşur:

- 1- **Lag Faz:** Bitki hücrelerinin bölünmeye başlamadan önceki hazırlık aşaması
- 2- **Log veya üstel Faz:** Hızlı hücre bölünmesinden ötürü hücre sayısında üstel artış
- 3- **Lineer Faz:** Kültürlerin yaş ve kuru ağırlıklarının arttığı hücre nüfusunda doğrusal artış

**4- Yavaşlama Fazı:** Besin unsurlarının azalması ve hücre kalıntı birikiminden dolayı hücre bölünme hızında aşamalı yavaşlama,

**5- Duraklama Fazı:** Hücre bölünmesinin durması (Güven ve Gürsul 2014).



Şekil 3.2. Süspansiyon kültürlerinde büyümenin farklı aşamalarını gösteren büyüme eğrisi.

### 3.2.2.1. Süspansiyon kültürlerinin başlatılması

Aksenik kallus kültürlerinden süspansiyon kültürlerinin başlatılması aşamasında ise *in vitro* ortamda, iyi süspansiyon vereceği beklenen kolay parçalanan-sarımsı renk özelliklerine sahip kök ve yaprak orjinli ve yaş ağırlıkları yaklaşık 0.5 g olan kallus parçaları, 250 ml lik erlenlere en iyi kallus gelişim ortamı olarak belirlenen 1 mg/l KIN ve 1 mg/l 2,4 D ile destekli agar içermeyen 50 ml MS besi ortamına aktarıldı. Kallusların, 4 hafta süreyle  $25 \pm 2$  °C de 16/8 saat ışık fotoperiyodu uygulanan ortamlarda, 100 rpm dönüş hızına sahip bir çalkalayıcı üzerinde süspansiyon olmaları sağlandı. 4 haftalık kültür süresi sonunda, süspansiyon edilen kallus hatları, sırasıyla 500µm, 250µm ve 100µm'lik porlara sahip metal süzgeçlerden geçirilerek, başarılı bir şekilde hücre süspansiyon kültürleri başlatıldı.

### 3.2.2.2. Süspansiyon kültürlerinin optimizasyonu

Her ne kadar yukarıda anlatıldığı şekliyle süspansiyon kültürleri başlatılmış olsa da, süspansiyon kültürlerinde bulunan hücrelerin gelişimleri birçok fiziksel ve çevresel faktörden etkilendiğinden dolayı (çalkalama hızı, sıcaklık, ışık, pH, karbon kaynağı, farklı bitki büyüme düzenleyicileri vb.), kültür ortamını oluşturan bu faktörlerin de

optimize edilmesi gereklidir. Aynı zamanda sağlıklı bir hücre büyümesi, süspansiyon kültürü yoluyla üretilecek olan sekonder metabolit miktar ve kalitesini de olumlu yönde etkileyeceğinden dolayı, hücre kültürlerinde optimizasyon çalışmalarının yapılması son derece önem arz etmektedir. Çalışmamızda hücre süspansiyon kültürlerinin optimizasyonu çalışmalarında gerçekleştirilen uygulamalar aşağıda sırasıyla alt başlıklar halinde sunulmuştur.

### **3.2.2.2.1. Farklı şeker tiplerinin etkisi**

Hücre kültürlerinin optimizasyonu çalışmalarında, hücrelerin gelişimlerine farklı karbon kaynaklarının (Glikoz ve Sukroz) ve bunların farklı konsantrasyonlarının (15, 30 ve 50 mg/l) etkileri test edildi. Bu amaçla yukarıda belirtilen kültür şartlarında kültüre alınan ve ortalama 28 günlük kültür periyodu sonrasında gelişen süspansiyon halindeki hücrelere ait paketlenmiş hücre hacmi, taze ve kuru ağırlık değerleri kaydedilmiş ve elde edilen veriler istatistiğe tabi tutulmuştur.

### **3.2.2.2.2. Farklı ışık yoğunluklarının (karanlık ve aydınlık) etkisi**

Optimizasyon çalışmalarında, süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerine farklı ışık yoğunluklarının etkisinin test edildiği bu çalışmada, görece iyi süspanse olan kallus hatları, yukarıda detayları verilen 250 ml'lik erlenlerde bulunan 50 ml'lik taze sıvı besi ortamına, yine 50 ml stok süspansiyon kültürlerinden ilave ederek inoküle edilmiş, sonrasında en iyi sonucun alındığı 100 rpm çalkalama hızında, farklı ışık yoğunluğu oluşturulmuş büyüme ortamlarında (karanlık ve aydınlık) 4 hafta boyunca inkübe edilmiş, bu süre sonunda gelişen süspansiyonlara ait PHH taze ve kuru ağırlık değerlerine ilişkin veriler istatistiğe tabi tutulmuştur.

### **3.2.2.2.3. Farklı çalkalama hızlarının etkisi**

Süspansiyon kültür ortamının optimizasyonu çalışmalarının bu aşamasında, süspanse edilmiş hücrelerin gelişimlerini arttırmak amacıyla, farklı çalkalama hızlarının etkileri araştırılmıştır. Sıvı MS besi ortamına 1.0 mg/l Kin ve 1.0 mg/l 2,4-D ilave edilip, ortam pH'sı 5.8 olacak şekilde ayarlanan ve 250 ml'lik erlenler içerisine bırakılan süspansiyon kültürlerinin; 90, 95, 100 (kontrol) ve 110 rpm'e ayarlanmış olan çalkalayıcılar üzerinde gelişimleri test edildi. Kültür gelişimlerinin karşılaştırılması amacıyla, 4 haftalık inkübasyon süresi sonunda gelişen süspansiyonlara ait PHH, taze ve kuru ağırlıklar belirlenmiş ve elde edilen veriler istatistiksel analize tabi tutulmuştur.

Ayrıca kültüre alınan gruplar süzülerek (Whatmann No:1) +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

#### **3.2.2.2.4. Farklı BBD kombinasyonlarının etkisi**

Sakız bitkisine ait juvenil kök ve yaprak hatlarında 1mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4 D içeren MS besi yerleri kullanılarak daha önceden başlatılan süspansiyon kültürlerinin optimizasyonu çalışmalarında, ilk olarak farklı BBD kombinasyonlarının süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerine olan etkileri test edilmiştir. Bu amaçla süspansiyon kültürleri, kallus oluşturulması çalışmalarında hem kök hem de yaprak eksplantlarında en iyi kallus oluşumunu sağlayan BAP ve Kinetinin (1.0 ve 0.5 mg/L) 1 mg/L 2,4-D ile oluşturmuş olduğu kombinasyonlarını içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. 28 günlük kültür periyodu sonrasında gelişen süspansiyon hücrelerine ait PHH, kuru ve yaş ağırlık değerleri kaydedilmiş, hücrelerin gelişimleri üzerine en iyi BBD kombinasyonu belirlenmiştir.

#### **3.2.2.2.5. Farklı pH uygulamalarının etkisi**

Süspansiyon kültürlerinde bitki hücrelerinin gelişimleri üzerine daha asidik ya da daha alkali ortam seviyelerinin etkilerinin belirlenmesi amacıyla, farklı pH derecelenmelerine (sırasıyla pH 4.5, 5.0, 5.8, 6.5 ve 7.0) tabi tutulan hücre süspansiyonlarının ortalama 4 haftalık bir kültür periyodu sonrasında, yine PHH, kuru ve yaş ağırlık değerleri kaydedilmiş ve hücrelerin gelişimleri üzerine en iyi pH düzeyi belirlenmiştir.

#### **3.2.2.2.6. Farklı sıcaklık uygulamalarının etkisi**

Kök ve yaprak hatlarına ait kalluslarından elde edilen süspansiyon kültürleri farklı sıcaklık değerlerine ayarlanmış büyüme ortamlarında (4, 25 ve 37 °C), 1.0 mg/l Kin ve 1.0 mg/l 2,4-D içeren sıvı MS besi ortamlarında 100 rpm'e ayarlı bir çalkalayıcı üzerinde kültüre alındı. 4 haftalık bir kültür periyodu sonrasında kültür gelişimine ait gözlemler alınarak, PHH, taze ve kuru ağırlık değerlerine ait sonuçlar istatistiksel analize tabi tutulmuştur.

### 3.2.2.3. Süspansiyon kültürlerinde taze ve kuru ağırlıkların hesaplanması ve büyüme parametreleri

Yine Bölüm 3.2.2 başlığı altında da değinildiği şekliyle, kök ve yaprak kallus hatlarından süspansiyon elde edilmesine yönelik optimizasyon çalışmaları kapsamında da, yukarıda sıralanan tüm deneylerde kök ve yaprak eksplantlarından elde edilen süspansiyonların PHH, yaş ve kuru ağırlıklarına ait sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek hesaplanmıştır.

Aynı şekilde süspansiyon kültürü optimizasyon çalışmalarının sonlandırılmasından itibaren süspansiyon kültürlerine ait taze ve kuru ağırlıklar ile PHH değerleri yine g cinsinden ölçülerek morfolojik gözlemler ile birlikte rapor edilmiştir.

#### 3.2.2.3.1. Taze ağırlık tayini

Süspansiyon kültürü hücrelerinin bulunduğu sıvı ortamdan 10 mL alınarak, 22 µm por çapındaki Millipor filtrelerden süzüldü ve hücrelerle sıvı ortamın birbirinden ayrılması sağlandı. Sıvı ortamın uzaklaştırılmasıyla elde edilen hücreler, hassas terazide tartılarak taze ağırlığı ölçüldü. Taze ağırlık ölçümünde aşağıdaki formül kullanıldı;

$$\text{Taze Ağırlık (g/L)} = \text{Taze Hücre Ağırlığı (g)} \times 1000 \text{ Örnek Hacmi (mL)}$$

#### 3.2.2.3.2. Kuru ağırlık tayini

Taze ağırlığı ölçülen hücreler, ısısı önceden 60 °C'ye ayarlanmış etüvde 16 saat bekletilerek kurutuldu. Kurutulmuş hücreler sabit bir ağırlık elde edilinceye kadar tartılarak ölçüm sonuçları kaydedildi. Kuru ağırlık hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı;

$$\text{Kuru Ağırlık (g/L)} = \text{Kuru Hücre Ağırlığı (g)} \times 1000 \text{ Örnek Hacmi (mL)}$$

#### 3.2.2.3.3. Paketlenmiş hücre hacmi tayini

Hücre süspansiyonlarının bulunduğu sıvı ortamdan 10 mL alınarak 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra 5 dakika süre ile 3000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpteki peletin hacmi PHH olarak hesaplandı.

$$\text{Paketlenmiş Hücre Hacmi (mL)} \text{ PHH (mL/L)} = \text{Paketlenmiş Hücre Hacmi (mL)} \times 1000 \text{ Örnek Hacmi (mL)}$$

### 3.2.2.1.3. Süspansiyon kültürlerinin büyüme parametreleri ve istatistiksel analiz

Hücre gelişimlerini takip etmek amacıyla kültürlerden 0., 4., 7., 14., 21. ve 28. günlerde olmak üzere toplam 6 kez örnek alınarak, kültürlerin PHH, taze ağırlık ve kuru ağırlık değerlerine ait veriler kaydedilmiştir. Bu veriler ışığında da büyüme eğrileri oluşturulmuştur. Verilerdeki değişkenliği hızlı bir şekilde görmek için bütün çalışma sonuçlarının tanımlayıcı analizleri SPSS 19.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Oransal veriler ise Ki kare ( $\chi^2$ ) testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

**Çimlenme (%):** Kültürlerin 14. gününe kadar enfekte olmayan ve kültüre alımdan 4 hafta sonra gövde ve kök oluşturan tohum sayısının denemede kullanılan tüm tohum sayısına olan oranı hesaplanarak, yüzde olarak ifade edildi.

**Gövde Başına Düşen Eksplant Sayısı;** Kültürlerin 14. gününe kadar enfekte olmayan, kültürden 4 hafta sonra kültürde çimlenip/rejenere olan ve her bir bitkiden gelişen gövdelerin kültürlerin toplam kültürdeki bitki sayısına oranı olarak ifade edildi.

**Eksplant Başına Düşen Kök Sayısı;** Kültürlerin 14. gününe kadar enfekte olmayan, kültürden 4 hafta sonra çimlenip/rejenere olan her bitkiden gelişen kök sayısının toplam kültürdeki bitki sayısına oranı olarak ifade edildi.

**Ortalama Gövde Uzunluğu;** Kültürlerin 14. gününe kadar enfekte olmayan, kültürden 4 hafta sonra çimlenip/rejenere olan her bir bitkiden gelişen gövde/gövdelerin uzunluğunun, kültürde çimlenip rejenere olan bitkilere oranı olarak ifade edildi.

**Ortalama Kök Uzunluğu;** Kültürlerin 14. gününe kadar enfekte olmayan, kültürden 4 hafta sonra çimlenip/rejenere olan her bir bitkiden gelişen köklerin uzunluğunun, kültürde çimlenip rejenere olan bitkilere oranı olarak ifade edildi. Bununla birlikte, juvenil ve olgun materyallerden elde edilen eksplantlardan elde edilecek olan kalluslar için;

**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 toplam, kallus oluşturan eksplantlara oranı olarak ifade edildi.

**Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı;** Taze ağırlığı ölçülen kallusların, sıcaklığı önceden 60 °C'ye ayarlanmış etüvde 16 saat bekletilen kallusların ağırlıklarının toplam, kallus oluşturan eksplantlara oranı olarak ifade edildi. Ayrıca, tüm stok kültürlerin elde edilmesinde ve gerçekleştirilen tüm deneylerde, *in vitro* ortamda gelişen kültürlere ait morfolojik gözlemler de alınarak çizelgelerde sunuldu.

## 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu ve Kültür Başlatma Çalışmalarına ait Bulgular ve Tartışma

Etkili bir yüzey sterilizasyon yöntemi *in vitro* kültürlerin başlatılması ve devamlılığı için ilk ve en önemli aşamadır. Yüzey sterilizasyonu öncesi mezokarplarından arındırılan olgun *P. lentiscus* L. tohumları, dış kabukları kırıldıktan sonra Kılınç vd., 2015 tarafından geliştirilen sterilizasyon metodu modifiye edilerek sterilize edildi. Bu metoda göre; tohumlar %20'lik Sodyum Hipoklorit (NaOCl) Ticari ACE ile 20 dakika boyunca çalkalandı. Ardından, 5 dakika olacak şekilde 5 defa steril distile su ile çalkalanarak sterilant kalıntılarında arındırıldı. Uygun yüzey sterilizasyonunu takiben kontrol grubu ile birlikte 1 mg/l IBA destekli MS besi ortamına ekilmek suretiyle tohumların çimlendirilmesi sağlandı. *P.lentiscus* L. tohumlarının çimlenme çalışmalarına ait veriler **Çizelge 4.1.**' de sunulmuştur.

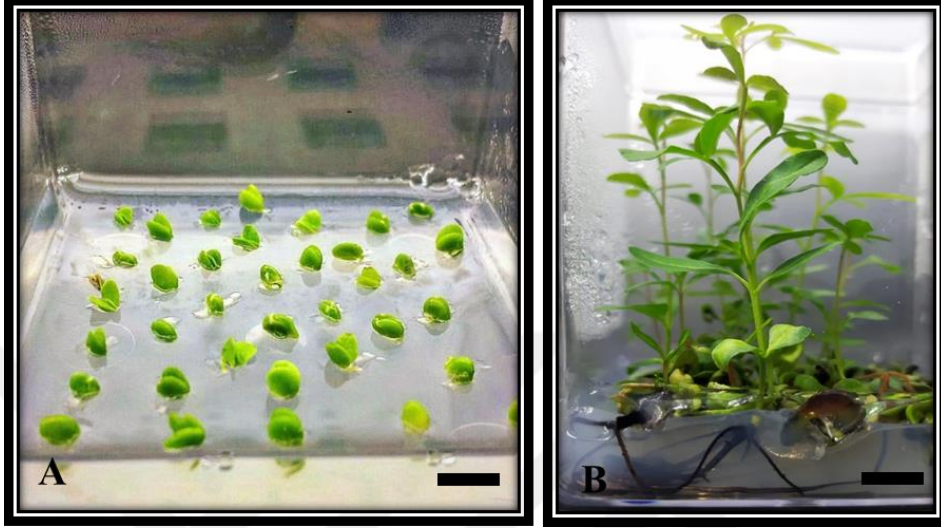
**Çizelge 4. 1.** *P. lentiscus* L. Tohumlarının BBD içermeyen ve BBD içeren MS Besi Ortamında Çimlendirilmesi.

Bitki Büyüme Düzenleyicisi (BBD) Tipi	Çimlenme (%)	Gövde/Eksplant	Ortalama		Ortalama Kök Uzunluğu (cm)
			Gövde Uzunluğu (cm)	Kök/Eksplant	
<b>Kontrol</b>	45.00±5.00 b	0.45±0.05 b	1.25±0.15 b	2.75±0.15 b	2.90±0.25 a
<b>BAP (1 mg/l)</b>	55.00±5.00 b	0.55±0.05 b	1.30±0.10 a	3.75±0.45 a	2.50±0.05 b
<b>IBA (1 mg/l)</b>	75.00±5.00 a	0.75±0.04 a	1.45±0.05a	3.50±0.25 a	3.25±0.15 a

\*Çalışmada her bir denemede 100 tohum kullanıldı ve 3 defa tekrar edildi.

Kültür süresince alınan gözlemler irdelendiğinde, hem BBD içeren MS besi ortamına bırakılan tohumların hem de kontrol grubuna bırakılan tohumların bir hafta içinde çimlenmeye başladığı gözlemlendi. Kontrol grubu, 1 mg/l BAP ve 1 mg/l IBA destekli MS besi ortamında çimlenmeye bırakılan tohumların çimlenme oranlarının sırasıyla %45, %55 ve %75 olduğu tespit edildi. 4 haftalık kültür süresi sonunda çimlenen tohumların en az 3-4 çift yaprak ile genellikle baskın bir şekilde tek gövde oluşturduğu görüldü. Çimlenen tohumların, kök oluşturma durumlarına bakıldığında, kontrol grubu ile BAP ve IBA destekli MS besi ortamında sırasıyla gövde başına ortalama 2.75, 3.75, 3.50 kök sayısı ve 2.90, 2.50 ve 3.25 cm kök uzunluğu elde edildi. 1 mg/l IBA destekli MS besi ortamında, test edilen diğer gruplara oranla çimlenen

tohum yüzdesi, gövde ve kök uzunluğu bakımından daha iyi sonuçlar elde edildi. Kültüre alındıktan 48 saat sonra kotiledonların su alarak şiştiği ve birbirinden ayrıldığı, çoğu tohumlarda radikulanın gözle görülebilir şekilde farklılaştığı gözlemlendi (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 (A), 28 günlük kültür periyodu sonunda çimlenen *P. lentiscus* L. tohumları, Bar : 1 cm. (B)

Çimlenen tohumlardan elde edilen aksenik apikal ve nodal sürgünlerin proliferasyonu ise 100 mg/l Valin, 1 mg/l BAP ve 0.5 mg/l GA3 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 besiyerinde çoğaltılarak stok kültürlerin muhafazası sağlandı (Şekil 4.2.).



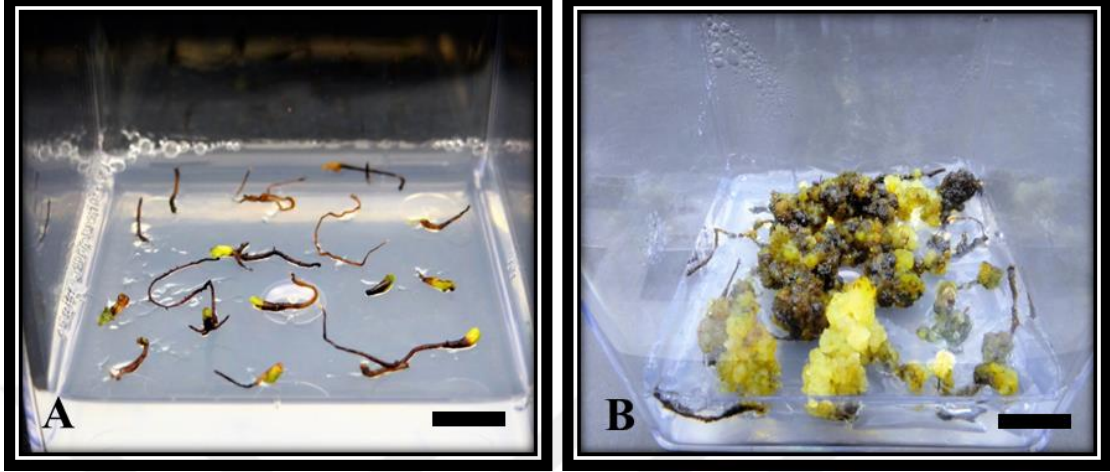
Şekil 4.2. Sakız tohumlarının çimlendirilmesi sonrası alınan eksplantların 1 mg/l BAP ve 0.5 mg/l destekli MS besi ortamında 4 haftalık kültür süresi sonundaki durumu.

Olgun ve siyah renkli tohumlar kullanılmadığı sürece, sakız ağacı tohumlarının arazi şartlarındaki çimlenme oranının oldukça zayıf olduğu, ekimden elli gün sonra tohumların yaklaşık %30'unun çimlendiği gözlemlendiği, çimlenme oranının; meyvelerin rengi, tohum canlılığı ve olgunluğu ile ilişkili olduğu, siyah tohumların genellikle sağlam bir endosperma ve embriyo bulundurduğu; buna karşın kırmızı tohumların cansız ve içi boş olduğu rapor edilmiştir (Verdu ve Garcia-Fayos, 2002). Ayrıca mekanik çıtlatmanın ya da ön soğuklama işlemlerinin sakız ağacı tohumlarının çimlenme oranına etki etmediği ile ilgili literatür bilgisi de mevcuttur (Piotto, 1995). Buna karşın olgun sakız tohumlarının 1000 ppm gibberellik asit ile ön uygulama yapıldığında yüksek bir çimlenme oranı (%87.99) gösterdiği (İsfendiyaroğlu ve Özeker, 2001) ancak doğada; sakız ağacı popülasyonunda çimlenen tohum oranı %0 ile %56 arasında olduğu (Mulas ve ark., 1998) bildirilmiştir. Sakız tohumunun çimlenmesi ve in vitro kültürlerin başlatılmasında, ağaçlardan alınan tohumlarda bulunan bakteri ve virüs gibi bulaşıkların arındırılması karşılaşılan en ciddi zorluklardır. Sakız ağacı tohumlarının in vitro çimlendirilmesi (Mascarello ve ark., 2007; Mulas ve ark., 1998; Grundwag, 1976) ve sakız fide eksplantlarından steril kültürlerin başlatılmasında (Fascella ve ark., 2004; Ruffoni vd., 2004; Mascarello vd., 2007 ) benzer zorluklar olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda ise sakız ağacı tohumlarının %20 NaOCl konsantrasyonunda 20 dk'lık çalkalama işlemi ile sırasıyla %66 ve %86 oranında aksenik olarak çimlendiği (Yıldırım, 2012, Kılınç ve ark, 2015) rapor edilmiştir. Çalışmamızda ise, Yıldırım (2012) ile Kılınç ve ark. 2015'in yaptığı çalışmalar tekrarlanarak, 1 mg/l IBA uygulaması ve ekstra olarak 1 mg/l BAP uygulamasının tohumların aksenik çimlendirilmesine olan etkisi, bir kontrol grubu ile test edildi. Çalışmamızda elde ettiğimiz %75'lik çimlenme oranının hem Yıldırım (2012) hem de Kılınç ve ark. (2015)'in rapor ettiği gibi 1 mg/l IBA içeren MS besiyerinden elde edilmesi, bahse konu çalışmalar ile çalışmamızın arasında paralellik olduğunu ortaya koymuştur.

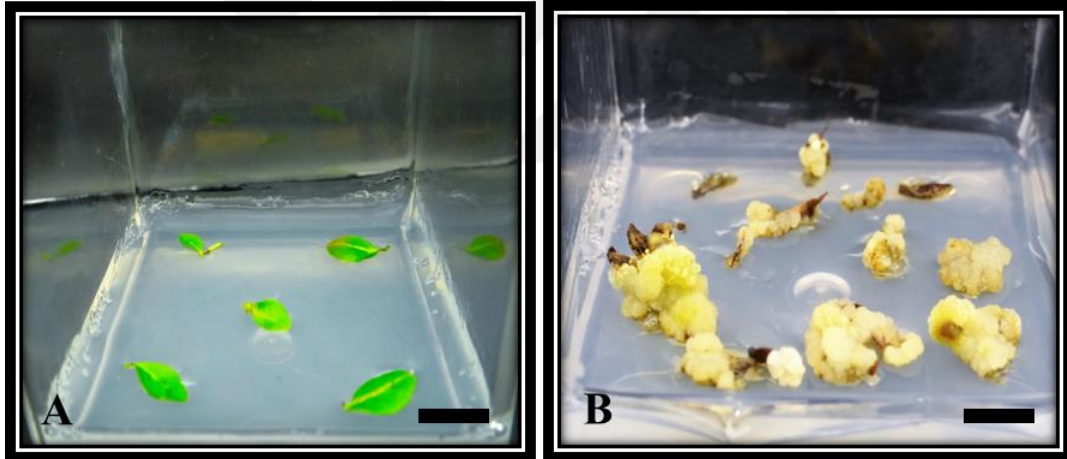
#### **4.2. Kallus Kültürlerinin Başlatılması, Çoğaltılması ve Muhafazası Çalışmalarına ait Bulgular ve Tartışma**

Süspansiyon kültürlerinin başlatılmasında kullanılacak olan kallus dokularını elde etmek amacıyla, çimlenme sonucu gelişen kökler ile sürgünlerin proliferasyonundan elde edilen yapraklar, farklı sitokinin (BAP ve KIN; 0.5 ve 1 mg/l)

ile oksin (2,4-D; 0.5 ve 1 mg/l) kombinasyonlarını içeren MS besi ortamına aktarılarak, 4 hafta süreyle  $25\pm 2$  °C 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyodu bulunan bitki büyütme odasına bırakıldı. Kök ve yaprak orijinli kallus başlatma çalışmalarına ait sonuçlar **Şekil 4.3.A,B** ve **Şekil 4.4. A,B**'de verilmiştir.



**Şekil 4.3.** (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.



**Şekil 4.4.** (A) 1 mg/l Kin 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.

Juvenil yaprak (**Çizelge 4.2.**) ve kök (**Çizelge 4.3.**) eksplantlarından kallus oluşturulmasına yönelik yapılan optimizasyon çalışmalarında, 0.5-1 mg/l BAP' ın 0.5-1mg/l 2,4-D ile olan kombinasyonları ile elde edilen sonuçlar irdelendiğinde, denenen parametreler arasında en yüksek kallus yüzdesi hem kök (%80) hem de yaprak (%84) eksplantları için 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D ile destekli MS besi ortamından elde edildi. Ortalama maksimum yaş ağırlık bakımından yaprak eksplantları 1 mg/l BAP ve 1 mg/l 2,4-D kombinasyonundan ( $520\pm 5,36$  mg), kök eksplantları ise 0.5 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D kombinasyonundan ( $25\pm 0,40$  mg) elde edildi. Bununla birlikte, yaprak eksplantlarında 1 mg/l BAP'ın 0.5 mg/l 2,4-D ile kombinasyonu ile desteklenen MS

besi ortamlarında hiç kallus gelişimi gözlenmedi. Her iki eksplant tipi için de; çalışılan BBD kombinasyonlarının taze ve kuru ağırlıkları arasında genellikle bir korelasyon gözlemlendi. Özellikle çalışılan bütün kombinasyonlarda kuru ağırlığın taze ağırlığın ortalama %10'u civarında olduğu belirlendi (Çizelge 4.2., 4.3.). Bu kapsamda çalışılan tüm parametreler içinde yaprak eksplantları için en yüksek kuru ağırlık  $51.68 \pm 0.32$  mg ile 1 mg/l BAP ile 1 mg/l 2,4-D kombinasyonundan elde edilirken, kök eksplantları için en yüksek kuru ağırlık ise  $2.46 \pm 0.03$  mg ile 0.5 mg/l Kin ile 1 mg/l 2,4-D kombinasyonundan elde edildi. Ayrıca, her iki eksplant tipi için de denenen tüm hormon kombinasyonlarından genel olarak yeşil, beyaz ve sarı renkte, granüler, sert veya yumuşak yapıda olmak üzere farklı kallus tiplerinin oluştuğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2., 4.3. ve Şekil 4.5.).

**Çizelge 4.2.** Yaprak eksplantlarından kallus oluşumuna, farklı sitokin (BAP ve KIN; 0.5 ve 1 mg/l) ile oksin (2,4-D; 0.5 ve 1 mg/l) kombinasyonlarının etkisi.

BBD Kombinasyonu (mg/l)	Kallus (%)	Yaş Ağırlık (mg)	Kuru Ağırlık (mg)	Kallus Morfolojisi
<b>0.5 BAP 0.5 2,4-D</b>	24.00	210±3.89 e	20.73±0.31e	Yeşil, Sert
<b>0.5 BAP 1 2,4-D</b>	60.00	510±4.62 a	50.51±0.25 b	Açık-yeşil, Yumuşak
<b>1 BAP 0.5 2,4-D</b>	-	-	-	Kallus Oluşumu Yok
<b>1 BAP 1 2,4-D</b>	60.00	520±5.36 a	51.68±0.32 a	Açık-yeşil, Granüler
<b>0.5 KIN 0.5 2,4-D</b>	8.00	490±4.61b	48.53±0.25 c	Beyaz, Sert
<b>0.5 KIN 1 2,4-D</b>	56.00	80±2.60 f	8.01±0.44 f	Açık-sarı, Yumuşak
<b>1 KIN 0.5 2,4-D</b>	72.00	480±2.08 c	48.13±0.35 c	Beyaz, Granüler
<b>1 KIN 1 2,4-D</b>	84.00	460±4.35 d	45.60±1.42 cd	Sarı, Yumuşak
$X^2(df;31)$	$p \leq 0.05$			

\*Her bir deneme için toplam 25 eksplant kullanıldı, ve deneyler 3 kez tekrar edildi.

**Çizelge 4.3.** Kök eksplantlarından kallus oluşumuna, farklı sitokin (BAP ve KIN; 0.5 ve 1 mg/l) ile oksin (2,4-D; 0.5 ve 1 mg/l) kombinasyonlarının etkisi.

BBD Kombinasyonu (mg/l)	Kallus (%)	Yaş Ağırlık (mg)	Kuru Ağırlık (mg)	Kallus Morfolojisi
<b>0.5 BAP 0.5 2,4-D</b>	48	12±0.48 d	1.21±0.04 d	Açık-sarı, Yumuşak
<b>0.5 BAP 1 2,4-D</b>	52	21±0.31 b	2.10±0.30 b	Beyaz-yeşil, Sert
<b>1 BAP 0.5 2,4-D</b>	20	18±0.46 c	1.80±0.45 bc	Açık-yeşil, Granüler
<b>1 BAP 1 2,4-D</b>	52	18±0.55 c	1.89±0.03 c	Açık-yeşil, Granüler
<b>0.5 KIN 0.5 2,4-D</b>	16	12±0.26 d	1.21±0.02 d	Açık-yeşil, Granüler
<b>0.5 KIN 1 2,4-D</b>	48	25±0.40 a	2.46±0.03 a	Açık sarı-beyaz, Yumuşak
<b>1 KIN 0.5 2,4-D</b>	60	12±0.21 d	1.20±0.02 d	Kirli-beyaz, Granüler
<b>1 KIN 1 2,4-D</b>	80	18±0.43 c	1.76±0.03 c	Koyu-sarı, Yumuşak
$X^2(df;31)$	$p \leq 0.05$			

\*Her bir deneme için toplam en az 25 eksplant kullanıldı ve deneyler 3 kez tekrar edildi.

Kallus kültürlerinin sürdürülebilirliğinde önem arzeden kallusların tekstürü göz önüne alındığında, kallus dokusunun sert bir yapıda oluşu, bir sonraki aşama olan

süspansiyon kültürlerinin başlatılması çalışmaları için bir dezavantaj teşkil etmiş ve beyaz/yeşil sert yapıdaki kalluslardan süspansiyon kültürleri başlatılamamıştır. Bunun yanısıra, her iki eksplant tipi için de maksimum kallus yüzdesinin elde edildiği 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D ile destekli MS besi ortamından, aynı zamanda sarı renkli, yumuşak ve dağılgan tekstüre sahip kalluslar elde edildiğinden, bir sonraki aşama olan süspansiyon kültürlerinin başlatılması için bu BBD kombinasyonunun kullanılmasına karar verildi.

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., 2009). 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). 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, çalışmamıza benzer şekilde 1 mg/L 2,4-D, 0,2 mg/L kinetin 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.

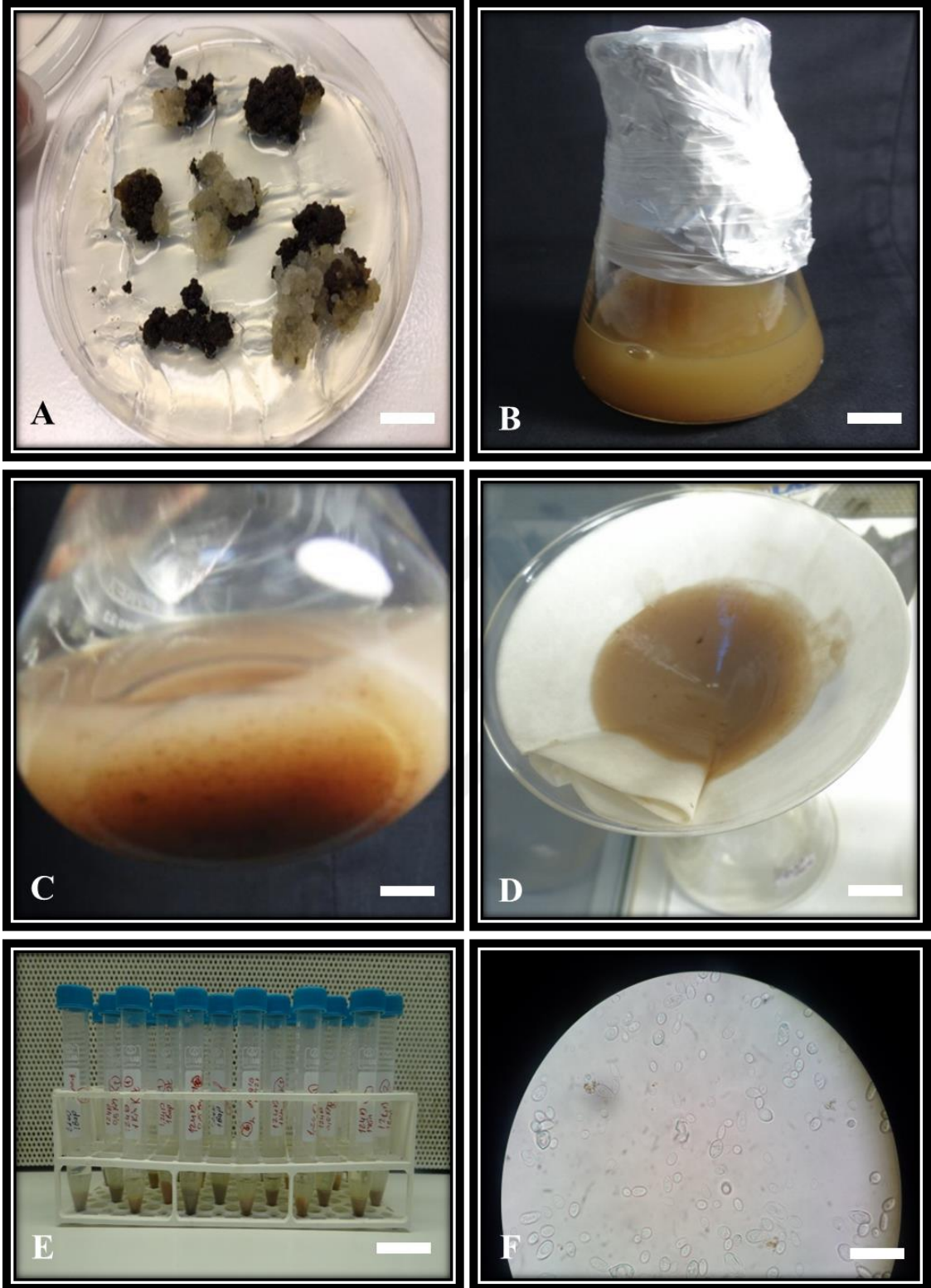
### 4.3. Süspansiyon Kültürlerinin Başlatılması, Çoğaltılması ve Optimizasyon

#### Çalışmalarına Ait Bulgular ve tartışma

Sakız (*P. lentiscus* L.) bitkisine ait aksenik juvenil kallus kültürlerinden süspansiyon kültürlerinin başlatılması aşamasında *in vitro* ortamda, kolay parçalanansarımsı renk özelliklerine sahip kök ve yaprak orjinli ve yağ ağırlıkları yaklaşık 0.5 g olan kallus parçaları, 250 ml lik erlenlere en iyi kallus gelişim ortamı olarak belirlenen 1 mg/l KIN ve 1 mg/l 2,4 D ile destekli agar içermeyen 50 ml MS besi ortamına aktarıldı. Kallusların, 4 hafta süreyle  $25\pm 2$  °C de 16/8 saat ışık fotoperiyodu uygulanan ortamlarda, 100 rpm dönüş hızına sahip bir çalkalayıcı üzerinde süspansiyon olmaları sağlandı. 4 haftalık kültür süresi sonunda, süspansiyon edilen kallus hatları, sırasıyla 500µm, 250µm ve 100µm'lik farklı por çaplarına sahip metal süzgeçlerden geçirilerek, hücre süspansiyon kültürleri başlatıldı. Şekil 4.5. ve 4.6.'da süspansiyon kültürlerinin başlatılmasına ait tüm aşamalar verilmiştir.



Şekil 4.5. Süspansiyon kültürlerinde gelişen kültürler (A). Kök eksplantlarından gelişen kültürler, Bar: 1.4 cm., (B). Yaprak eksplantlarından gelişen kültürler, Bar: 1.4 cm.



**Şekil 4.6.** *Pistacia lentiscus* L.'un süspansiyon kültürü: (A).Süspansiyon başlatılmasında kullanılan kallus tipleri. Bar: 1.1 cm., (B). Tamamen dağılmış süspansiyon kültürü, Bar: 1.7 cm., (C). Sıvı ortamda biriken hücre kütleleri, Bar: 1 cm., (D). Süspansiyon kültürlerinin süzülme aşaması, 1 cm., (E). Gelişim parametrelerinin alınması, Bar: 2.5 cm., (F). Kültürün 28. gününde süspansiyon olan hücreler, Bar: 300 µm.

Juvenil kök ve yaprak orjinli kallus kültürlerinden elde edilen süspansiyonların kültür koşullarının optimizasyon çalışmaları kapsamında bazı çevresel ve kimyasal

faktörlerin (BBD, ışık, sıcaklık, pH, çalkalama hızı, karbon kaynağı) etkileri araştırıldı. Yukarıda belirtilen faktörlerin uygulanması yoluyla elde edilen bulgular ve tartışma ayrı alt başlıklar halinde aşağıda sunuldu.

#### 4.3.1. Süspansiyon kültürlerinin gelişimine farklı BBD kombinasyonlarının etkisi

Sakız bitkisine ait juvenil kök ve yaprak hatlarında 1mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4 D içeren MS besi yerleri kullanılarak daha önceden başlatılan süspansiyon kültürlerinin optimizasyonu çalışmalarında, ilk olarak farklı BBD kombinasyonlarının süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerine olan etkileri test edilmiştir. Bu amaçla süspansiyon kültürleri, kallus oluşturulması çalışmalarında hem kök hem de yaprak eksplantlarında en iyi kallus oluşumunu sağlayan BAP ve KİN'in (1.0 ve 0.5 m/L) 1 mg/L 2,4-D ile oluşturmuş olduğu kombinasyonlarını içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. 4 haftalık kültür süresi sonunda kök kalluslarından başlatılan süspansiyon kültürlerinin gelişimleri gözlemlendiğinde, en yüksek PHH (36.66±3.33), taze (23.33±2.02) ve kuru ağırlık (7.00±0.60) değerlerinin 1 mg/L 2,4-D+1 mg/L BAP kullanılan ortamdan elde edildiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Kök süspansiyon kültürlerinin gelişimine farklı BBD kombinasyonlarının etkisi

BBD Kombinasyonları	Kök		
	PHH(ml/L)	Taze Ağırlık(g/L)	Kuru Ağırlık(g/L)
1 mg/L 2,4-D+1 mg/L BAP	36.66±3.33 a	23.33±2.02 a	7.00±0.60 a
1 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L BAP	30.00±0.00 b	19.00±3.46 bc	5.7±1.03 a
1 mg 2,4-D+1 mg/L KIN	30.66±0.66 a	16.00±4.50 c	4.80±1.35 a
1 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KIN	26.66±1.45 b	22.33±2.02 ab	6.70±0.60 a

\* Bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların istatistiksel olarak  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklı olduğunu gösterir. Her bir deneme 3 kez tekrar edilmiştir.

Yine yaprak kalluslarından oluşturulan süspansiyon kültürleri incelendiğinde en yüksek PHH (33.30±1.66), taze (28.33±3.17) ve kuru ağırlık (8.50±0.95) değerleri 1 mg/L 2,4-D+1 mg/L BAP kullanılan ortamdan elde edilmiştir. Bu sonuçlar *Pistacia lentiscus* L.'un süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerine test edilen BBD kombinasyonları içerisinde en etkili ortamının 1 mg/L 2,4-D+1 mg/L BAP olduğunu ortaya çıkarmıştır (Çizelge 4.5.).

**Çizelge 4.5.** Yaprak süspansiyon kültürlerinin gelişimine farklı BBD kombinasyonlarının etkisi

BBD Kombinasyonları	Yaprak		
	PHH(ml/L)	Taze	Kuru
		Ağırlık(g/L)	Ağırlık(g/L)
1 mg/L 2,4-D+1 mg/L BAP	33.30±1.66 a	28.33±3.17 a	8.50±0.95 a
1 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L BAP	31.00±1.00 a	27.00±1.73 a	8.10±0.51 a
1 mg/L 2,4-D+1 mg/L KIN	31.66±1.66 a	15.00±3.60 c	4.50±1.08 b
1 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KIN	30.00±0.00 a	20.66±1.85 b	6.20±0.56 ab

\*Bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların istatistiksel olarak  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklı olduğunu gösterir. Her bir deneme 3 kez tekrar edilmiştir.

Bilindiği üzere, bitki büyüme düzenleyicileri, üretilmek istenen metabolitlerin biyosentez mekanizmalarını aktive etmek amacıyla oldukça önem arz eder. Bazı fitohormonların, *Digitalis lanata* hücre süspansiyon kültürlerinde flavonoid üretimi üzerindeki etkisinin araştırıldığı iki hücre hattında, farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda fitohormonlar kullanılmış ve süspansiyon kültürleri 0.1 mg/L IAA ve 1 mg/L BA uygulaması ile optimize edildiği bildirilmiştir (Bota ve Deliu, 2012). Çalışmamıza paralel olarak, süspansiyon kültürlerinin başlatılması aşamasında türden türe değişimle birlikte genellikle farklı konsantrasyonlarda bir sitokin yanısıra, 2,4-D ile destekli besi ortamlarında başarılı sonuçlar elde edildiği rapor edilmiştir (Kermanee, 2004; Castellar ve ark., 2011; Nartop ve ark., 2015; Surmuş-Asan ve ark., 2017). Bununla birlikte literatürde yine bir sitokin olarak BAP ve Kin uygulamalarında sırasıyla *Papaver bracteatum* ve *Nigella sativa* bitkilerinde süspansiyon kültürlerinin başlatılması için olumlu sonuçlar verdiği çeşitli çalışmalar da mevcuttur. Günümüze değin yapılan literatür çalışmaları irdelendiğinde, süspansiyon kültürlerinin başlatılması aşamasında BBD'leri içerisinde genellikle farklı sitokin ve oksin tiplerinin kombinasyonlarından faydalandığı görülmektedir. (Farjaminezhad ve ark., 2013; Chaudhry ve ark., 2014).

#### 4.3.2. Farklı sıcaklık uygulamalarının etkisi

Süspansiyon kültürlerinin optimizasyonuna farklı sıcaklık uygulamalarının etkisi de ayrıca araştırılmıştır. Juvenil kök ve yaprak hatlarına ait süspansiyon kültürleri, sıcaklığın kültür gelişimi üzerine olan etkisini belirlemek amacıyla, +4, 25 ve 37 °C'ye ayarlanan ortamlardaki çalkalayıcılar üzerinde kültüre alınmış, kültürlere ait yaş ağırlık, kuru ağırlık ve PHH verileri istatistiksel olarak değerlendirilerek sonuçlar sırasıyla **Çizelge 4.6.** ve **Çizelge 4.7.**'de sunulmuştur. Farklı sıcaklıklarda (4, 25, 37 °C) kültüre

alınarak kültürden 28 gün sonra gelişen juvenil kök orjinli süspansiyon kültürlerinde en yüksek pHH ( $68.75 \pm 5.95$ ), taze ( $21.50 \pm 0.64$ ) ve kuru ağırlık ( $6.67 \pm 0.15$ ) değerleri 25 °C’de gelişen kültürlerden elde edilmiştir. Sırasıyla 4 ve 37°C’de gelişen kültürlerin daha düşük pHH ( $42.50 \pm 5.95$ ,  $56.25 \pm 6.25$ ), taze ( $15.25 \pm 1.03$ ,  $16.75 \pm 0.48$ ) ve kuru ağırlık ( $4.57 \pm 0.31$ ,  $5.02 \pm 0.14$ ) değerlerine sahip oldukları tespit edilmiştir (Çizelge 4.6.).

**Çizelge 4.6.** Kök Süspansiyon kültürlerinin optimizasyonuna farklı sıcaklık uygulamalarının etkisi

Sıcaklık	Kök		
	PHH(ml/L)	Taze	Kuru
		Ağırlık(g/L)	Ağırlık(g/L)
4 °C	42.50±5.95 b	15.25±1.03 b	4.57±0.31 c
25 °C	68.75±6.25 a	21.50±0.64 a	6.67±0.15 a
37 °C	56.25±6.25 b	16.75±0.48 b	5.02±0.14 b

\*Bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların istatistiksel olarak  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklı olduğunu gösterir. Her bir deneme 3 kez tekrar edilmiştir.

Aynı şekilde farklı sıcaklıklarda (4, 25, 37 °C) kültüre alınarak kültürden 28 gün sonra gelişen bu kez juvenil yaprak orjinli süspansiyon kültürlerinde ise en yüksek PHH ( $54.00 \pm 3.67$ ), taze ( $17.50 \pm 0.90$ ) ve kuru ağırlık ( $5.25 \pm 0.26$ ) değerleri yine benzer şekilde 25°C’de gelişen kültürlerden elde edilmiştir. Sırasıyla 4 ve 37°C’de gelişen kültürlerin daha düşük PHH ( $40.00 \pm 3.53$ ,  $45.00 \pm 4.56$ ), taze ( $13.75 \pm 0.75$ ,  $15.50 \pm 0.64$ ) ve kuru ağırlık ( $4.65 \pm 0.20$ ,  $4.12 \pm 0.23$ ) değerlerine sahip oldukları tespit edilmiştir (Çizelge 4.7.).

**Çizelge 4.7.** Yaprak Süspansiyon kültürlerinin optimizasyonuna farklı sıcaklık uygulamalarının etkisi.

Sıcaklık	Yaprak		
	PHH(ml/L)	Taze	Kuru
		Ağırlık(g/L)	Ağırlık(g/L)
4 °C	40.00±3.53 b	13.75±0.75 b	4.65±0.20 b
25 °C	54.00±3.67 a	17.50±0.90 a	5.25±0.26 a
37 °C	45.00±4.56 b	15.50±0.64 b	4.12±0.23 b

\* Bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların istatistiksel olarak  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklı olduğunu gösterir. Her bir deneme 3 kez tekrar edilmiştir.

Hem kök hem de yaprak süspansiyon hatlarının gelişimine farklı sıcaklık koşullarının etkisini test ettiğimiz deneye ait sonuçlar irdelendiğinde ise, büyük bir olasılıkla bitkinin doğal olarak yayılış gösterdiği ılıman iklim koşullarına adaptasyonunun bir sonucu olarak, bu koşullardan daha sıcak ve soğuk ortamlarda gelişiminin kısıtlandığı düşünülmüştür, zira düşük ve yüksek sıcaklıklara maruz bırakılan süspansiyon kültürlerinde PHH yaş ve kuru ağırlık değerleri kontrol ortamına

oranla benzer oranlarda düşüş göstermiştir. Yaptığımız literatür çalışmaları ışığında, hücre kültürlerinde sekonder metabolit üretimi çalışmalarında kullanılan bazı bitkilerde, büyümenin soğuk ortamda yavaşladığı rapor edilmiştir (Matsumoto ve ark., 1973; Wickremesinhe ve Arteca, 1993). Süspansiyon kültürü yapmanın amacı sekonder metabolit üretiminin artırılması olduğu düşünüldüğünde, süspansiyon kültürlerinde özellikle sıcaklığın optimize edilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Bu bağlamda sıcaklık optimizasyonunun sekonder metabolitlerin *in vitro* üretiminde önemli bir kriter olduğu bilinmektedir (Choi ve ark., 2000, Ten Hoopen vd., 2002; Yue vd., 2016).

#### 4.3.3. Farklı çalkalama hızlarının etkisi

Juvenil kök ve yapraklara ait süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerine farklı çalkalama hızlarının etkisini belirlemek amacıyla, stok kültürlerden alınan süspansiyonlar 90, 95, 100 ve 110 rpm çalkalama hızlarına ayarlanan ortamlardaki çalkalayıcılar üzerinde kültüre alınarak, yaş ağırlık, kuru ağırlık ve PHH verileri istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve bunlara ait sonuçlar sırasıyla **Çizelge 4.8.** ve **Çizelge 4.9.**' da sunulmuştur. Farklı çalkalama hızlarında gelişime bırakılan juvenil kök orjinli süspansiyon kültürlerinde en yüksek PHH ( $90.00 \pm 5.77$ ), taze ( $21.66 \pm 0.33$ ) ve kuru ağırlık ( $6.50 \pm 0.10$ ) değerleri 95 rpm'de çalkalanan kültürlerden elde edilmiştir (Çizelge 14). Bu bağlamda kök süspansiyon kültürlerinin başlatılması için kullanılan 100 rpm çalkalama hızı optimize edilerek 95 rpm olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.8.** Juvenil Kök Süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerine farklı çalkalama hızlarının etkisi

Çalkalama Hızı (rpm)	Kök		
	PHH(ml/L)	Taze	Kuru
		Ağırlık(g/L)	Ağırlık(g/L)
90	61.66±4.40 c	16.00±0.57 b	4.80±0.17 b
95	90.00±5.77 a	21.66±0.33 a	6.50±0.10 a
100	73.33±3.33 b	21.00±0.57 a	6.30±0.17 a
110	56.00±3.75 c	15.75±0.85 b	4.72±0.26 b

\*Bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değeri, bu ortalamaların istatistiksel olarak  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklı olduğunu gösterir. Her bir deneme 3 kez tekrar edilmiştir.

Yine aynı şekilde yaprak eksplantlarından başlatılan süspansiyon kültürlerinde en yüksek PHH ( $86.66 \pm 6.66$ ), taze ( $22.66 \pm 0.33$ ) ve kuru ağırlık ( $6.80 \pm 0.10$ ) değerleri, 95 rpm çalkalama hızında gelişen kültürlerden elde edildi (**Çizelge 4.9.**). Bu nedenle

aynı şekilde yaprak süspansiyon kültürlerinin başlatılması için rutin olarak kullanılan 100 rpm çalkalama hızı da optimize edilerek 95 rpm olarak belirlendi.

**Çizelge 4.9.** Yaprak Süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerine Farklı Çalkalama Hızlarının Etkisi

Çalkalama Hızı (rpm)	Yaprak		
	PHH(ml/L)	Taze Ağırlık(g/L)	Kuru Ağırlık(g/L)
90	58.33±4.40 b	15.33±0.66 b	4.60±0.20 b
95	86.66±6.66 a	22.66±0.33 a	6.80±0.10 a
100	80.00±5.77 a	19.00±0.58 a	5.70±0.18 a
110	58.75±3.14 b	13.00±0.91 b	3.90±0.28 b

\*Bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların istatistiksel olarak  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklı olduğunu gösterir. Her bir deneme 3 kez tekrar edilmiştir.

Yaprak ve kök süspansiyon kültürlerinde farklı çalkalama hızlarının test edildiği sonuçlar değerlendirildiğinde ise, süspansiyon hatlarının gelişimi için 95 ve 100 rpm çalkalama hızlarının test edilen diğer çalkalama hızlarına göre PHH, yaş ve kuru ağırlık bakımından daha iyi sonuçlar verdiği tespit edilmiş ve test edilen gruplar arasında istatistiksel farklılıkların olduğu gözlenmiştir. Özellikle düşük çalkalama hızlarında hem dağılımın yetersiz oluşu, hem de yeterli havalanmanın olmaması, yüksek çalkalama hızlarında ise hücrelerde oluşan fiziksel hasar nedeniyle PHH, yaş ve kuru ağırlık değerleri bakımından ciddi azalmalar olduğu görülmektedir. Literatürde, yüksek ve düşük çalkalama hızları ile fazla miktarda besi ortamı barındıran süspansiyon kültürlerinde hücrelerin çoğalma kabiliyetlerinin azaldığı ile ilgili benzer bir çalışmaya da rastlanmıştır (Rajasekhar ve ark., 1971)

#### 4.3.4. Işık koşullarının etkisi

*Pistacia lentiscus* L.'un juvenil kök ve yaprak orjinli süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerine ışığın etkisini test etmek amacıyla ise kültürler karanlık ve aydınlık şartlarda gelişim sürecine alınmış, kültürlerle ait yaş ağırlık, kuru ağırlık ve PHH verileri istatistiksel olarak değerlendirilerek sonuçlar aşağıda sunulmuştur (Çizelge 4.10., Çizelge 4.11.). İki bağımsız değişken bakımından değerlendirilme yapılan çalışmada gruplar arasında farklılığı belirlemek amacıyla "Bağımsız grup t-testi analizi" uygulanmıştır. Kök süspansiyon kültürlerinin 4 haftalık kültür süresi sonucunda, aydınlık ortamda gelişen kültürlerin karanlık ortama oranla PHH ( $52.50 \pm 2.50$ ), taze ( $15.00 \pm 0.70$ ) ve kuru ağırlık ( $4.00 \pm 0.25$ ) değerleri bakımından istatistiksel (Student T Testi) olarak  $p \leq 0.05$  seviyesinde daha yüksek değerlere sahip olduğu tespit edildi (Çizelge 4.10.).

**Çizelge 4.10.** Kök Süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerinde ışığın etkisi

Işık Yoğunluğu	Kök		
	PHH(ml/L)	Taze Ağırlık(g/L)	Kuru Ağırlık(g/L)
Aydınlık	52.50±2.50*	15.00±0.70*	4.00±0.25*
Karanlık	48.33±1.66	8.66±1.45	2.93±0.74
<i>Student T Testi</i>	p≤0.05	p≤0.05	p≤0.05

\* Bir sütunda '\*\*' ile gösterilen ortalama değerin, istatistiksel olarak P≤0.05 seviyesinde diğerinden farklı olduğunu gösterir. Her bir deneme 3 kez tekrar edilmiştir.

Aynı şekilde yaprak kalluslarından elde edilen süspansiyon kültürlerinin gelişimleri incelendiğinde de yine aydınlık ortamda gelişen kültürlerin karanlık ortamda gelişen süspansiyon kültürlerine göre daha yüksek PHH (58.75±5.15), taze (23.25±2.17) ve kuru ağırlık (5.70±0.60) değerlerine sahip olduğu gözlemlendi (**Çizelge 4.11.**).

**Çizelge 4.11.** Yaprak Süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerinde ışığın etkisi

Işık Yoğunluğu	Yaprak		
	PHH(ml/L)	Taze Ağırlık(g/L)	Kuru Ağırlık(g/L)
Aydınlık	58.75±5.15*	23.25±2.17*	5.70±0.60
Karanlık	38.33±1.66	14.33±0.33	5.00±0.00
<i>Student T Testi</i>	p≤0.05	p≤0.05	p≥0.05

\* Bir sütunda '\*\*' ile gösterilen ortalama değerin, istatistiksel olarak P≤0.05 seviyesinde diğerinden farklı olduğunu gösterir. Her bir deneme 3 kez tekrar edilmiştir.

Kök ve yaprak eksplantlarının karanlık ve aydınlık şartlarda geliştirilmesinden elde edilen kültürlerdeki gelişim parametreleri incelendiğinde, her iki eksplant tipinde de aydınlık şartlardan elde edilen PHH, taze ve kuru ağırlık değerlerinin karanlık ortamda gelişen kültürlerden daha yüksek miktarda olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar da aydınlık ortam şartlarının *P.lentiscus* L.'un süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerinde daha etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, yaprak ve kök süspansiyon kültürlerinden iki farklı ortamda elde edilen veriler istatistiksel (Student T Testi) olarak değerlendirildiğinde; yaprak süspansiyon kültürlerinde aydınlık ve karanlık ortam uygulamaları arasında PHH, taze ve kuru ağırlık değerleri istatistiksel (Student T Testi) olarak sigma (2-tailed) p≤0.05 seviyesinde anlamlı farklar oluştuğu, ancak kök süspansiyon kültürlerinde ise kuru ağırlık bakımından istatistiksel olarak bir fark bulunmadığı tespit edildi. Özellikle yaprak orjinli süspansiyon hatlarında aydınlık ortam uygulamasının yapıldığı kültürlerin, karanlık koşullara maruz bırakılan kültürlere oranla daha yüksek PHH, yaş ve kuru ağırlık değerlerine sahip olduğu tespit edildi. Hem kök hem de yaprak orjinli süspansiyon kültürlerinde karanlık uygulamasının

süspansiyon oluşumuna olumsuz bir etki yaptığı gözlenmiştir. Ancak yaprak orjinli süspansiyon kültürlerinde bu olumsuz etki, kök orjinli süspansiyon hatlarına oranla daha fazla miktarda olmuştur. Yaprak ve kök süspansiyon kültürleri arasında görülen bu orantısız azalmanın nedeninin, kökün bir toprak altı organ oluşuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Farklı ışık yoğunluğu (karanlık ve aydınlık) uygulanan hücre kültürleri çalışmalarında; hücrelerin çoğaltımında ve sekonder metabolitlerin birikiminde özellikle ışığın etkili bir faktör olduğu rapor edilmiştir (Chan ve ark., 2010; Murthy ve ark., 2014). Ancak metabolit üretimi açısından ışık bazı metabolitlerin; *Petroselinum hortense*'de flavanoid (Kreuzaler ve Hahlbrock, 1973), *Centaurea cyanus*'ta antosiyanin (Kakegawa ve ark., 1991), *Arnebia annua*'da artemisin (Liu vd., 2002) ve betalain (Shin ve ark., 2004) üretimini artırırken, özellikle *Lithospermum erythrorhizon*'un (Tabata ve ark., 1974) ve *Echium amenum*'un köklerindeki şikonin ve türevleri (Zare ve ark., 2010) gibi bazı metabolitlerin üretimini de azaltmaktadır.

#### 4.3.5. pH'nın etkisi

*P.lentiscus* L.'un juvenil kök ve yaprak orjinli süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerine pH'nın etkisini test etmek amacıyla, hücre süspansiyonları farklı pH derecelenmelerine (sırasıyla pH 4.5, 5.0, 5.8, 6.5 ve 7.0) tabi tutuldu. Ortalama 4 haftalık bir kültür periyodu sonrasında, yine PHH, yaş ve kuru ağırlık değerleri kaydedildi (Çizelge 4.12., Çizelge 4.13.). Her iki eksplant tipi için de test edilen pH parametreleri arasında hücrelerin gelişimleri açısından en iyi pH derecesinin PHH bakımından pH 4.5; yaş ağırlık bakımından pH 7; kuru ağırlık bakımından ise pH 5 olduğu tespit edildi. Süspansiyon kültürlerinin optimizasyonu için büyümenin bir ifadesi olarak genellikle kültürlerden elde edilen kuru ağırlık değerleri temel alındığından optimizasyon çalışmamızda pH 5 değeri optimum değer olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4.12. Kök orjinli süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerine farklı pH'ların etkisi

pH	PHH* (ml)	Yaş Ağırlık (gr)	Kuru Ağırlık (gr)
4,5	0.375±0.026a	0.091±0.010b	0.060±0.007a
5	0.275±0.085a	0.098±0.010ab	0.064±0.010a
5,8	0.245±0.062a	0.077±0.003b	0.045±0.010ab
6,5	0.201±0.003a	0.049±0.003c	0.030±0.006b
7	0.293±0.068a	0.117±0.012a	0.043±0.010ab

\* PHH: Paketlenmiş Hücre Hacmi

\* Bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların istatistiksel olarak  $P \leq 0.05$  seviyesinde fark olduğunu gösterir. Her bir deneme 3 kez tekrar edilmiştir.

**Çizelge 4.13.** Yaprak orjinli süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerine farklı pH'ların etkisi

pH	PHH* (ml)	Yaş Ağırlık (gr)	Kuru Ağırlık (gr)
4,5	0.578±0.163a	0.070±0.005b	0.043±0.005b
5	0.298±0.036a	0.086±0.004b	0.065±0.002a
5,8	0.562±0.151a	0.086±0.004b	0.063±0.008a
6,5	0.450±0.120a	0.071±0.007b	0.050±0.004ab
7	0.440±0.124a	0.243±0.020a	0.062±0.004a

\* PHH: Paketlenmiş Hücre Hacmi

\* Bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların istatistiksel olarak  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklı olduğunu gösterir. Her bir deneme 3 kez tekrar edilmiştir.

Doğada bazı bitkilerin daha asidik ya da daha alkali seviyelere ihtiyaç duyabilmelerine karşın, çoğu bitki için, optimum pH aralığı 5.5 ila 7.0 arasındadır. Bitki besin maddeleri, genellikle 5.0 'ten daha düşük bir pH değerine sahip ortamlarda yararlı olmamakla birlikte, bu maddelerin bitkiler tarafından en fazla 5.5 ila 7.0 pH aralığında kullanılabilirdiği bilinmektedir. Kallus ve hücre kültürlerinin optimum büyüme gösterebilmeleri için ise ortamın pH değerinin genellikle 5 ila 6 arasında olması gerekmektedir (Perry, 2013). Ayrıca, farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin ve orta derecedeki pH değerlerinin ise sekonder metabolitlerin birikimini kuvvetle etkilediği tespit edilmiştir (Radić ve ark., 2016). Ortam pH'sının süspansiyon kültürlerini ve dolayısıyla sekonder metabolitlerin oluşumunu etkilediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin; *Daucus carota* kültürleri ile antosiyanin üretimi, pH 5.5'te, pH 4.5'e kıyasla çok daha az gerçekleşmiş, bunun nedeninin yüksek pH'ta antosiyaninin artan degradasyonu olduğu bildirilmiştir (Pandey ve ark., 2015). Yine benzer bir durum, *Bridelia retusa* (L.) Spreng. Bitkisinin süspansiyon kültürlerinde pH, derecelenmelerinin süspansiyon kültür şartları ve antosiyanin sentezi üzerine olan etkilerinin incelendiği çalışmada, pH 5.0'te kültüre alınan hücrelerin daha fazla büyüme ve daha fazla antosiyanin üretimi gösterdiği rapor edilmiştir (Aswathy ve ark., 2018).

#### 4.3.6. Farklı şeker tipi ve konsantrasyonlarının etkisi

Hücre kültürlerinin optimizasyonu çalışmalarında, Glikoz ve Sukroz'un 15, 30 ve 50 mg/l konsantrasyonlarının etkilerinin araştırıldığı bu deneyde, ortalama 28 günlük kültür periyodu sonrasında gelişen süspansiyon halindeki kök ve yaprak orjinli hücre süspansiyonlarına ait PHH, taze ve kuru ağırlık değerleri sırasıyla **Çizelge 20** ve **21**'de

verilmiştir. Kök orjinli süspansiyon kültürlerinin gelişiminde, karbonhidrat kaynağı olarak 30 g/l glukoz konsantrasyonunun hücrelerin PHH ( $0.50\pm 0.04$ ) bakımından, 15 g/l sukroz konsantrasyonunun ise yaş ağırlık ( $0.86\pm 0.01$ ) ve kuru ağırlık ( $0.11\pm 0.01$ ) bakımından en iyi sonuçları verdiği tespit edildi (Çizelge 4.14.).

**Çizelge 4.14.** Kök orjinli süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerine farklı karbonhidrat tipi ve miktarlarının etkisi

Karbonhidrat Tipi	Karbonhidrat Miktarı (g/l)	PHH* (ml)	Yaş Ağırlık (gr)	Kuru Ağırlık (gr)
Glukoz	15	$0.34\pm 0.16ab$	$0.12\pm 0.01b$	$0.013\pm 0.002c$
	30	$0.50\pm 0.04a$	$0.06\pm 0.01bc$	$0.023\pm 0.007b$
	50	$0.43\pm 0.03ab$	$0.05\pm 0.01bc$	$0.021\pm 0.006b$
Sukroz	15	$0.24\pm 0.03bc$	$0.86\pm 0.01a$	$0.112\pm 0.010a$
	30	$0.10\pm 0.02c$	$0.07\pm 0.01bc$	$0.022\pm 0.005b$
	50	$0.07\pm 0.01c$	$0.03\pm 0.01c$	$0.009\pm 0.002c$

\* PHH: Paketlenmiş Hücre Hacmi

\* Bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların istatistiksel olarak  $P\leq 0.05$  seviyesinde farklı olduğunu gösterir. Her bir deneme 3 kez tekrar edilmiştir.

Yaprak orjinli süspansiyon kültürlerinin gelişiminde ise, karbonhidrat tipi bakımından en iyi sonuçlar 50 g/l glukoz konsantrasyonunun hücrelerin PHH ( $0.24\pm 0.04$ ) ve yaş ağırlık ( $0.160\pm 0.01$ ) bakımından en iyi sonuç verdiği tespit edildi. Kuru ağırlık bakımından ise 30 g/l sukroz ve glukoz konsantrasyonları arasında kuru ve yaş ağırlık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiş olmasına rağmen en iyi sonuç ( $0.028\pm 0.004$ ) 30 g/l sukroz konsantrasyonundan elde edildiği tespit edildi (Çizelge 4.15.).

**Çizelge 4.15.** Yaprak orjinli süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerine farklı karbonhidrat tipi ve konsantrasyonlarının etkisi

Karbonhidrat Tipi	Karbonhidrat Miktarı (g/l)	PHH* (ml)	Yaş Ağırlık (gr)	Kuru Ağırlık (gr)
Glukoz	15	$0.065\pm 0.013bc$	$0.077\pm 0.007c$	$0.007\pm 0.001c$
	30	$0.135\pm 0.049b$	$0.122\pm 0.012b$	$0.021\pm 0.003a$
	50	$0.243\pm 0.040a$	$0.160\pm 0.015a$	$0.016\pm 0.009b$
Sukroz	15	$0.038\pm 0.009c$	$0.067\pm 0.008c$	$0.007\pm 0.001c$
	30	$0.150\pm 0.017b$	$0.113\pm 0.010b$	$0.028\pm 0.004a$
	50	$0.083\pm 0.009bc$	$0.080\pm 0.008c$	$0.016\pm 0.002b$

\* PHH: Paketlenmiş Hücre Hacmi

\* Bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların istatistiksel olarak  $P\leq 0.05$  seviyesinde farklı olduğunu gösterir. Her bir deneme 3 kez tekrar edilmiştir.

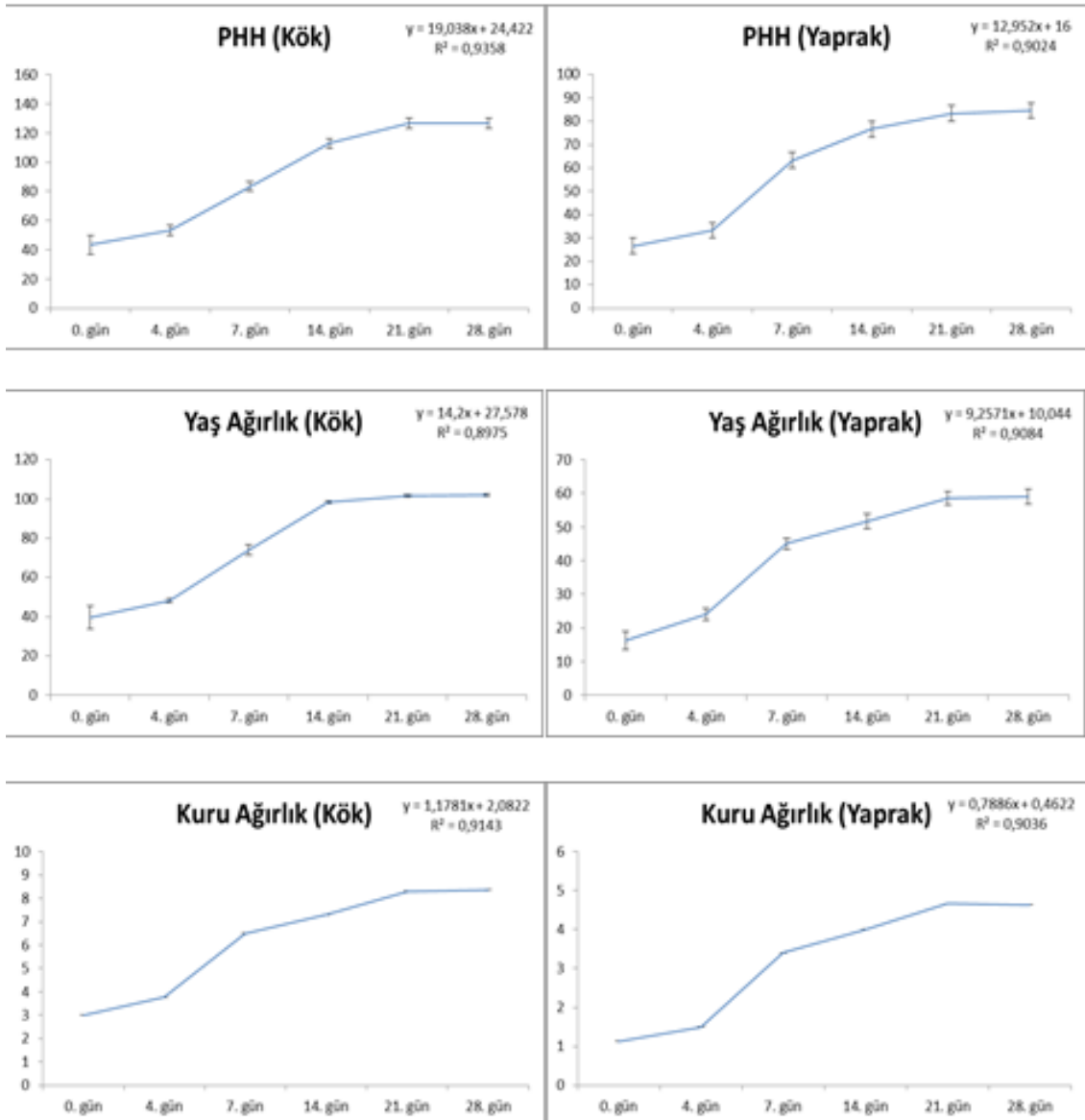
Süspansiyon kültürlerinde bulunan hücrelerin gelişimi hiç şüphesiz yeterli ve etkin bir karbon kaynağına bağlıdır. Süspansiyon kültürlerinde genellikle ortalama 2–4

günlük bir süre zarfında hücre miktarının iki katına çıkması ve hücre kültürlerinin optimum büyümesi için, kültür ortamına bir karbon kaynağı (sukroz veya glukoz, 10–50 g/l) eklenmesi gereklidir. Bununla birlikte, kültür ortamına eklenen tüm sukroz tüketildiğinde, hücreler kendi endojen karbonhidrat stoklarını hidrolize başlarlar. Bu nedenle kültürler eksponansiyel büyüme fazı sonunda alt kültüre alınır. Bitki doku ve hücre kültürlerinde, karbon, fosfor ve azot kaynağı olarak kültür ortamına eklenen makro ve mikro besin elemanları ve bitki büyüme düzenleyicilerinin, hem primer ve sekonder metabolit oluşumu, hem de büyüme üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Bununla ilgili olarak, çalışmamıza benzer sonuçların elde edildiği *Bridelia retusa* (L.) Spreng bitkisinin süspansiyon kültürlerinin optimizasyonu üzerine sukroz, glukoz, maltoz ve fruktoz karbon kaynaklarının farklı konsantrasyonlarının (%1, 2, 3 ve 4) denendiği çalışmada, denenen tüm parametreler bakımından düşük karbon konsantrasyonlarının, hücrelerin proliferasyon oranını düşürdüğü ve %4 glukoz konsantrasyonunun en iyi sonuçları verdiği bildirilmiştir (Astwathy vd., 2018).

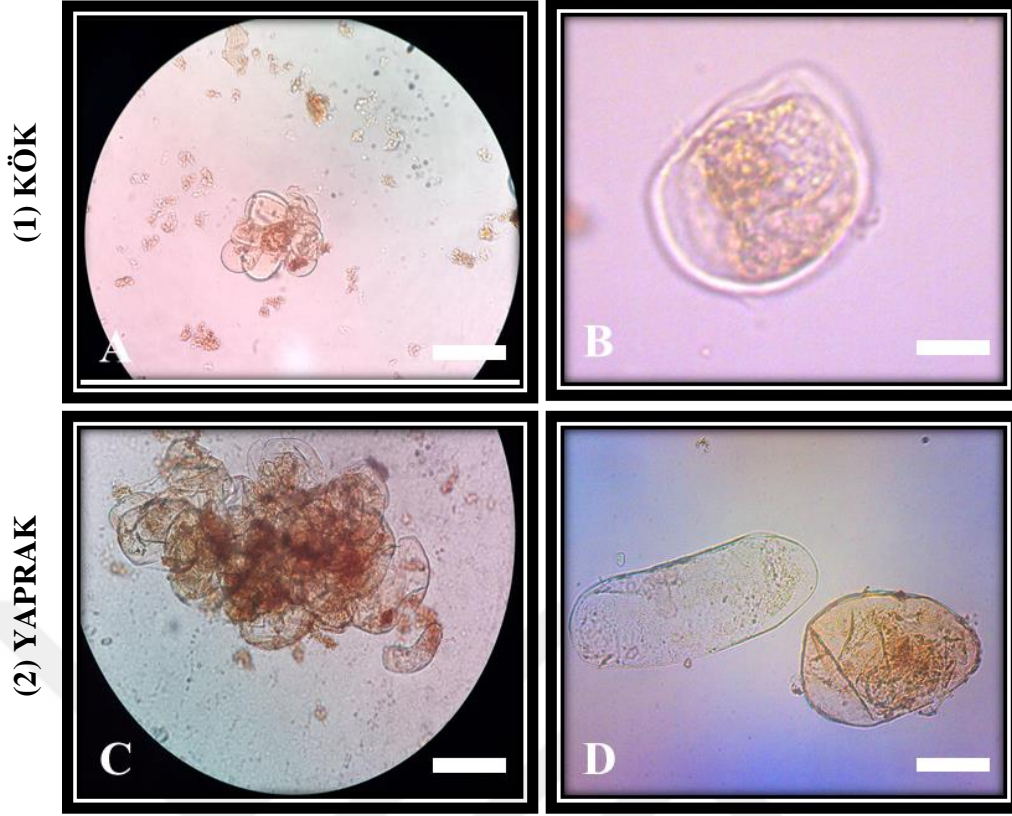
#### 4.4. Juvenil Kök ve Yaprak Orjinli Süspansiyon Kültürlerinde Büyüme

Süspansiyon kültürlerinde, sarımsı, yumuşak ve dağılgan yapıda kallus oluşumu elde edilen besi ortamı, temel süspansiyon kültür besi ortamı olarak çalışılmıştır. Bunun yanında farklı çalkalama hızları (90-95-100-100 rpm), farklı sıcaklıklar (4-25-37 °C), ışık yoğunluğuna (karanlık/aydınlık) yönelik denemeler yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3 başlığı altında sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar, hücrelerin büyümesi bakımından irdelendiğinde; farklı besi ortamlarının denendiği yaprak ve kök süspansiyon hatlarında, kallus kültürlerinde başarılı sonuçların elde edildiği 1 mg/l Kin- 1mg/l 2,4-D kombinasyonu yerine; 1 mg/l BAP- 1mg/l 2,4-D kombinasyonunda PHH' nin yüksek olduğu tespit edilmiş ancak bu iki kombinasyon arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığından, kültürlerin devamlılığı ve sürdürülebilirliği açısından tüm denemelere 1 mg/l Kin - 1 mg/l 2,4-D BBD kombinasyonu ile devam edilmiştir. Buna karşın, taze ve kuru ağırlık açısından test edilen gruplar arasında istatistiksel olarak fark olduğu gözlenmiştir. Kallus kültürleri oluşturma koşulları ile süspansiyon kültürü oluşturma koşullarının birbirinden farklılıklar arzettiği tespit edilmiştir. Farklı sıcaklık koşullarının denendiği yaprak ve kök süspansiyon hatlarında, temel besi ortamı olarak 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D destekli sıvı MS besi ortamında çoğaltılan süspansiyonlar, 4-25 ve 37 °C' de 100 rpm'de çalkalanmıştır. Büyümenin karakterizasyonuna yönelik elde edilen sonuçlar irdelendiğinde ise hem kök

hem de yaprak süspansiyon hatlarının gelişiminde, bitkinin doğal olarak yaşadığı ılıman iklim koşullarından farklılık arzeden sıcak ve soğuk ortam uygulamalarının süspansiyon oluşumunda PHH, yaş ve kuru ağırlık bakımından istatistiksel olarak belirgin bir azalmaya neden olduğu gözlemlendi. Ancak yüksek ve düşük sıcaklık uygulamaları kendi aralarında istatistiksel bir fark oluşturmadı. Farklı çalkalama hızlarının denendiği yaprak ve kök eksplantlarında ise temel besi ortamı olarak 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D destekli sıvı MS besi ortamında çoğaltılan süspansiyonlar, 90-95-100 ve 110 rpm de çalkalanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar büyümenin ifadesine yönelik olarak irdelendiğinde ise, hem kök hem de yaprak süspansiyon hatlarının gelişiminde, 95 ve 100 rpm çalkalama hızlarının, 90 ve 110 çalkalama hızlarına göre süspansiyon oluşumunda (PHH-yaş ve kuru ağırlık bakımından) istatistiksel olarak belirgin bir fark oluşturduğu gözlemlendi. Özellikle yavaş çalkalamada hem hücresel dağılımın hem de yeterli havalanmanın olmaması, yüksek çalkalamada ise fiziksel darbelerin etkisi sonucu PHH, yaş ve kuru ağırlık parametrelerinde ciddi azalmalar gözlemlenmiştir. Aydınlik ve karanlık uygulamalarının denendiği yaprak ve kök süspansiyon hatlarında ise temel besi ortamı olarak 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D destekli sıvı MS besi ortamında çoğaltılan süspansiyonlar, 100 rpm de çalkalanmıştır. Elde edilen sonuçlar, büyümenin karakterizasyonu bakımından değerlendirildiğinde hem kök hem de yaprak süspansiyon hatlarının gelişiminde, aydınlık ve karanlık uygulamalarının PHH, yaş ve kuru ağırlık miktarlarını istatistiksel olarak belirgin bir fark oluşturacak şekilde değiştirdiği tespit edilmiştir. Özellikle yaprak orjinli süspansiyon hatları üzerinde, aydınlık ile karanlık uygulamaları arasında belirgin bir fark gözlemlenmiştir. Karanlık uygulanan kök orjinli süspansiyon hatlarında ise yaprak orjinli olanlara nispetle belirgin bir azalma gözlemlenmemiştir. Bu durumun kökün özellikle bir toprak altı organ oluşundan dolayı meydana geldiği düşünülmektedir. Juvenil kök ve yaprak orjinli süspansiyon kültürlerinde hücre hatları için büyüme eğrilerinin oluşturulmasına ait sonuçlar **Şekil 4.7.** ile süspansiyonlardan elde edilen mikroskop görüntüleri **Şekil 4.8.**'de sunulmuştur.



Şekil 4.7. Optimize edilmiş juvenil kök ve yaprak orjinli süspansiyon hatlarına ait büyüme eğrileri.



**Şekil 4.8.** 1mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4D içeren sıvı MS besi ortamında (1) kök, (2) yaprak orjinli süspansiyon kültürlerinden elde edilen tek hücre (B ve D) ve hücre agregatlarının (A ve C) ışık mikroskobu altındaki görüntüleri. (Bar: 50µm.)

Yukarıda sunulan juvenil kök ve yaprak orjinli süspansiyon hatlarına ait PHH, taze ve kuru ağırlık verileri üzerine oluşturulan büyüme eğrileri değerlendirildiğinde 28 günlük kültür periyodu sonunda hücre artışı durağan hale gelmiş olup, kültür başlangıcından 4 ila 7 gün arasında hücre artışının maksimum hızla yükseldiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak yukarıda verilen büyüme eğrilerine ait sonuçlar doğrultusunda, hem kök hem de yaprak orjinli süspansiyon hatlarında hücre artışının maksimum oranda 4. günde gerçekleştiği ve bu zaman diliminin en uygun elisitasyon zamanı olarak göze çarptığı belirlenmiştir.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 5.1. Sonuçlar

Farmakolojiden tıbbı, gıdadan kozmetiğe, boyar madde ve kimya endüstrisine kadar pek çok sektörde yaygın kullanım alanları bulunan *Pistacia lentiscus* L., içerdığı sekonder metabolitler bakımından oldukça zengin ve faydalı bir bitkidir. Bu nedenle tez çalışmamızda, ülkemizde doğal olarak yetişen sakız ağacı (*P.lentiscus* L.) genotiplerinden biyoteknolojik olarak antikanser özellik gösteren sekonder bileşiklerin *in vitro* ortamda üretilmesi çalışmalarına temel oluşturan süspansiyon kültürlerinin başlatılması ve optimizasyonunu içeren etkin bir protokol tanımlanmıştır. Sakız bitkisinin farklı eksplantlarından (kök ve yaprak) süspansiyon kültürleri başarılı bir şekilde başlatılmış ve kültür şartları optimize edilmiştir. Özellikle *Pistacia* cinsine bağlı *P. lentiscus*'un yapısında barındırdığı antikanser özellik gösteren uçucu ve uçucu olmayan bileşenlerin *in vitro* ortamda miktarlarının arttırılmaya çalışılabilmesi için hücre süspansiyon kültürlerinin optimize edilerek başlatılması daha önce çalışılmamış olup, ülkemizde bilimsel olarak yeni teknoloji geliştirmek bakımından da özgündür.

Özet olarak tez çalışmamızda elde ettiğimiz veriler değerlendirildiğinde aşağıdaki bulgulara ulaşılmıştır:

- Etkili bir yüzey sterilizasyon yöntemi *in vitro* kültürlerin başlatılması ve devamlılığı için ilk ve en önemli aşamadır. Sakız ağacı (*P. lentiscus* L.)'nın aksenik *in vitro* kültürlerinin başlatılabilmesi için tohumların yüzey sterilizasyonu %20'lik Sodyum Hipoklorit (NaOCl) Ticari ACE ile 20 dakika boyunca çalkalanmak ve ardından herbiri 5 dakika olacak şekilde, 5 defa steril distile su ile çalkalanmak suretiyle gerçekleştirildi.. Yüzey sterilizasyonu akabinde, kontrol grubu, 1 mg/l BAP ve 1 mg/l IBA destekli MS besi ortamında çimlenmeye bırakılan tohumların çimlenme oranlarının sırasıyla %45, %55 ve %75 olduğu tespit edildi. 1 mg/l IBA destekli MS besi ortamında, test edilen diğer gruplara oranla çimlenen tohum yüzdesi, gövde ve kök uzunluğu bakımından daha iyi sonuçlar elde edildi. (**Çizelge 4.1.**)
- Çimlenen tohumlardan elde edilen aksenik apikal ve nodal sürgünlerin proliferasyonu ise 100 mg/l Valin, 1 mg/l BAP ve 0.5 mg/l GA3 ile destekli MS besi ortamında gerçekleştirildi. Ortalama 4 haftalık kültür süresi sonucunda, sağlıklı, iyi çoğalmış gövdelere sahip stok kültürler elde edildi ve bu yolla stok kültürlerin muhafazası sağlandı.

- Süspansiyon kültürlerinin başlatılması için gerekli olan kallus dokularını elde etmek amacıyla, aksenik kök ve yapraklardan oluşan en yüksek kallus yüzdesi hem kök (%80) hem de yaprak (%84) eksplantları için 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D ile destekli MS besi ortamından elde edildi. Kallus kültürlerinin sürdürülebilirliğinde önem arzeden kallusların tekstürü göz önüne alındığında, 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D ile destekli MS besi ortamdan elde edilen sarı renkli, yumuşak ve dağılgan tekstüre sahip kalluslar bir sonraki aşama olan süspansiyon kültürlerinin başlatılması için kullanıldı.
- Sakız (*P. lentiscus* L.) bitkisine ait aksenik juvenil kallus kültürlerinden süspansiyon kültürlerinin başlatılması için *in vitro* ortamda, kolay parçalanana-sarımsı renk özelliklerine sahip kök ve yaprak orjinli ve yaş ağırlıkları yaklaşık 0.5 g olan kallus parçaları kullanılarak başlatıldı.
- Juvenil kök ve yaprak orjinli kallus kültürlerinden elde edilen süspansiyonların kültür koşullarının optimizasyon çalışmaları kapsamında, bazı çevresel ve kimyasal faktörlerin (BBD, ışık, sıcaklık, pH, çalkalama hızı, karbon kaynağı) etkileri araştırıldığı aşamada ise süspansiyon kültürleri, kallus oluşturulması çalışmalarında hem kök hem de yaprak eksplantlarında en iyi kallus oluşumunu sağlayan kök orjinli kalluslar için en yüksek PHH ( $36.66\pm 3.33$ ), taze ( $23.33\pm 2.02$ ) ve kuru ağırlık ( $7.00\pm 0.60$ ) değerlerinin 1 mg/L 2,4-D ile 1 mg/L BAP kullanılan ortamdan elde edildiği tespit edildi. Yaprak kalluslarından oluşturulan süspansiyon kültürleri için ise en yüksek PHH ( $33.30\pm 1.66$ ), taze ( $28.33\pm 3.17$ ) ve kuru ağırlık ( $8.50\pm 0.95$ ) değerleri 1 mg/L 2,4-D+1 mg/L BAP kullanılan ortamdan elde edildi. Test edilen farklı BBD kombinasyonları arasındaki en etkili ortamın, PHH, taze ve kuru ağırlık değerleri açısından 1 mg/l BAP ve 1 mg/l 2,4-D ile desteklenen MS besi ortamı olduğu tespit edilmesine rağmen **kültürlerin sürdürülebilirliği ve somaklonal varyasyonların oluşumuna sebebiyet vermemek adına** optimizasyon çalışmalarına test edilen parametreler bakımından aralarında istatistikel olarak fark bulunmayan **1 mg/l KIN ve 1 mg/l 2,4-D** BBD kombinasyonu ile devam edildi.
- Süspansiyon kültürlerinin optimizasyonuna farklı sıcaklık uygulamalarının etkisi de ayrıca araştırıldığı deneyde, kültürden 28 gün sonra gelişen juvenil kök orjinli süspansiyon kültürlerinde en yüksek pHH ( $68.75\pm 6.25$ ), taze ( $21.50\pm 0.64$ ) ve kuru ağırlık ( $6.67\pm 0.15$ ) değerleri 25 °C'de gelişen kültürlerden elde edildi.

Aynı şekilde juvenil yaprak orjinli süspansiyon kültürlerinde ise en yüksek pHH (54.00±3.67), taze (17.50±0.90) ve kuru ağırlık (5.25±0.26) değerleri yine benzer şekilde 25 °C’de gelişen kültürlerden elde edildi. (**Çizelge 4.6., Çizelge 4.7.**).

- Juvenil kök ve yapraklara ait süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerine farklı çalkalama hızlarının etkisini belirlemek amacıyla yapılan deneyde ise, juvenil kök orjinli süspansiyon kültürlerinde en yüksek PHH (90.00±5.77), taze (21.66±0.33) ve kuru ağırlık (6.60±0.1) değerleri 95 rpm’de çalkalanan kültürlerden elde edildi. Yaprak eksplantlarından başlatılan süspansiyon kültürlerinde ise en yüksek PHH (86.66±6.66), taze (22.66±0.33) ve kuru ağırlık (6.80±0.10) değerleri, 95 rpm çalkalama hızında gelişen kültürlerden elde edildi. (**Çizelge 4.8., Çizelge 4.9.**).
- *Pistacia lentiscus* L.’un juvenil kök ve yaprak orjinli süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerine ışığın etkisini test etmek amacıyla yapılan, karanlık ve aydınlık uygulamalarında ise, aydınlık ortamda gelişen kültürlerin PHH (52.50±2.50), taze (15.00±0.70) ve kuru ağırlık (4.00±0.25 a) değerleri bakımından karanlık ortamda gelişen kültürlere oranla daha yüksek değerler gösterdiği tespit edildi. Aynı şekilde yaprak kalluslarından elde edilen süspansiyon kültürlerinin gelişimleri incelendiğinde de yine aydınlık ortamda gelişen kültürlerin karanlık ortamda gelişen süspansiyon kültürlerine göre daha yüksek PHH (58.75±5.15), taze (23.25±2.17) ve kuru ağırlık (5.70±0.60) değerlerine sahip olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar da aydınlık ortam şartlarının *Pistacia lentiscus* L.’un süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerinde daha etkili olduğunu ortaya koymaktadır. (**Çizelge 4.10., Çizelge 4.11.**).
- *Pistacia lentiscus* L.’un juvenil kök ve yaprak orjinli süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerine besi ortamının hidrojen iyon konsantrasyonunun etkisini test edildiği deneyde, her iki eksplant tipi için de hücrelerin gelişimleri açısından en iyi pH derecesinin PHH bakımından pH 4.5; yağ ağırlık bakımından pH 7; kuru ağırlık bakımından ise pH 5 olduğu tespit edildi (**Çizelge 4.12., Çizelge 4.13.**).
- Hücre kültürlerinin optimizasyonu çalışmalarında, kök orjinli süspansiyon kültürlerinin gelişiminde, karbonhidrat kaynağı olarak 30 g/l glukoz konsantrasyonunun hücrelerin PHH (0.50±0.04) bakımından, 15 g/l sukroz konsantrasyonunun ise yağ ağırlık (0.86±0.01) ve kuru ağırlık (0.11±0.01)

bakımından en iyi sonuçları verdiği tespit edildi. Bunun yanısıra yaprak orjinli süspansiyon kültürlerinin gelişiminde ise 50 g/l glukoz konsantrasyonu ile desteklenen hücrelerin PHH ( $0.24\pm 0.04$ ) ve yaş ağırlık ( $0.160\pm 0.01$ ) bakımından en iyi sonuç verdiği tespit edildi. (**Çizelge 4.14.**, **Çizelge 4.15.**)

- Juvenil kök ve yaprak orjinli süspansiyon hatlarına ait PHH, taze ve kuru ağırlık verileri üzerine oluşturulan büyüme eğrileri değerlendirildiğinde 28 günlük kültür periyodu sonunda hücre artışı durağan hale gelmiş olup, kültür başlangıcından 4 ila 7 gün arasında hücre artışının maksimum hızla yükseldiği tespit edildi. (**Şekil 4.7.**)
- Sonuç olarak büyüme eğrilerine ait sonuçlar doğrultusunda, hem kök hem de yaprak orjinli süspansiyon hatlarında hücre artışının maksimum olduğu 4. gün elisitasyon zamanı olarak göze çarptığı belirlenmiş ve yukarıda maddeler halinde açıklandığı üzere tam optimize edilmiş bir hücre süspansiyon kültürü protokolü tanımlanmıştır. (**Şekil 4.7.**)

## 5.2. Öneriler

Türkiye'nin ilaç ithalatı 2000 – 2011 döneminde 1 Milyar ABD dolarından 4,7 Milyar ABD dolarına yükselmiştir. Türkiye'de 2013 yılının Ocak-Kasım döneminde, günlük reçete fatura işlem tutarının ortalama 40,4 milyon lira olduğu rapor edilmiştir (Ananim, 2014). Bu harcama oranı içerisinde kanserle ilgili tedavi maliyeti diğer giderlere göre oldukça büyük bir oranı tutmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan ilaç harcamaları bakımından, Kanser ilaçlarına ayrılan para, AB ülkelerinde kişi başına düşen sağlık harcamalarının yüzde 13'ünü oluşturmakta ve bu yaklaşık 7,3 milyar avroya karşılık gelmektedir. Kematerapötik ilaçlar referans alındığında ise kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar tüm ilaç maliyetlerinin yüzde 4,2'sini oluşturmaktadır. Kanser tedavilerinin doğrudan maliyeti göz önünde bulundurulduğunda ise ilaç maliyeti toplam maliyetin yüzde 12'sidir. Bu oran Norveç, İngiltere, Danimarka, Kanada ve İsviçre'de yüzde 5-9, İsveç, Almanya, Avusturya, Belçika, Finlandiya'da yüzde 9-14, Japonya, ABD, İspanya ve Fransa'da yüzde 14-20 arasında değişmekte, Çek Cumhuriyeti, Macaristan ve Polonya'da ise yüzde 20'den fazla çıkmaktadır." Ancak, kanser ilaç sektöründe ülkemiz çok büyük ölçüde dışa bağımlı bir durumdadır ve İlaç üretiminde kullanılan ham maddelerin yaklaşık %80'i ithalat ile sağlanmaktadır. Ayrıca ileri teknoloji gerektirdiği için üretimi belirli merkezlerde gerçekleştirilen ilaç ve ilaç

hammadeleri diğer ülkelerden ithal edilmektedir (Tubitak, 114Z842 Nolu Proje Öneri Formu, 2015).

Bitki biyoteknolojisi yöntemleri, sadece biyolojik olarak aktif olan ve antikanser özellik gösteren sekonder metabolitlerin üretimi için değil, aynı zamanda bu önemli fitokimyasalların miktarlarını arttırmak için de yeni fırsatlar sunmaktadır.

Tez konumuz özellikle sağlık alanında yerel kaynaklardan biyoteknolojik yöntemlerle farmasötik sanayiye hammadde temini ve artırımı yönünde yapılacak olan biyoteknolojik çalışmalara temel oluşturması potansiyelinden dolayı ve ilk defa hücre ve süspansiyon kültürlerinin başlatılacak olması bakımından önem arz etmektedir.

Metabolit biyosentezini, birikimini ve biyoteknolojik üretimin miktarını arttırmak için günümüze değin farklı metodolojiler kullanarak birçok girişimde bulunulmuştur. Alternatif bir yaklaşım ise, ilgili metabolik yolların anlaşılmasını sağlamaktır. Bitki hücresinde sekonder metabolit üretimini arttırırken, 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 manipölasyon daha doğru ve yararlı bir yaklaşım olacaktır. Sekonder metabolit yolaklarının 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 çalışmamız Pistacia cinsine ait diğer türler ve tıbbi öneme sahip bitkiler için bir model oluşturacaktır.

## KAYNAKLAR

- Acıduman, A. ve İlgili, Ö., 2010, Chapters Related to “Geriatrics” in The Canon of Medicine by Avicenna. “İbni Sînâ'nın El-Kânûn Fî't-Tıbb Adlı Eserinde “Geriatrı” İle İlgili Bölümler”, *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 63 (2), 41-47.
- Akçam Oluk, E., 2006, Bitki Hücre Süspansiyon Kültürleri ve Sekonder Metabolit Üretimi, *Anadolu University Journal of Science and Technology - A*, 7 (2), 303-310.
- Akdemir, Ö., Tilkat, E., Onay, A., Kılınç, F., Süzerer, V. ve Çiftçi, Y., 2013, Geçmişten Günümüze Sakız Ağacı *Pistacia lentiscus* L. *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 3 (2), 1-28.
- Aksoy, A. Duran N., Toroglu S. and Koksall F., 2007, Short-term effect of mastic gum on salivary concentrations of cariogenic bacteria in orthodontic patients, *Angle Orthod*, 77, 124–128.
- 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.
- Al-Khayri, J.M., 2012, Determination of the date palm cell suspension growth curve, optimum plating efficiency, and influence of liquid medium on somatic embryogenesis, *Emir. J. Food Agric* 24 (5), 444-455.
- 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 Papageorgiou V.P., 2003, Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against in vitro LDL oxidation, *Phytother Res*, 17, 501–507.
- Anonim, 2007, Phylogeography of representative plant species of the Mediterranean flora, Research project, Web:<https://www.uv.es/filmed/spp/pistacengl.htm>, Erişim tarihi: 31.05.2018.
- Anonim, 2014, Türkiyede günlük reçete edilen ilaç tutarı 40 milyon TL'yi aştı, Web: <https://www.medikalakademi.com.tr/turkiye-recete-edilen-ilac-tutari-fiyat/>, Erişim 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>, Erişim tarihi: 31.05.2018.
- Assimopoulou, A.N., Zlatanov S.N., and Papageorgiou V.P., 2005, Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates, *Food Chem* 92, 721–727.
- 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.
- Barbulova, A. , Apone F., and Colucci G., 2014, Plant Cell Cultures as Source of Cosmetic Active Ingredients, *Cosmetics*, 1, 94-104.
- 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.
- 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>, Erişim tarihi: 31.05.2018.
- Bota, C. and Deliu, C. 2012, Effect of some biotic elicitors on flavonoids production in *Digitalis lanata* cell cultures, *Rev Med Chir Soc Med Nat*, 116(2), 624-629.
- Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Salehi Surmaghi, M.H., Shams-Ardekani, M.R. and Rahimi, R., 2013, Five Pistacia species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): A Review of Their Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology, *The Scientific World Journal*, 219815, 1- 33.
- Boztok, Ş., 1999, Sakız Yetiştiriciliği. *Ege Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi*. İZMİR.
- Castellar, A., Gagliardi R.F., and Mansur E., 2011, In vitro propagation and establishment of callus and cell suspension cultures of *Petiveria alliacea* L., valuable medicinal plant, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (7), 1113-1120.
- 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.
- Chan, L.K., Koay, S.S., Boey, P.L., Bhatt, A. 2010, Effects of abiotic stress on biomass and anthocyanin production in cell cultures of *Melastoma malabathricum*, *Biological Research*; 43,127–135.
- Chaudhry, H., Fatima, N. and Ahmad, I.Z., 2014, Establishment of callus and cell suspension cultures of *Nigella sativa* L. for thymol production, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (1), 788-794.
- Chintalwar, G.J. Gupta, S. Roja, G. and Bapat, V.A. 2008, Protoberberine alkaloids from callus and cell suspension cultures of *Tinospora cordifolia*, *Pharmaceutical Biology*, 4 (2), 81-86.
- Choi, H.K., Kim, S.I., Son, S.J., Hong, S.S., Lee, S.H., Leeb, H.J. 2000, Enhancement of paclitaxel production by temperature shift insuspension culture of *Taxus chinensis*, *Enzyme Microb. Technol.* 27, 593-598.
- Çetin, E.S. and Göktürk-Baydar, N., 2016, Elicitor applications to cell suspension culture for production of phenolic compounds in grapevine, *Journal of Agricultural Sciences*, 22 (1), 42-53.
- Dalby, A., 2003, Food in the ancient world from A to Z. London: *Taylor and Francis Group*.
- Davis, P.H., 1967, *Linum* L. In: Davis PH. (ed.) Flora of Turkey and the East Aegean Islands. *Edinburgh University Press*, Edinburgh, 2, 425–450.
- Dedoussis, G.V., Kaliora, A.C., Psarras, S., Chiou, A., Mylona, A. 2004, Antiatherogenic effect of *Pistacia lentiscus* via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression, *Atherosclerosis*, 174, 293–303.
- Duke, J.A., 1983, Medical Plants of the Bible. New York: Conch Publishers.
- Erkoyuncu, M.T. and Yorgancılar, M., 2016, Bitki doku kültürü yöntemleri ile sekonder metabolitlerin üretimi, *Selçuk Tar Bil Der*, 2 (1), 66-76.

- Escoriaza, G., Sansberro, P., Garcí'a, Lampasona, S., Gatica, M., Bottini, R. and Piccoli, P., 2013, *In vitro* cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay synthesize the phytoalexin nerolidol upon infection by *Phaeoacremonium parasiticum*, *Phytopathol Mediterr*, 52, 289–297
- Falco, M.C., Mendes B.M. J., Neto A.T., 1996, Cell suspension Culture of sugarcane: Growth, management and plant regeneration, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, *R. Bras. Fisiol*, 8 (1),1-6.
- 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.
- Fascella G, Airo M, Zizzo GV, Ruffoni B.2004. Prime osservazioni sulla coltivazione in vitro di Lentisco (*Pistacia lentiscus* L.). *Italus Hortus*, 11(4), 141- 143.
- Giaginis, C. and Theocharis S., 2011, Current evidence on the anticancer potential of chios mastic gum, *Nutrition and Cancer*, 63 (8), 1174-1184.
- Grieve, M., 1994, A Modern herbal. London: CG Leyer (Ed.).
- Grundwag, M. 1976. Embryology and fruit development in four species of *Pistacia* L. (Anacardiaceae), *Botanical Journal of the Linnean Society*, 73,355-370.
- Güven, A. ve Gürsul, I., 2014, Bitki doku kültürlerinde sekonder metabolit sentezi, *Gıda*, 39 (5), 299-306.
- Haberlandt, G., 1902, Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitz-Ber. Mat. Nat. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien* 111, 69–92.
- Hampp, C., Richter, A., Osorio, S., Zellnig, G., Sinha, A.G., Jammer, A., Ferniec, A.R., Grimm, B., and Roitsch, T., 2012, Establishment of a photoautotrophic cell suspension culture of *Arabidopsis thaliana* for photosynthetic, metabolic, and signaling studies, *Molecular Plant*, 5 (2), 524–527.
- Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, R.M., and Fischer, R., 2004, Plant cell cultures for the production of recombinant proteins, *Nature Biotechnology*, 22 (11), 1415-1422.
- Huwez, F.U., and Al-Habbal, M.J., 1986, Mastic in treatment of benign gastric ulcers, *Gastroenterol Jpn*, 21, 273–241.
- 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.
- Iauk, L., Ragusa, S., Rapisarda, A., Franco, S., Nicolosi, V.M. 1996, *In vitro* antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. extracts preliminary report, *J Chemother*, 8, 207–209.
- Imtiyaz, S., Tariq, M., Ali, S.J., Chaudhary, S.S., and Baig, M.G., 2013, *Pistacia lentiscus* Linn: Gum with immense medicinal potential, *Spatula DD.*, 3 (2), 69-73. [doi:10.5455/spatula.20130428011208](https://doi.org/10.5455/spatula.20130428011208)
- İsfendiyaroğlu, M. and Ozeker, E., 2001, The effect of IAA, IBA, NAA and 2, 4-D on rooting in cuttings of very young *Pistacia atlantica* Desf. seedlings. *Nucis, Newsletters*, 10, 26-28.
- Janakat, S. and Al-Merie, H., 2002, Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia*, and *Nicotiana glauca*, *J Ethnopharmacol*, 83, 135–138.
- Jin, L., Yang, Y., Gao, W., Gong, M., Wang, J., Anderson, N.O., and He, M., 2017, Establishment of callus induction and cell suspension cultures of *Dendrathera Indicum* var. *Aromaticum* a scented Chrysanthemum, *Journal of Plant Studies*, 6 (2), 38-44.

- Kakegawa, K., Emiko Hattori, E., Koike, K., Takeda, K. 1991, Induction of anthocyanin synthesis and related enzyme activities in cell cultures of *Centaurea cyanus* by UV-light irradiation, *Phytochemistry*, 30 (7), 2271-2273.
- 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.
- Kermanee, P., 2004, Plant regeneration from cell suspension culture of rice varieties Khao Dawk Mali 105 and Suphanburi, *Kasetsart J. Nat. Sci*, 38, 90-96.
- Kılınç, F.M., 2013, Sakız ağacı (*Pistacia lentiscus* L.)'nın in vitro klonal mikroçoğaltılması, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Basımevi, Diyarbakır.
- Kılınç, F.M., Süzerer, V., Özden Çiftçi, Y., Onay, A., Yıldırım, H., Uncuoğlu Altinkut, 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.
- Kılınç, F.M., Süzerer, V., Ozden Çiftçi, Y., Onay, A., Yıldırım, H., Uncuoğlu, Altinkut A., Tilkat, E., Koc, I., Akdemir, Ö.F., Metin Karakaş, Ö., 2015, Clonal micropropagation of *Pistacia lentiscus* L. and assessment of genetic stability using IRAP markers, *Plant Growth Regulation*, 75, 75-78
- Kim, H.J. and Neophytou, C., 2009, Natural antiinflammatory compounds for the management and adjuvant therapy of inflammatory bowel disease and its drug delivery system, *Arch Pharm Res*, 32, 997–1004.
- Koutsoudaki, C., Krsek, M. and Rodger, A., 2005, Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* var. chia, *J Agric Food Chem*, 53, 7681–7685.
- Kress, C.L., Konopleva, M., Mart'inez-Garc'ia, V., Krajewska, M. and Lefebvre, S., 2007, Triterpenoids display single agent anti-tumor activity in a transgenic mousemodel of chronic lymphocytic leukemia and small B cell lymphoma, *PLoS One*, 2, 559.
- Kreuzaler F., Hahlbrock K., 1973, Flavonoid glycosides from illuminated cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*, *Phytochemistry*, 12(5), 1149-1152.
- Liby, K.T., Yore, M.M. and Sporn, M.B., 2007, Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer, *Nat Rev Cancer*, 7, 357–369.
- Liu, C.Z., Guo, C., Wang, Y.C., Quyang, F. 2002, Effect of lightirradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L., *Process Biochem.*, 38, 581-585.
- Ljubuncic, P., Song, H., Cogan, U., Azaizeh, H. and Bomzon, A., 2005, The effect of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease, *J Ethnopharmacol*, 100, 198–204.
- Loizou, S., Paraschos S., Mitakou S., Chrousos G.P. and Lekakis, I., 2009, Chios mastic gum extract and isolated phytosterol tirucallol exhibit anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells, *Exp BiolMed (Maywood)*, 234, 553–561.

- 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
- Mascarello, C., Fascella, G., Zizzo, G.V., Mantovani, E., Ruffoni, B. 2007, In vivo and in vitro propagation of *Pistacia lentiscus* L., *Proc. XXVII IHC-S10 Plant Biotechnology*, In: Chief Read PE (ed) *Acta Hort.*, 764, 299–306.
- Matsumoto, T., Nishida, K., Noguchi, M., Tamaki, E. 1973, Some factors affecting the anthocyanin formation by *Populus* cells in suspension culture, *Agric. Biol. Chem.*, 37, 561-567.
- 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).
- Mazarei, M., Al-Ahmada, H., Rudisa, M.R., Joyce, B.L., and Stewart Jr C.N., 2011, Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cell suspension cultures: establishment, characterization, and application, *Plant Science*, 181 (6), 712-715.
- 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.
- Morais-Lino, L.S., Santos-Serejo, J.A., Silva, S.O.D., Santana, J.R.F., and Kobayashi A.K., 2008, Cell suspension culture and plant regeneration of a Brazilian plantain, cultivar Terra, *Pesq. agropec. bras.*, *Brasília*, 43 (10), 1325-1330.
- Moscatiello, R., Baldan, B. and Navazio L., 2013. Plant cell suspension cultures. *Methods Mol Biol.*, 953, 77-93.
- Muir W.H., 1953, Culture conditions favouring the isolation and growth of single cells from higher plant *in vitro*. PhD Thesis, University of Wisconsin, Madison, USA.
- Mulas, M., Albentino, P., Brigaglia, N. 1998, Evaluation of *Pistacia lentiscus* L. genetic resources to select ecotypes having high efficiency in the colonisation of marginal lands, *Acta Hort.*, 457, 279-286.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant*, 15 (3), 473-497.
- Murthy H.N, Lee E.J, Paek K.Y, 2014, Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 118, 1-16.
- Nartop, P., Gürel, A., Akgün, İ.H. and Bedir, E., 2015, Astragaloside IV and cycloastragenol production in vitro produced *Astragalus trojanus* Stev. *Indian Journal of Biotechnology*, 14, 540-546.
- Núñez-Palenius, H. G. and Ochoa-Alejo, N., 2005, Effect of phenylalanine and phenylpropanoids on the accumulation of capsaicinoids and lignin in cell cultures of chili pepper (*capsicum annuum* L.), *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 41 (6), 801-805.
- Onay, A., Özden-Çiftçi, Y., Yıldırım, H., Tilkat, E. 2014, Sakız ağacının (*Pistacia lentiscus* L.) juvenil ve olgun eksplantlarının mikroçoğaltımı, kriyoprezervasyonu

- ve genetik kararlılığının belirlenmesi, *Proje Sonuç Raporu* (TUBITAK Proje No: 110T941).
- 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 Reçinesi, *Batman University, Journal of Life Sciences*; 6 (2), 133.
- Orhan, I., Kupeli, E., Aslan, M., Kartal, M. and Yesilada E., 2006, Bioassay-guided evaluation of antiinflammatory and antinociceptive activities of pistachio, *Pistacia vera* L., *J Ethnopharmacol*, 105, 235–240.
- 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, Irbid, Jordan.
- Pandey, A., Rathore, D.K.S., Pathakar, A. 2015, Production of secondary metabolite (anthocyanin) from callus culture of *Daucus Carota*, *International Journal of Advanced Scientific and Technical Research*, 5(2), 360-366.
- Paraschos, S., Magiatis, P., Mitakou, S., Petraki, K. and Kalliaropoulos, A., 2007, In vitro and in vivo activities of Chios mastic gum extracts and constituents against *Helicobacter pylori*, *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 551–559.
- 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*, 12. Springer, Boston, MA.
- Paula Alexandra da Silva Veiga, *Pistacia lentiscus*. Mastic or lentisc resin was found in residues inside Egyptian amphorae, in Serpico, *Health and Medicine in Ancient Egypt: Magic and Science*, Web adresi: [https://www.academia.edu/225468/Health\\_and\\_Medicine\\_in\\_Ancient\\_Egypt\\_Magic\\_and\\_Science](https://www.academia.edu/225468/Health_and_Medicine_in_Ancient_Egypt_Magic_and_Science), Erişim tarihi: 31.05.2018.
- Perikos, J., 1993, The Chios Gum Mastic, *Print All Ltd.*, Athens.
- Petronelli, A., Pannitteri, G. and Testa, U., 2009, Triterpenoids as new promising anticancer drugs, *Anticancer Drugs*, 20, 880–892.
- Piotto, B., 1995, Influence of scarification and prechilling on the germination of seeds of *Pistacia lentiscus*, *Seed Science and Technology*, 23, 659-663.
- Rahman, M.S., Miah, M.A.B., Hossain, M.S., Kabir, A.H. and Rahman M.M., 2012, Establishment of cell suspension culture and plant regeneration in *Abrus precatorius* L., a rare medicinal plant, *Notulae Scientia Biologicae*, 4 (1), 86-93.
- Rajasekhar E. W., Edwardsm., Wilson S. B., Street H. E. 1971, Studies on the growth in culture of plant cells: XI. The influence of shaking rate on the growth of suspension cultures” *Journal of Experimental Botany*, 22 (1),107-117.
- Sajid, Z.A. and Aftab, F., 2016, An efficient method for the establishment of cell suspension cultures in potato (*Solanum tuberosum* L.), *Pak. J. Bot.*, 48 (5), 1993-1997.
- Sarantinidis, M. and Smyrnioudis, I., 2011, Chios Mastiha, Web: [http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:ijMFLw3VmisJ:www.gummastic.gr/public/Leaflets/ENG\\_Mastiha\\_Presentation\\_Sept\\_2011\\_no\\_video.pptx+&cd=3&hl=tr&ct=clnk&gl=tr](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:ijMFLw3VmisJ:www.gummastic.gr/public/Leaflets/ENG_Mastiha_Presentation_Sept_2011_no_video.pptx+&cd=3&hl=tr&ct=clnk&gl=tr), Erişim tarihi: 31.05.2018.
- Schafer-Menuhr, A., Mix-Wager, G. And Vorlop K.D., 2003, Regeneration of Plants From Cell Suspension Cultures and Encapsulated Cell Suspension Cultures of *Solanum tuberosum* L. cv. Clarissa , *Landbauforschung Völkenrode* 1 (53), 53-59.

- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Leblebici, E. ve Bekat, L., 2008, Tohumlu Bitkiler Sistematığı, *Ege Univ. Yayınları*, İzmir, s. 446.
- Serpico, M., 2000, Resins, amber and bitumen in ancient egyptian materials and technology, Nicholson PT and Shaw I (Eds.). Cambridge: *Cambridge University Press*.
- Setzer, W.N. and Setzer, M.C., 2003, Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents, *Mini Rev Med Chem*, 3, 540–556.
- Shin K.S., Murthy H.N, Heo J.W., Paek, K.Y., 2004, Induction of betalain pigmentation in hairy roots of red beet under different radiation sources. *Biol. Plant.* 47, 149-152.
- 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.
- Sterer, N., 2006, Antimicrobial effect of mastic gum methanolic extract against *Porphyromonas gingivalis*, *J Med Food*, 9, 290–292.
- Stevens, P.F., 2008, Angiosperm phylogeny website, version 9, Web: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/Apweb/>, Erişim Tarihi: 31.05.2018.
- Steward, F.C. and Shantz, E.M., 1956, The chemical induction of growth in plant tissue cultures. In *The Chemistry and Mode of Action of Plant Growth Substances*, Ed. R. L. Wain and F. Wightmann, Butterworth and Co. Lt., London, pp. 165-186.
- Sun, S.Y., 2008, Therapeutic potential of synthetic triterpenoids in neuroblastoma, *Cancer Biol Ther*, 7, 718–720.
- Surmuş-Asan, H., Özen, H.Ç. ve Onay, A., 2017, *Hypericum retusum* Aucher'in Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Optimizasyonu ve Fenolik Bileşen İçeriğinin İncelenmesi, *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der.* 7 (2), 97-105.
- Tabata, M., Mizukami, H., Hiraoka, N., Konoshima, M., 1974, Pigment formation in callus cultures of *lithospermum erythrorhizon*, *Phytochemistry*, 13 (6), 927-93.
- Takahashi, K., Fukazawa, M., Motohira, H., Ochiai, K. and Nishikawa, H., 2003, A pilot study on antiplaque effects of mastic chewing gum in the oral cavity, *J Periodontol*, 74, 501–505.
- 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.
- Ten Hoopen, H.J.G., Vinke, J.L. Moeno, P.R.H., Verpoorte, R., Heijnen, J.J., 2002, Influence of temperature on growth and ajmalicine production by *Catharanthus roseus* suspension cultures, *Enzyme Microbial Technology*, 30,56-65.
- Thorpe T.A., 2013, History of Plant Tissue Culture, In: *Methods in Molecular Biology, Plant Cell Culture Protocols, Second Edition*, 318, 9-32. Edited by: V. M. Loyola-Vargas and F. Vázquez-Flota, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Topçu, Ş. and Çölgeçen, H., 2015, Bitki sekonder metabolitlerinin biyoreaktörlerde üretilmesi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2, 9-29.
- Triantafyllou, A., Chaviaras, N., Sergentanis, T.N., Protopapa, E., Tsaknis, J., 2007, Chios mastic gum modulates serum biochemical parameters in a human population, *J Ethnopharmacol*, 111, 43-49.
- Tubitak Proje Öneri Formu, 2015. *Pistacia lentiscus* L.'un in vitro sürgün, kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinde antikanser aktivite gösteren kimyasal bileşenlerin üretilmesi, TUBITAK KBAG, 114Z842 Nolu Proje.

- Turgut-Kara N. and Arı Ş., 2008. In vitro plant regeneration from embryogenic cell suspension culture of *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae), *African Journal of Biotechnology*, 7 (9), 1250-1255.
- Verdu M., Garcia-Fayos P., 2002, Ecología reproductiva de *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae): anacronismo evolutivo en el matorral mediterráneo. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 75(1), 57-65.
- Wani S.J., Kagdi I.A., Tamboli P.S., Nirmalkar V.S., Patil S.N. and Sidhu A.K., 2014, Optimization of MS media for callus and suspension culture of *costus pictus*, *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 5 (2), 2229-5518.
- Whitehouse, W.E., 1957, The pistacio nut-a new crop for the western United States, *Economic Botany*, 11(4), 281-321.
- Wickremesinha, E.R.M., Arteca, R.N. 1993, Taxus callus cultures: optimizing growth and production of taxol, *Journal of Plant Physiology*, 144, 183-188.
- Włodarczyk, Z., 2007, Review of plant species cited in the Bible, *Folia Horticulturae, Ann.* 19(1), 67-85.
- Yan, Miao-Miao Xu, Chan Kim, Chun-Hwan Um, Yeong-Cheol, Yeong-Cheol, Um Amadou, Apho Baha, De-Ping, Guoa 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.
- Zakynthinos, G. and Rouskas, D., 1998, Wild and cultivated pistacia species in Greece. Padulosi S. and HadjHassan, A., editors. 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.
- Zhou, L., Satoh K., Takahashi K., Watanabe S., Nakamura W., 2009, Re-evaluation of anti-inflammatory activity of mastic using activated macrophage, *In Vivo*, 23, 583-589.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : AYŞE HOŞER  
Uyruğu : T.C  
Doğum Yeri ve Tarihi : 01/01/1988  
Telefon :  
Faks :  
e-mail : aysehosr@gmail.com

### EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Fatih lisesi	2009
Üniversite	: Batman Üniversitesi	2013
Yüksek Lisans	: Batman Üniversitesi	2018
Doktora	:	

### İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
-----	-------	--------

### UZMANLIK ALANI

### YABANCI DİLLER

### BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

### YAYINLAR