



T.C.

BATMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI AĞIR METAL UYGULAMALARININ *IN VITRO* ORTAMDA ÇOĞALTILMIŞ JUVENİL *Pistacia lentiscus* L. (SAKIZ AĞACI) EKSPANTLARINDA TRİTERPENÖİT MİKTARLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Hatice AKKUŞ

YÜKSEK LİSANS
Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz-2018
BATMAN
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Hatice AKKUŞ tarafından hazırlanan "Bazı Ağır Metal Uygulamalarının in vitro Ortamda Çoğaltılmış Sakız Ağacı (*Pistacia lentiscus* L.) Eksplantlarında Triterpenoit Miktarları Üzerine Etkisinin Belirlenmesi" adlı tez çalışması 27/07/2018 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyolji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan
Prof. Dr. Engin TILKAT

Danışman
Doç. Dr. Emine AYAZ TILKAT

Üye
Doç.Dr. Abdülsemel ERTAŞ

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.


Doç. Dr. Bahattin İŞCAN
FBE Müdürü

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

TEZ BİLDİRİMİ

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

DECLARATION PAGE

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

Hatice AKKUŞ

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI AĞIR METAL UYGULAMALARININ *IN VITRO* ORTAMDA ÇOĞALTILMIŞ JUVENİL SAKIZ AĞACI (*Pistacia lentiscus* L.) EKSPLANTLARINDA TRİTERPENÖİT MİKTARLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Hatice AKKUŞ

Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Emine AYZAZ TILKAT

2018, 54 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Engin TILKAT

Doç. Dr. Emine AYZAZ TILKAT

Doç. Dr. Abdülselem ERTAŞ

ÖZET

Bu çalışmada, geleneksel tıpta birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ve tıbbi olarak değerli sekonder metabolitleri içeren *Pistacia lentiscus* L. (Sakız ağacı) bitkisinin farklı konsantrasyonlarda bazı ağır metal (elisitör) uygulamalarının *in vitro* koşullarda bu bitkinin triterpenoit miktarları ve çeşidi üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu bağlamda sakız ağacına ait olgun tohumlar 1mg/L IBA destekli MS besi ortamında çimlendirilmiş, elde edilen juvenil sürgünler 1 mg/l BAP, 0.5 mg/L GA₃ ile destekli MS besi ortamında proliferere edilmiştir. Akseni stok materyallerden, yaklaşık 1 cm uzunluğunda alınan sürgünler 1, 2 ve 4 mg/L olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda bakır nitrat, gümüş nitrat, nikel nitrat, kurşun nitrat ve kobalt klorür içeren 1 mg/L BAP ve 0.5 mg/L GA₃ destekli MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından itibaren 28 gün sonra gövde ile yaprak kısımları oda sıcaklığında kurutulmuş etanol ekstraktları hazırlanmış ve LC-MS/MS ile GC-MS analizleri yapılmıştır.

Ağır metal elisitasyonu sonucunda *P. lentiscus* L. yaprak ve gövde ekstraktlarının antikanser özelliği bilinen ursonik, moronik, oleonik, mastikadienolik, oleonik ve ursolik asit triterpenlerine ait miktarlarının kontrol gruplarına oranla artış gösterdiği ayrıca kontrol grubunda bulunmayan bazı triterpenoit bileşiklerin de sentezlendiği tespit edilmiştir. Ağır metal elisitasyonunun juvenil sürgünlerin kontrol grubuna oranla ortalama gövde sayısını ve gövde oluşturma kapasitesini azalttığı, ortalama gövde uzunluğunu ise arttırdığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Pistacia lentiscus* L., *in vitro*, ağır metal, triterpenoit

ABSTRACT**MS THESIS****DETERMINATION OF THE EFFECT OF SOME HEAVY METAL APPLICATIONS ON THE TRITERPENOID QUANTITIES OF JUVENILE MASTIC TREE (*Pistacia lentiscus* L.) PROLIFERATED IN IN VITRO MEDIUM****Hatice AKKUŞ****THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
BATMAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN BIOLOGY****Advisor: Assoc. Prof. Dr. Emine AYAZ TILKAT****2018, 54 Pages****Jury****Prof. Dr. Engin TILKAT****Assoc. Prof. Dr. Emine AYAZ TILKAT****Assoc. Prof. Dr. Abdülislam ERTAŞ****ABSTRACT**

In this study, it was aimed to determine the effects of some elicitor applications in different concentrations on the production of triterpenoid quantities of *Pistacia lentiscus* L.(Mastic tree), which contain valuable secondary metabolites, this plant in vitro conditions.

In this context, mature seeds of mastic trees which are surface sterilized were germinated in MS supplemented 1mg/L IBA and the obtained juvenile shoots were proliferated in MS medium supplemented with 1mg/L BAP, 0.5 mg/L GA₃. Shoots taken about 1 cm in length from axenic stock materials were cultured in MS medium supplemented with 1 mg/L BAP, 0.5 mg/L GA₃ and copper nitrate, silver nitrate, nickel nitrate, lead nitrate and cobalt chloride at 1, 2.and 4 mg/L concentrations seperately. After 28 days from the beginning of culture, stem and leaf parts were dried at room temperature and ethanol extracts were prepared and analyzed by LC-MS / MS with GS-MS.

As a result of the heavy metal elicitation, amounts of Ursolic, Moronic, Oleonic, Masticadienolic, Oleonic and Ursolic acid triterpenes which are known anticancer properties of leaf and stem extracts of *P. lentiscus* L. are increased compared to the control groups and some triterpenoid compounds not in the control group are also synthesized. It has been determined that heavy metal elicitation reduces the average number of shoot and stem forming capacity and increases the average stem length of juvenile shoots compared to the control group.

Key words: *Pistacia lentiscus* L., *in vitro*, heavy metal, triterpenoid

ÖNSÖZ

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve tüm çalışmalar boyunca yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Emine AYZ TİLKAT'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, bu çalışmaya maddi yönden kaynak sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na teşekkürü bir borç bilirim. Doku kültürü çalışmalarını gerçekleştirebilmem için Batman Üniversitesi Biyoloji Araştırma Laboratuvarının kapılarını ardına kadar açan ve çalışmaların her aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen kıymetli hocam Biyoloji Bölümü Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Engin TİLKAT'a, tanıdığım günden beri çalışma prensibi ve akademik duruşuyla örnek olan çalışmalarım boyunca bilgi birikimine başvurduğum ve çalışmaların her aşamasında yardımlarını esirgemediğinden dolayı Öğr. Gör.Veyssel SÜZERER'e çok teşekkür ederim. Maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan, desteğini esirgemeyen babam Abdullah AKKUŞ'a ve her zaman yanımda olan tüm aile fertlerine fedakârlığından dolayı çok teşekkür ederim.

Hatice AKKUŞ
BATMAN-2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	10
3.1. Materyal	10
3.1.1. Bitkisel materyal	10
3.1.2. <i>Pistacia lentiscus</i> L.'un biyolojik özellikleri	10
3.2. Yöntem.....	11
3.2.1. Doku kültürü ön hazırlık uygulamaları.....	11
3.2.3. Doku kültürü uygulamaları	14
3.2.4. Sekonder metabolitler	15
3.2.5. Terpen yapıdaki bileşenlerin analizi	19
3.2.5. İstatistiksel analizler	21
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	22
4.1. Doku kültürü çalışmalarına ait sonuçlar ve tartışma	22
4.2. Ağır metal elisitasyonuna ait sonuçlar ve tartışma	22
4.2.1. Bakır nitrat (CuNO_3) elisitasyonuna ait sonuçlar	23
4.2.2. Kobalt klorür (CoCl_2) elisitasyonuna ait sonuçlar	25
4.2.3. Nikel nitrat (NiNO_3) elisitasyonuna ait sonuçlar	27
4.2.4. Kurşun nitrat (PbNO_3) elisitasyonuna ait sonuçlar	29
4.2.5. Gümüş nitrat (AgNO_3) elisitasyonuna ait sonuçlar	31
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	37
5.1 Sonuçlar	37
5.2 .Öneriler	39
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
2,4-D	: 2,4 Diklorofenoksi asetik asit
2iP	: 2-izopentiladenin
AgNO ₃	: Gümüş nitrat
CuNO ₃	: Bakır nitrat
BAP	: Benzil amino pürin
BBD	: Bitki büyüme düzenleyicileri
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
CaCl ₂ .2H ₂ O	: Kalsiyum klorür dihidrat
CdCl ₂	: Kadmiyum klorür
CdSO ₄	: Kadmiyum sülfat
CHN	: Kitosan oligomerleri
cm	: Santimetre
CoCl ₂	: Kobalt klorür
CoCl ₂ .6H ₂ O	: Kobalt klorür hegzahidrat
CuSO ₄	: Bakır sülfat
CuSO ₄ .5H ₂ O	: Bakır sülfat pentahidrat
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiriboz nükleik asit
FeSO ₄	: Demir sülfat
Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	: Demir sülfat heptahidrat
g/l	: Gram/litre
GA ₃	: Gibberellik asit
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
gr	: Gram
H ₃ BO ₃	: Borik asit
HCl	: Hidrojen klorür
IAA	: Indol asetik asit
IBA	: İndol bütirik asit
IPP	: İzopentil pirofosfat
JA	: Jasmonik asit
kg	: Kilogram
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
KI	: Potasyum iyodür
Kin	: Kinetin
KNO ₃	: Potasyum nitrat
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografisi-Kütle spektrometresi
Lux	: Lüks
m ² s ⁻¹	: metre ² /saniye
MeJA	: Metil jasmonat
mg	: Miligram
mg/l	: Miligram/litre
MgSO ₄ .4H ₂ O	: Magnezyum sülfat tetrahidrat
MgSO ₄ .7H ₂ O	: Magnezyum sülfat heptahidrat
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MnSO ₄ .4H ₂ O	: Mangan sülfat tetrahidrat
MS	: Murashige ve Skoog

Na ₂ EDTA	: Sodyum etilen diamin tetra asetik asit
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	: Sodyum molibdat dihidrat
NAA	: Naftalen asetik asit
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
NaOH	: Sodyum hidroksit
NH ₄ NO	: Amonyum nitrat
NO	: Nitrik oksit
PAL	: Fenilalanin amonyum liyaz
pH	: Hidrojen iyon konsantrasyonu
RA	: Rosmarinik asit
rpm	: Rotate per minute (dakikadaki dönüş sayısı)
s	: Saat
Sn	: Saniye
TDZ	: Thidiazuron
UHPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
UV	: Ultraviyole
ZnSO ₄ .7H ₂ O	: Çinko sülfat heptahidrat
µM	: Mikromolar

1. GİRİŞ

Pistacia cinsi, Anacardiaceae familyasına ait olup, yaklaşık 70 cins ve 600'den fazla türün oluşturduğu kozmopolit bir ailenin üyesidir. Bu cinsin üyeleri, herdem yeşil veya yaprak dökken, kserofit tipte, dioik ve reçine veren çalı veya ağaç formunda odunsu bitkiler olup 8-10 m boyunda büyüeyebilen ağaçlardır (Bozorgi ve ark., 2013). *Pistacia lentiscus* L. (Sakız ağacı), Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde doğal olarak yetişen *Pistacia* cinsinin 14 türünden birisidir (Onay ve ark., 2016). Akdeniz Bölgesi'nde, Portekiz, İspanya, Fransa, İtalya, Hırvatistan, Bosna Hersek, Sırbistan, Arnavutluk, Yunanistan, Kıbrıs, Türkiye, Suriye, Lübnan, Libya, Tunus, Cezayir ve Fas'ta bulunmaktadır. Deniz seviyesinden 200 m yükseltilere kadar çıkabilen bu bitkiye İstanbul Burgaz Ada, İzmir, Ankara İncesu, Kayseri, Muğla, Marmaris, Kuşadası, Datça, Antalya Kemer, İçel, Tarsus, Ulaş, Seyhan ve Hatay yörelerinde rastlanmıştır (Akdemir ve ark, 2013).

Günümüze kadar yapılan bir çok farmakolojik çalışmada, *Pistacia* türlerinin reçine, meyve, yaprak gibi farklı kısımlarında bulunan sekonder metabolitlerin geleneksel tıpta çok çeşitli amaçlar için (antifungal, antibakteriyal, antimikrobiyal, antienflamatuar, antihelicobacter pylori aktivitesi, antiatherogenik, antitumor, yara iyileştirici, karaciğer koruyucu, antiproliferatif, proapoptotik, tansiyon düşürücü ve antikanser gibi) kullanıldığı uzun zamandan beri bilinmektedir (Akdemir ve ark., 2015; Dimas ve ark., 2009) Özellikle sakız ağacının gövdesine atılan çiziklerle elde edilen reçineye mastik sakızı ismi verilmektedir. Bu sakızın günümüze kadar bilinen 60 farklı kullanım alanı mevcuttur (Onay ve ark.,2014) Sakız reçinesi, yapısında bulunan başta izomastikadienonik asit, majör ve minör komponentler sebebiyle Milattan önceki yıllardan beri pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Bilhassa Mısırlı ve Araplar tarafından; kuduz hastalığı, uyuz ve yılan ısırılmaları, mide yanmaları, balgam söktürücü olarak akciğer hastalıklarında çok kullanılmıştır. Mısır'da bazı maddelerle karıştırılarak mumya hazırlanmasında diş hastalıkları tedavisinde ve ağız kokusunu gidermek maksadıyla da yararlanılmıştır. Eski Yunanlılar ve Romalılar da sakızın drog etkisinden çokça faydalanmışlardır. Osmanlılarda da ilaç yapımında kullanılan bitkisel kökenli maddelerin içinde bulunmuştur (Boztok, 2007).

Ülkemizde sakız ağacı öncelikle İzmir'in Çeşme ve Karaburun ilçeleri başta olmak üzere Muğla ve Antalya'da da doğal olarak yetişmektedir ve bu bölgelerde yetiştiriciliğinin yapılabileceği alanlar bulunmaktadır. Geniş kapsamlı kullanım alanına

sahip sekonder metabolitler bakımından zengin bu türün doğal koşullar altında elde edilmesi sırasında çeşitli zorluklarla karşılaşmaktadır. Örneğin sakız ağacının çeşit özelliklerini kaybetmeden doğrudan tohumla çoğaltımı uygun değildir. Çünkü tohumla çoğaltmada standart çeşitlerin üstün özelliklerinin sonraki nesillerde kaybolmasına ya da bozulmasına ve dolayısıyla kalıtsal yapının bozulmasına neden olmaktadır. Sakız ağaçlarının vejetatif çoğaltılmasında farklı yöntemler kullanılmakla birlikte en yaygın olanı çelikle çoğaltmaktır. Ancak, bu yöntemle hem köklenme uzun sürmekte, hem de başarı oranı düştüğünden vejetatif çoğaltma yöntemlerinin biyoteknolojik teknikler ile desteklenmesi gerekmektedir.

In vitro bitki doku kültürü teknikleri, diğer üretim yöntemlerinden farklı olarak kontrollü çevresel koşullarda, belirli bir steril besi ortamında, aseptik olarak izole edilen hücre, protoplast, doku ve organların kültürlerini kapsayan; organogenezis, somatik embriyogenezis ve genetik transformasyon aracılığı ile önemli bitkilerin korunması için kullanılan bir teknolojidir. In vitro teknikler kullanılarak hastalık ve virüsten arındırılmış tek bir ana stok bitkiden, genetik olarak özdeş bitkilerin çok büyük miktarlarda üretimi sağlanabilmektedir. Ayrıca çoğaltılması zor olan türlerin üretilmesi, kaybolmakta olan türlerin korunması, genetik iyileştirme çalışmaları ve bitki sekonder metabolitlerinin üretilmesi gibi pek çok alanda çeşitli doku kültürü teknikleri rutin olarak kullanılmaktadır (Yamaner, 2011). Sekonder metabolitler, bitki savunma mekanizmasında stres ortamına uyum, koruyucu ve caydırıcı özelliklerinin yanısıra polinizasyon ve allelopati gibi önemli işlevlere sahip olmanın yanında insan sağlığı açısından da birtakım biyolojik aktivite ve koruyucu işlevlere (antimikrobiyal, antifungal, anti-kanser, anti-inflamatuar, anti-aterojenik, anti-tümör, yara iyileştirici, karaciğer koruyucu, anti-proliferatif, proapoptotik ve anti-hipertansif aktivite) sahip organik bileşiklerdir.

Sekonder metabolitlerin biyoteknolojik yöntemlerle üretmenin avantajlı olduğunu bildiren çok sayıda yayın bulunmaktadır. Bu avantajlar kısaca şu şekilde özetlenebilir: 1) Sekonder metabolitler in vitro şartlarda mevsimsel ve edafik şartlarından etkilenmeden üretilmektedir. 2) Doku kültürü teknikleri steril ortamlarda uygulandığından bitkiler kontaminasyondan uzaklaştırılmaktadır. 3) Tropik veya subtropik bitkiler gibi farklı coğrafyalarda yetişen bitkiler de dahil olmak üzere herhangi bir bitkinin aksenik kısımları çoğaltılarak bu bitkiler özgü metabolitler üretilmektedir. 4) Biyoteknolojik yöntemler sekonder metabolitlerin, elisitör ve öncül bileşiklerin kullanılmasıyla artırılmasını ve buna bağlı olarak iş gücü maliyeti

azaltabilmektedir. 5) Fitokimyasallar sürgün, kallus ve süspansiyon kültürlerinden elde edilebilmektedir. 6) Ana bitkide normal şartlarda üretilmeyen yeni metabolitlerin sentezine olanak sağlamaktadır.

Biyoteknolojik yöntemler sekonder metabolitlerin hem miktarı ve kalitesini artırıp iş gücü ve maliyeti azaltacak stratejiler geliştirilmiştir. Sürgün kültürleri diğer farklılaşmış ve organize olmuş kültürler gibi (kök kültürleri, embriyo kültürleri gibi) sekonder metabolit üretiminde yüksek kapasiteye sahip benzer özellikleri gösterirler. Hatta sürgün kültürlerinde farklılaşmamış kültürlere, yani kallus ve hücre süspansiyon kültürlerine kıyasla metabolit üretimi daha yüksek düzeyde olmakta, bazen üretilen madde miktarı ana bitkininkinden daha fazla olabilmektedir (Erkoyuncu ve Yorgancılar 2015). Sürgün kültürlerinin yanı sıra sekonder metabolit üretimini artırmak, yüksek konsantrasyonlarda üretimi kısa sürede sağlamak amacıyla biyotik ve abiyotik elisitörler kullanılır. Sekonder metabolitlerin üretiminin artırılması için özellikle öncül maddeler ile elisitörlerin bir arada kullanılması etkili bir strateji olarak değerlendirilmektedir (Ramachandra Rao ve Ravishankar, 2002; Vanisree ve ark., 2004; Vijaya ve ark., 2010; Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015). Nitekim elisitör adı verilen bazı stres yapıcı faktörler uygulandığında sekonder metabolitleri fazla miktarlarda üretmeyen bitki kısımlarından daha yüksek miktarlarda üretimin gerçekleştirilebileceği görülmektedir. Sekonder metabolitler, bitkinin yetiştirme koşullarına çok sıkı bir bağlılık gösterir ve ilgili doğal ürünlerin birikmesinden sorumlu olan metabolik yollar üzerinde etkilidir. Kuraklık, tuz, ağır metal stresi gibi abiyotik streslere maruz kalma, bitkilerde birçok yaygın reaksiyonlara neden olur.

Sekonder metabolitin üretim yollarının aydınlatılması ile bu yolda rol oynayan başlangıç veya ara ürünlerin kültür ortamına katılması metabolit üretimini artırabilmektedir (Ramachandra Rao ve Ravishankar, 2002). Bu amaçla günümüzde, ağır metal, tuz, UV ışını, jasmonik asit, ozon, etilen, sakkaroz ve kitosan uygulamaları gibi pek çok uygulama kullanılmaktadır.

Abiyotik bir elisitör olarak kullanılan ağır metaller, yoğunluğu 5 gramın üzerinde olan çinko [$Zn (7.1g/cm^3)$], krom [$Cr (7.2g/cm^3)$], kadmiyum [$Cd (8.6g/cm^3)$], nikel [$Ni (8.7g/cm^3)$], bakır [$Cu (8.9g/cm^3)$], kurşun [$Pb (11.4g/cm^3)$], civa [$Hg (13.5g/cm^3)$] gibi metaller olarak tanımlanırlar. Bununla beraber alüminyum [$Al (2.75g/cm^3)$] gibi hafif metallerde benzer etkileri gösterirler. Metallerin bazıları [Cu (bakır), Zn (çinko), Fe (demir), Mn (manganez), Mo (molibden), Ni (nikel), Co (kobalt)] bitki ve hayvanların gelişmesi için gerekli mikro besin elementleridir (Ayhan

ve ark., 2006). Bu bağlamda düşük konsantrasyonlarda Cu^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} ve Fe^{+2} gibi metal iyonları redoksta yer alan, çeşitli enzimlerin yapısal konfigürasyonuna ve nükleik asitlerin metabolizmasına katılır. Özellikle çinko ve bakır, biyolojik sistemlerde çok çeşitli metabolik ve gelişimsel yollarda kofaktör veya protestetik gruplar gibi enzimlerin bir parçası olarak iş görürler. Ancak yüksek konsantrasyonlarda, bitki doku ve organlarda aşırı birikiminin yanında büyüme ve gelişme, mineral besin alımı, transpirasyon, fotosentez, enzim aktivitesi, klorofil biyosentezi ve çimlenme gibi çok sayıda morfolojik ve fizyolojik olayı olumsuz yönde etkileyerek büyümenin inhibisyonuna, metabolizmanın bozulmasına ve hatta organizmanın ölmüne dahi neden olabilmektedir (Kıran ve ark., 2014).

Yapılan literatür incelemelerinde günümüze kadar ticari, tıbbi, kozmetik ve gıda katkı maddesi gibi pek çok sektörde hammadde kaynağı olarak kullanılan değerli sekonder metabolitleri bünyesinde barındıran *Pistacia* cinsine ait türlerde sekonder metabolitlerin arttırılması ile ilgili yapılmış herhangi elisitasyon çalışmasına rastlanmamıştır. Bu çalışmada, *Pistacia lentiscus* L.'un sürgün kültürlerinde çeşitli tip ve konsantrasyonlarda ağır metal elisitasyonu ile antikanser özellik gösteren triterpen yapısındaki sekonder metabolitlerin üretimini arttırılması ve uygulanan ağır metal stresinin sürgünlerin büyümesi üzerindeki etkisi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bu tez kapsamında *Pistacia* cinsine ait türlerde yapılmış herhangi bir elisitasyon çalışmasına henüz rastlanmadığından tez konusu ile ilgili olarak diğer bitkilerin sürgün veya kallus ve süspansiyon kültürleri üzerinde denenmiş ağır metal elisitasyonu çalışmalarına yer verilmiştir.

Maitani ve ark., (1996) *Rubia tinctorum* L. bitkisinde kök kültürlerinde fitoşelatin ve deglisil peptitleri üretimi üzerine çeşitli metal (Ag^{+2} , As^{+3} , As^{+5} , Cd^{+2} , Cu^{+2} , Ga^{+3} , Hg^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} , Pd^{+2} , Se^{+2} ve Zn^{+2}) ve metal kompozisyonlarının etkilerini araştırdıkları çalışmalarında tüm metallerin fitoşelatinlerin üretimini çeşitli seviyelerde uyardığını ve diglisil peptitlerin oluşumunu sağladığını tespit etmişlerdir. Özellikle Ag^{+2} uygulamasından sonra Fe-metalotiyoninlerin pik yaptığını ancak metallerin çoğunun metalotiyoninlere bağlanmadığını tespit etmişlerdir.

Tumova ve Ruscova (1998) $CuSO_4$ ve $CdCl_2$ gibi abiyotik stres faktörlerinin *Ononis arvensis*'in kallus kültürlerinde 24, 48 ve 168 saat sonrasındaki flavonoid oluşumu üzerine etkisini araştırılmıştır. Kültürlere 0.5 mg/l^{-1} ve 0.05 mg/l^{-1} oranındaki $CdCl_2$ uygulamasından 24 ve 48 saat sonra, 0.5 mg/l^{-1} oranındaki $CuSO_4$ uygulamasından ise hem 48 hem de 168 saat sonra flavonoid üretiminde artışlar meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ancak en yüksek flavonoid artışının (%67) 0.005 mg/l^{-1} oranındaki $CdCl_2$ uygulamasından elde edildiğini ve kültür başlangıcından 48 sonra oluştuğunu rapor etmişlerdir.

Sandra ve ark., (2000) *Brugmansia candida*'nın saçak kök kültürlerinde skopolamin ve hiyosyamin tropan alkaloidleri üzerine çeşitli biyotik ve abiyotik elisitörlerin etkisini (Salisilik asit, $AgNO_3$, $CaCl_2$, $CdCl_2$ ve maya ekstraktı) test etmişlerdir. Salisilik asidin, her iki alkaloidin üretimini önemli ölçüde artırdığını (2-12 kat), $AgNO_3$ 'ün skopolamin üretimini 3 kat, maya ekstraktının ise alkaloidlerin üretimini yaklaşık 3 kat arttırdığını ancak skopolamin üretimini ise 7 kat arttırdığını bildirmişlerdir. $CaCl_2$ 'ün alkaloid birikimi veya salınımı üzerinde çok az etkiye sahip olduğunu, $CdCl_2$ 'ün ise alkaloidlerin üretimini 3-24 kat arttırdığını rapor etmişlerdir.

Saba ve ark., (2000) yaptıkları çalışmada *Epidyum sativum* bitkisinin hem in vitro hem in vivo bitkilerinin olgun ve juvenil eksplantlarında önemli miktarda lepidin bulunduğunu ve bu miktarın eksplant tipine ve kaynağına bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Eksplantlar arasında maksimum lepidin seviyesinin, 8 hafta sonra 2 mg/dm^{-3} NAA ve 5 mg/dm^{-3} BAP destekli MS besi ortamında kültüre alınan

kallusların sürgün uçlarından elde edildiğini ve 900 μM Zn^{+2} veya 100 μM Cu^{+2} uygulamasının ise lepidin seviyesini artırdığını rapor etmişlerdir.

Vasconsuelo ve ark., (2003) *Rubia tinctorum* L. bitkisinde kitosanın (elisitör) antarakinon üretimi üzerindeki sinyal mekanizmasını araştırmışlardır. Kitosanın, *Rubia tinctorum*'da antrakinin sentezini % 100'e yakın seviyede önemli derecede uyardığını, fosfolipaz C, Ca^{+2} ve protein kinaz C'nin inhibisyonunun ise, kitosanın aktivasyonunu büyük oranda düşürdüğünü, sonuç olarak *Rubia tinctorum* L. bitkisine kitosan uygulamasının antrokinon üretimini artırmasında fosfolipaz C, Ca^{+2} ve protein kinaz C'nin önemli rolü olduğunu belirtmişlerdir.

Yaoya ve ark., (2004) yaptıkları çalışmada *Pharbitis nil*'in CuSO_4 ve metil jasmonat (MeJA) ile muamele ettikleri saçak kök kültürlerinde umbelliferon, skopoletin, skimmin ürettiğini, CuSO_4 uygulamasından 16 saat sonra umbelliferon üretiminin maksimum düzeye ulaştığını, diğer bileşiklerin üretiminin ise azaldığını ve tüm bileşikler için minimum seviyenin uygulamadan 8 saat sonra oluştuğunu bildirmişlerdir.

Wu ve ark., (2007) bir sinyal molekülü olarak önemli rol oynayan nitrik oksidin *Echinacea purpurea*'nın adventif köklerinde sekonder metabolit üretimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Kökleri, bir eksojen nitrik oksit üreticisi olan 100 μM sodyum nitroprusit (SNP) ile muamele ettiklerinde, fenolik, flavonoid ve kafeik asit türevlerinin birikiminin arttığını bunun yanı sıra süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz gibi enzimlerde ise artış olduğunu ve hidrojen peroksit, lipid peroksidasyonu ve dehidroaskorbat/askorbik asit seviyesinde ise azalma gözlediklerini rapor etmişlerdir.

Xiao ve ark., (2010) Lamiaceae familyasının bir üyesi olan *Salvia miltiorrhiza*'nın saçak kök kültürlerinde abiyotik bir elisitör olan gümüş iyonlarının (Ag^+ : 15 μM), litospermik asit B (LAB) ve rosmarinik asit (RA)'in birikimi üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, abiyotik bir elisitör uygulamasının RA birikimini uyarmadığını, ancak LAB'yi %5.4'ten yaklaşık olarak % 18.8'e kadar arttırdığını bildirmişlerdir.

Aziz ve ark., (2011) Kitosan oligomerleri (CHN 1,5/20) ve bakır sülfat uygulamalarının, üzümde gri ve tüylü küflere karşı savunma mekanizmasını uyarması üzerine yaptıkları araştırmada, en yüksek fitoaleksinin üretimini %20 deasetilasyon derecesine sahip 1500 Da molekül ağırlığında 200 $\mu\text{g/ml}$ kitosan içeren besi ortamında 48 saatlik inkübasyon sonunda elde ettiklerini, üzüm yapraklarında kitosan uygulamasının, kitinaz ve beta-1,3-glukanaz aktivitesinin belirgin bir şekilde indüklenmesine yol açtığını, kitosanın bakır sülfat ile birlikte uygulanmasının şiddetli bir şekilde fitoaleksinin birikimini uyardığını belirtmişlerdir. Bakır sülfatın özellikle

düşük konsantrasyonlarda tek başına kullanımının dahi asma yapraklarında önemli seviyede fitoaleksinin üretimine yol açtığını ve sonuç olarak asma yapraklarında bakır sülfat ve kitosan uygulamalarının küflerin meydana getirdiği enfeksiyona karşı koruma sağladığını rapor etmişlerdir.

Acharya ve ark., (2011) *Rapidos sativus* L.'da araşidonik asit, bakır klorür, kitosan, izonikotik asit ve salisilik asit gibi abiyotik elisitörleri bitkinin yapraklarına püskürttükten 24 saat sonra, nitrik oksit (NO), b-1,3 glukanaz, peroksidaz, polifenol oksidaz ve fenoliklerde önemli bir artış olduğunu bildirmişlerdir.

Garófalo Chaves ve ark., (2011) farklı konsantrasyonlarda Cd, Cu ve Zn'nun in vivo yetiştirilen ayçiçeği bitkisinin büyümesi üzerine yaptıkları çalışmada, ekimden 50 gün sonra hasat edilen bitkilerde Cd ve Zn'nin yüksek konsantrasyonda ayçiçeği bitkisinin bitki boyunu azalttığı, yüksek Zn konsantrasyonlarının yaprak alanında önemli bir düşüşe yol açtığı, ağır metal uygulamasının kuru madde üzerinde önemli bir etkisi olmadığı, ancak bu elementlerin gövde, yaprak ve köklerde birikimi üzerine önemli derecede etkisi olduğu bildirilmiştir.

Yıldırım (2012) *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae), sürgün kültürlerini oluşturmak amacıyla öncelikle aseptik şartlarda çimlendirdiği tohumlardan elde ettiği sürgünlerin gelişimi üzerine farklı BA konsantrasyonları, sitokinin ve diğer büyüme düzenleyicileri, ortam ve antioksidanların etkisini araştırmıştır. Çalışma sonucunda, 1 mg^l⁻¹ BA ve 7 gl⁻¹ agar içeren tam kuvvetteki MS ortamını, en yüksek proliferasyon oluşturan ortam olarak seçmiştir. Ayrıca, % 92 ile en yüksek köklenme oranının, 1 mg^l⁻¹ IBA içeren besi ortamında elde ettiğini rapor etmiştir.

Yamaner ve ark., (2013) endemik ve tıbbi bitki olarak potansiyel önemi olan *Hypericum adenotrichum* Spach'un in vitro fidelerine elisitör olarak Krom (Cr) uygulanması ile hiperisinlerin (hiperisin ve pseudohiperisin) ve bazı flavonoidlerin (hiperosid ve izokuersitrin) miktarlarındaki değişimlerini araştırdıkları çalışmada *H. adenotrichum* in vitro şartlarda 0.01 ve 0.1 mM Cr konsantrasyonlarına 15 ve 30 gün boyunca maruz bırakılmıştır. 15 günlük 0.01 mM krom uygulamalarında hiperosid ve izokuersitrin miktarlarının sırasıyla 1.7 ve 1.8 kat artış gösterdiğini, 30 günlük 0.01 mM krom uygulamalarında önemli bir değişiklik olmadığını, hem 15 hem de 30 günlük 0.1 mM krom uygulamalarında flavonoid miktarlarının önemli ölçüde düştüğünü, 15 günlük 0.01 mM krom uygulamasında pseudohiperisin miktarının 2.2 kat ile hiperisin miktarının 1.7 kat arttırdığını ve son olarak 30 günlük krom uygulamalarında hiperisinlerin üretiminde önemli bir değişikliğe yol açmadığını bildirmişlerdir.

Batır, (2014) in vitro şartlarda çimlenmeye bıraktığı enginar tohumlarını kurşun ve bakır metal çözeltilerinin 20, 40, 80, 160, 240, 320, 640, 1280 ppm konsantrasyonları ile 14 gün süre ile sulamıştır. 20, 40, 80, 160, 240, 320, 640, 1280 ppm'lik kurşun ve 20, 40, 80, 160, 240, 320 ppm'lik bakır çözeltileri ile sulanan enginar tohumlarında çimlenme gözlenirken, 640 ve 1280 ppm bakır çözeltileri ile sulanan enginar tohumlarında aşırı metal stresi sonucu çimlenme oluşmadığı belirtilmiştir. Ayrıca kurşun ve bakır konsantrasyonunun artışına bağlı olarak enginar fidelerinin kök uzunluğu önemli derecede düşüş kaydetmiştir.

Koç ve İşlek., (2015) yaptıkları çalışmada biber (*Capsicum annuum* L.) fidelerinde fenilalanin amonyum liyaz (PAL) aktivitesi ve lipid peroksidasyonu miktarına kadmiyum ($CdCl_2$)'un farklı konsantrasyonlarının (20, 40, 80 ve 100 μM $CdCl_2$) etkisini incelemiştir. $CdCl_2$ stresine maruz bırakılan Kahramanmaraş (KM)-acı biber çeşidine ait fidelerde, fenilpropanoid biyosentetik yolun ilk enzimi olan PAL'ın aktivitesinde 2 ve 4. günde artış tespit etmişler, uygulamanın 4. gününde KM-acı biber yapraklarında en yüksek PAL aktivitesini 20 μM $CdCl_2$ uygulamasından elde ettiklerini ayrıca, Cd uygulamasının yaprak ve gövde dokularında lipid peroksidasyon (MDA içeriği) miktarını artırdığını ve en yüksek MDA içeriğinin ise uygulamanın 4. gününde yaprakta ve 80 μM $CdCl_2$ uygulamasında oluştuğunu rapor etmişlerdir.

Sharma ve ark., (2015) in vitro şartlarda *Bacopa monnieri*'nin sürgün kültürlerinde farklı konsantrasyonlarda $CuSO_4$ elisitasyonunun biyokütle ve bacoside üretimi üzerine yaptıkları çalışmada 45 mg/l $CuSO_4$ uygulamasının en yüksek bacoside A (8.73 mg/g) oluşturduğu ve kontrol grubuna oranla (6.14 mg/gr) 1.42 kat daha fazla üretildiği belirtilmiştir.

Kılınc ve ark., (2015) *Pistacia lentiscus* L.'un seçilmiş genotiplerinden klonal mikroçoğaltım için etkin bir protocol geliştirmek amacıyla in vitro fidelerden köken alan eksplantlar kullanmışlardır. BA içeren besiyerlerinde optimum sürgün sayısı ve uzunluğu ancak en yüksek sürgün uzunluğunu, 2iP varlığında elde etmişlerdir. 19.6 μM IBA içeren besi ortamında en iyi kök oluşumunu (% 94.15) rapor etmişlerdir.

Amin Al-Gendy ve ark., (2016) *Artemisia monosperma*'nın sürgünlerini, 1 mg/L NAA ve 1 mg/L Kin içeren MS besin ortamında kültüre alarak kallus oluşturmuşlardır. Elde edilen kallusları, 2 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L Kin ile farklı elisitörler içeren (maya ekstraktı, CaCl ve *Fusarium oxysporum* mantarı), MS besi ortamında bekleterek total flavonoidler ve fenolik bileşikler üzerine etkisini incelemiştir. 10 mg/L maya ekstraktı ve *Fusarium oxysporum* mantarı uygulamasının alt kültürlenmeden sonraki 24

saatte ve 0.4 mg/L CaCl₂ uygulamasının ise alt kültürlemenin 28. gününde en yüksek flavonoid oluşumuna yol açtığını belirtmişlerdir.

Çetin ve Baydar (2016), *Vitis vinifera* L. 'ya ait Kalecik Karası ve Öküzgözü kültivarlarının hücre süspansiyon kültürlerinde fenolik bileşiklerin üretimi üzerine 0,1 ve 1.5 mg/L bir ağır metal olan kadmiyum sülfat (CdSO₄), 0 ve 10 µM metil jasmonat (MeJA) ve 0, 0.20 ve 0.25 M sakaroz uygulamalarının etkilerini araştırmışlardır. 1.5 mg/l CdSO₄ ve 1.0 mg/l MeJA uygulamasının iki kültivarlarda da en yüksek fenolik üretime, özellikle Kalecik Karası çeşidinde 1.5 mg/L CdSO₄ uygulamasının en yüksek toplam fenolik (3.144 mg g⁻¹), antosiyanin (1.672 CV g⁻¹) ve trans-resveratrol (3.650 µg g⁻¹) oluşumuna, 10 µM'de MeJA uygulamasının Öküzgözü çeşidinde en yüksek transresveratrol birikimine (11.681 µg g⁻¹) ve 0.20 M sukroz uygulamasının ise Kalecik Karası çeşidinde en yüksek toplam fenolik (4.215 mg g⁻¹) ve trans-resveratrol (7.550 µg g⁻¹) ile en çok antosiyanin oluşumuna yol açtığını bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkisel materyal

Bu çalışmada, materyal kaynağı olarak, İzmir'in Çeşme ilçesinde bulunan Çiftlikköy beldesi civarında doğal olarak yetişen dişi sakız ağaçlarından elde edilen olgun tohumlar kullanılmıştır. Tohumlar kuru plastik kaplar içinde laboratuvara getirilerek kültüre alınana kadar +4°C' ta buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.1.2. *Pistacia lentiscus* L.'un biyolojik özellikleri

P. lentiscus L., genç dönemde kazık kök ve bir çok yan kök ile karakteristiktir. Genellikle çalı veya ağaççık formunda gelişen, 1-3 m'ye kadar boylanabilen hatta bazen 6 m yüksekliğinde olabilen bir bitkidir (Şekil 3.1 A, B). Doğal sakız ağacının gövdesi düz değildir. Gençken açık gri renkte, ileri yaşlarında kül karası rengindedir. Çiçekleri küçük, kırmızımsıdır ve çiçek salkımı halinde kümelenmiştir. Erkek çiçekler 1-2.5 cm uzunlukta bileşik salkımlar, dişi çiçekler ise 1-3 cm uzunlukta seyrek dallanmış salkımlar halindedir. Çiçeklenme mart-nisan aylarında gerçekleşmekte ve çok sayıda çiçek üretimi söz konusu olmaktadır. Drupa tipi olan meyveler 4-7 mm çapında, yuvarlak-basık ve sivri uçlu, başlangıçta kırmızı, olgunlaştığında ise siyah renktedir. Etili-sulu bir mezokarp ile kemiksi bir endokarpa sahiptir. Meyveler ekim sonu ile aralık ayı ortasına kadar olgunlaşmaktadır. Yapraklar genellikle 2-4, nadiren de 5-7 çift yaprakçıktan oluşur. Yaprakları gövdeye bağlı dal üzerinde 2-12 adet dikdörtgen, mızraksı veya oval biçimindedir. Yaprakçıklar yumurtamsı, mızrak, eliptik, küt veya dikenimsi uçlu gibi formlar gösterir ve tüsüzdür. Yaprakçık uçları genelde keskin bir noktayla sonlanır (Akdemir ve ark., 2013).



Şekil 3.1. *Pistacia lentiscus* L. bitkisinin (A) ve tohumlarının genel görünümü (B)

Sakız ağacı sıcak ve kurak Akdeniz ikliminde, deniz kıyılarında; sıg, taşlı, kayalık ve fakir topraklar üzerinde gelişebilir; kireç, deniz suyu ve rüzgâra dayanıklıdır. Kışın çok düşük, yazında yüksek sıcaklıklar sakız verimine olumsuz etki yapar. Aşırı kuraklıktan olumsuz etkilenir. Toprakta derinlere inen köklerle diğer *Pistacia* türleriyle, incir ve zeytin ağaçlarına göre kuraklığa ve tuzluluğa daha dayanıklıdır. Kireçli taşlı topraklar başta olmak üzere, hemen her türlü toprakta yetişebilir. Deniz kıyılarında tuzlu suya toleransı iyidir. Yetiştirildiği yerler itibariyle sakız ağacı kimi zaman kurak yamaçlarda maki bitkileriyle bir arada görülürken, kimi zaman nadiren de olsa kızılçam ormanlarının altlarında bulunur. Deniz seviyesinden yüksekliği 0 - 500 m arasında olan bölgelerde yayılış gösterir. (Onay ve ark., 2016) Sakız adası'nda sakız yetiştiriciliği ve sakızdan ürün geliştirilmesi için binlerce istihdam yaratılmış ve her yıl milyonlar lira, ada ekonomisine kazandırılmaktadır. Sakız adasında üretilen ham sakızın yaklaşık % 70'i dış ülkelere pazarlanmaktadır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Doku kültürü ön hazırlık uygulamaları

3.2.1.1. Sterilizasyon işlemleri ve besi ortamlarının hazırlanması

In vitro çalışmalarda, çalışılan laboratuvar, kullanılan tüm ekipmanlar ile birlikte cam malzemelerin steril olması kontaminasyon riskini azalttığı ve başarılı sonuçlar elde etmede büyük önem taşıdığından çalışma öncesinde ekipmanların özelliklerine göre steril edilmeleri sağlandı.

Transfer odasına girilmeden 1 gün önce; steril kabin içi ve dış yüzeyi %96'lık alkol ile temizlenerek, odanın kapı, raf, taban vs. gibi yerler seyreltilmiş NaOCI ile temizlendikten sonra zaman ayarlı ultraviyole lambası açılarak gece 2-3 saat çalışması sağlanarak odanın genel sterilizasyonu tamamlandı. Cam malzemeler (erlenmayer, cam şişe, mezür, balon joje, pipet vb.) sadece sıcak su kullanılarak fırça yardımıyla temizlendi. Daha sonra üç defa saf sudan geçirilerek 180°C'de etüvde 3 saat bekletilmek suretiyle steril edildi. Pens ve bisturiler ise %96'lık etil alkol ile temizlendikten sonra boncuklu sterilizatörde (Steri 350 swiss made) 10 dk süre ile 250°C'de sterilize edildi. Magenta GA-7 kültür kapları ise, 121°C'de, 1 atm. basınç altında, 25 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir. Distile sular 121°C'de 15 psi basınç altında 3 saat boyunca etüvde bekletilerek sterilize edildi.

Büyüme odası 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ yoğunluktaki ışık şiddetine sahip olup, ortam sıcaklığını 25 ± 2 °C'de sabit tutan bir sıcaklık kontrol sistemi (klima ve termostat)

bulunmaktadır. Fotoperiyot; bir zaman ayarlayıcı ile 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak biçimde ayarlanmış ve beyaz flüoresan ampuller kullanıldı. Besin ortamları hazırlanırken önceden oluşturulmuş stok çözeltilerden 1 litre için gerekli miktarlar alınarak behere aktarılmış, sonra gerekli bitki büyüme düzenleyici miktarları ilave edildi. Ortama 30 g sükröz eklenip, hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı. Sükröz iyice eritildikten sonra ortamın pH'sı seyreltilmiş NaOH (sodyum hidroksit) veya HCl (hidrojen klorür) kullanılarak 5.8'e ayarlanmıştır. 6.4 gr agar ilave edildikten kültür kaplarına yaklaşık 20'şer ml olmak üzere döküldü. Ağızları kapatılan kültür kapları, otoklavda 121°C'de 15 dk. otoklava bırakılarak sterilize edildi.

3.2.1.2. Bitki büyüme düzenleyicilerinin stok çözeltilerinin hazırlanması

Bitki büyüme düzenleyicilerine (BAP-IBA) ait stok çözeltilerin hazırlanması için, ihtiyaç duyulan miktarlar tartıldı. Stok çözeltiler genellikle mg/ml konsantrasyonlarında hazırlandı. Tartımdan sonra 50 ya da 100 ml steril balon jöjelere aktarıldı. Her madde 5-10 ml kadar 1 M HCl (BAP) içinde küçük magnetik karıştırıcılarla birlikte çözdürüldü. IBA ise 5-10 ml'lik alkolde eritildi. Eritilen BBD steril saf suyla 50 ml ya da 100 ml'ye tamamlandı ve homojenize edildi. Bazı bitki büyüme düzenleyicileri (IBA) sıcakta bozulacağı için filtre ile sterilize edildikten sonra besi ortamına ilave edildi. Büyüme maddelerine ait stok çözeltiler buzdolabında 4°C'de saklandı ve rutin bir şekilde, kullanım yoğunluğuna bağlı olarak uygun periyotlarla taze olarak hazırlandı.

3.2.1.3 Kullanılan besi ortamı içeriği

Çalışmalarımızda besi ortamı olarak; temel MS (Murashige ve Skoog, 1962) besi ortamı modifiye edilerek kullanılmıştır. Besi ortamı 6.4 g/L agar ile desteklenmiştir. Çalışmada, kullanılan besi ortamlarına ait stok çözeltilerin hazırlanması ve bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonları ve 1L MS besi ortamının hazırlanması ile ilgili bilgiler aşağıda verilmiştir (**Çizelge 3.1, 3.2 ve 3.3**).

Çizelge 3.1. MS besi ortamının hazırlanmasında kullanılan stok solüsyonlar ve miktarları

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

MS Mikro Elementler-1 Ana Solüsyonu	
H ₃ BO ₃	620 mg
MnSO ₄ .4H ₂ O	1695 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	860 mg
KI	83 mg
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂	25 mg
Steril saf su	1000 ml'ye tamamlanır.

MS Mikro Elementler-2 Ana Solüsyonu	
CuSO ₄ .5H ₂ O	25 mg
CoCl ₂ . 6H ₂ O	25 mg
Steril saf su	200 ml'ye tamamlanır.

Kompleks Kelatör Ana Solüsyonu	
FeSO ₄ .7H ₂ O	3.725 g
Na ₂ EDTA	2.785 g
Steril saf su	1000 ml'ye tamamlanır.

Vitamin Karışımı Ana Solüsyonu	
Nikotinik Asit	50 mg
Glisin	200 mg
Piridoksin HCl	50 mg
Steril saf su	100 ml'ye tamamlanır.

B1 Vitamini Ana Solüsyonu	
Tiamin HCl	10 mg
Steril saf su	100 ml'ye tamamlanır.

Myo-inositol	
myo-inositol	100 mg
Steril saf su	1000 ml'ye tamamlanır.

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

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

IBA (Indol-3 butirik asit) Ana Solüsyonu (10⁻³)	
IBA	100 mg
% 95 lik Etil Alkol	3-5 ml
Steril saf su	100 ml'ye tamamlanır.

GA₃ (Gibberelik asit) Ana Solüsyonu	
GA ₃	100 mg
3-5cc	%95'lik etil alkol
Steril saf su	100 ml'ye tamamlanır.

Çizelge 3.3. Standart MS besi ortam içeriği* (g^l)

Temel MS besi ortamının içeriği	
MS ana solüsyonu	100 ml
MS-1	10 ml
MS-2	1ml
Komplex kelatör	10 ml
Vitamin karışımı	1 ml
<i>myo</i> -inositol	10 ml
B1 vit. ana solüsyonu	1 ml
Agar	6.4 g
Sakkaroz	30 g
Steril saf su	1000 ml'ye tamamlanmıştır.

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

3.2.3. Doku kültürü uygulamaları

3.2.3.1. Eksplantların yüzey sterilizasyonu

Olgun tohumlar sert kabuklarından bir kırıcı yardımıyla ayrılarak, %20 lik Sodyum hipoklorit (NaOCl-ACE) içerisinde 20 dakika süresince çalkalandıktan sonra, 3 defa 5' er dakika steril distile suda çalkalanarak çamaşır suyundan arındırıldı (Kılınç ve ark., 2015).

3.2.3.2. Tohum çimlendirilmesi ve sürgünlerin proliferasyonu ve muhafazası

Yüzey sterilizasyonu tamamlanan tohumlar 1 mg/L IBA destekli MS besi ortamında çimlendirilerek (Onay ve ark., 2014), elde edilen aksenik gövdelerin çoğaltımı, 1mg/L BAP, 0.5 mg/L GA₃ ile destekli MS besi ortamında gerçekleştirildi (Kılınç ve ark., 2015). Özetlenecek olursa, juvenil sürgünlerin proliferasyonu için 1 mg/L BA, 50 mg/L valin, 30 g şeker ve 6.4 gr agar içeren MS besi ortamı temel proliferasyon ortamı olarak kullanılarak stok kültürler üretildi.

3.2.3.3. Ağır metal çözeltilerinin hazırlanması ve elisitasyonu

Ağır metal uygulamaları için, **ortalama 1 cm** uzunluğundaki aksenik sürgünler sırasıyla 1, 2 ve 4 mg/L olmak üzere 3 farklı oranda hazırlanan bakır nitrat, gümüş nitrat, nikel nitrat, kurşun nitrat ve kobalt klorür ağır metallerini ayrı ayrı içeren MS besi ortamında, 25±2 °C ve 16/8 saat ışık/karanlık fotoperiyodu uygulanan kontrollü bitki büyüme odasında ortalama 28 gün boyunca kültüre alındı. 28 günlük kültür periyodu sonrasında gelişen bitkicikler, oda sıcaklığında bekletildikten sonra kurutularak ve gövde ile yaprak kısımları ayrı şekilde triterpen analizleri için oda sıcaklığı koşullarında saklandı.

Farklı ağır metal ilave edilen besin ortamlarında inkübe edilen sürgünlerin proliferasyon çalışmalarında veriler kültürün 28. gününde toplam 30 eksplantın ortalamasından elde edilmiştir. Yapılan gözlemler ve alınan ölçümler şu şekildedir: Eksplant başına oluşan gövde sayısı, ortalama gövde uzunlukları ve gövde oluşturma kapasitesi (GOK) hesaplanmıştır. $GOK = \text{Gövde sayısı} / 100$.

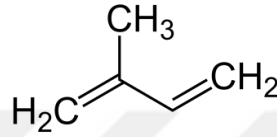
Ağır metaller dH_2O ' de 1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan stoklar 0.22 μm 'lık mikro filtreden geçirilerek steril edilmiş ve kullanıncaya kadar 4 °C'de saklanmıştır.

3.2.4. Sekonder metabolitler

İnsanoğlu yaşamını sürdürebilmesi için gereksindiği besinleri bitkilerden karşılar. Çünkü bitkiler; temel besin gereksinimlerini gidermek için gereken karbonhidrat, protein ve yağların, yani primer metabolitlerin kaynağını oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra bitkiler sekonder metabolit adı verilen, besin ve enerji sağlama gibi yaşamsal değer taşımamakla beraber, başta ilaç sanayi olmak üzere; kimya, besin, kozmetik ve zirai mücadele sektörlerinde ekonomik açıdan çok önemli ve yeri doldurulamaz fitokimyasal bileşikler de üretirler. Önceleri bu ürünler, bitkiler tarafından oluşturulan ve hiçbir işlevi olmayan atık maddeler olarak kabul edilmekteydi. Ancak daha sonra bu metabolitlerin; savunma, korunma, ortama uyum, hayatta kalma ve nesillerini sürdürmek için bitkiler tarafından geliştirilmiş oldukça karmaşık mekanizmaların ürünleri olduğu anlaşılmıştır. Kuraklık, tuzluluk, UV ışınları vs. gibi değişik çevresel etkenlerin oluşturduğu stres ortamına karşı koyma, herbivorlara (böcekler, sürüngenler vb.) karşı savunma, mikroorganizmalara (bakteriler, virüsler, mantarlar vb.) karşı savunma ve bazı metabolik ve daha gelişmiş ekolojik işlevler (polinizasyonu ve tohum dağılımını sağlamak için hayvanları ve diğer taşıyıcıları cezbettirme gibi) gibi bitkilerde önemli işlevlere sahiptir. Tarihle ilgili erişilebilen yazılı kaynaklarda, ilk insanların çeşitli hastalıkların tedavisi için bitkilerden yararlandıkları belirtilmektedir. Elbette bu kullanım biçimi etken madde olan sekonder üründen çok, bitkinin kendisine veya değişik yollarla elde edilen özütlerine dayanmaktadır. Bugün bile dünya nüfusunun çoğunluğu için bitkiler, ilaçların ham maddesi olarak kullanılmaktadır. Sekonder bileşiklerin başlıca çeşitleri; terpen veya terpenoidler, fenolik bileşikler ve azot içeren sekonder metabolitlerdir.

3.2.4.1. Terpenlerin sınıflandırılması

Terpenler veya terpenoidler sekonder bitki ürünlerinin en büyük sınıfıdır. Bu sınıfta bulunan farklı maddeler genellikle suda çözünmezler. Organik çözücülerde (eter, kloroform, benzen ve aseton) yüksek oranda çözünürler. Bitkilerin yaprak, meyve, çiçek gibi kısımlarında bulunabilirler. Biyosentetik orijinleri aynı olup, bütün terpenler izopren olarak adlandırılan 5 karbonlu birimlerden türevlenirler (Şekil 3.2). Terpenlerin çoğu hidrokarbonlardır; ancak alkoller, ketonlar veya aldehitler gibi oksijen içeren bileşiklerde olabilirler. Bu türevler çoğunlukla terpenoid olarak adlandırılan bileşikleri oluşturur.

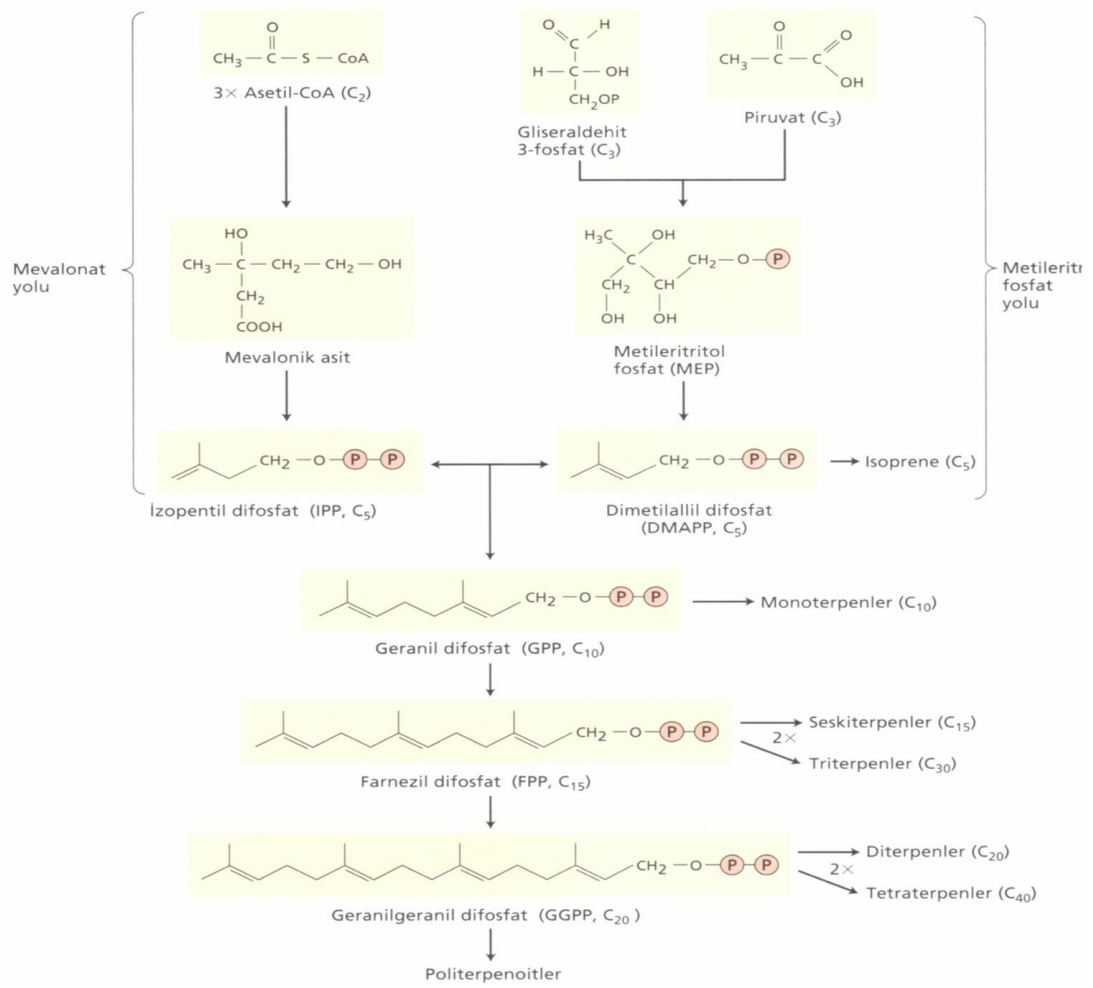


Şekil 3.2. 5 C'lu izopren birimi

İçerdikleri izopren sayısına göre monoterpenler (10 C'lu), seskiterpenler (15 C'lu), diterpenler (20 C'lu), triterpenler (30 C'lu), karotenoidler (40 C'lu) ve politerpenler (>40 C'lu) şeklinde sınıflandırılırlar.

3.2.4.2. Terpenlerin biyosentezi

Terpenlerin biyosentezi, yüksek bitkilerde mevalonik asit yoluyla Asetil Co-A'dan, ilkel bitkilerde ise, metileritrotriol fosfat yoluyla meydana gelir (Şekil 3.3). Bu yolda Asetil Co-A'nın 3 molekülü 6 karbonlu mevalonik asidi oluşturmak için kademeli bir şekilde birbirine bağlanır. Mevalonik asit önce pirofosforillenir, sonra izopentil pirofosfatı (IPP) meydana getirmek için dekarboksile ve dehidre olur. İzopentil pirofosfat, geranil pirofosfatı oluşturmak için birbirleriyle reaksiyona girer ve hemen hemen bütün monoterpenlerin 10 karbonlu başlangıç maddesi oluşturulur. Geranil pirofosfat diğer bir izopentil pirofosfata bağlanarak farnesil pirofosfatı (15C) meydana getirir. Farnesil pirofosfat da başka bir izopentil pirofosfata bağlanarak geranil geranil difosfatı (20C) oluşturur. 2 geranil geranil difosfat bir araya gelerek tetraterpenleri (40C) meydana getirir.

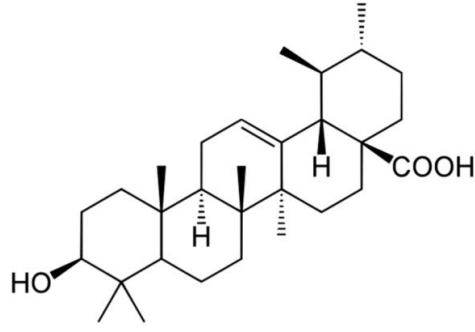


Şekil 3.3. Terpen yapıdaki bileşiklerin sentez yolu (Taiz ve Zeiger, 2008)

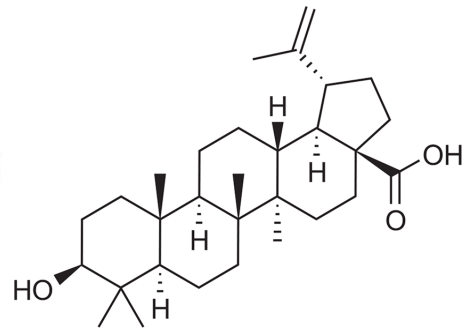
3.2.4.3. Triterpenlerin genel özellikleri

Triterpenler (30C), altı izopren halkasından oluşan ve biyosentetik olarak squalenden türeyen bileşikler olup isoprenoid birleşiklerin en geniş gruplarından birisidir. Yüksek kaynama noktasına sahip, renksiz katı yapıdadırlar. Kompleks triterpenoidler acılı özelliğe (örneğin limon meyvalarındaki limonoidler, Cucurbitaceae familyasındaki cucurbitasinler, gibi) sahiptir. Ursolik asit, oleanik asit ve betulinik asit gibi bazı triterpenler ise bitkiler aleminde yaygın olarak bulunmaktadır (Şekil 3.4., 3.5., ve 3.6).

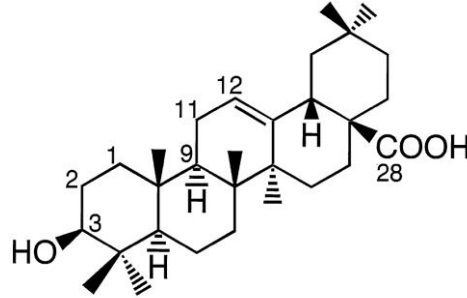
Triterpenler steroidler (27-29C) başlığı altında 5 gruba ayrılırlar. Bunlar; steroller, sapogeninler, kardiyak glikozitler, steroid hormonlar ve fitoekdisteroidlerdir.



Şekil 3.4. Ursolik asit



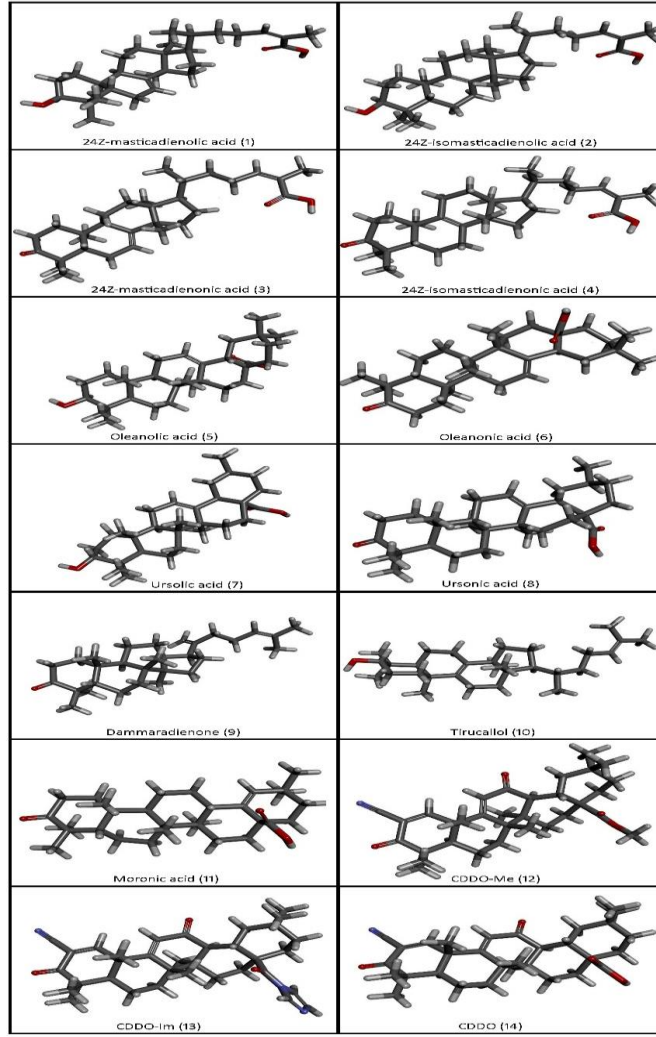
Şekil 3.5. Betulinik asit



Şekil 3.6. Oleanolik asit

3.2.4.4. *P. lentiscus* L'ta bulunan triterpenoid yapıdaki bileşenler

Daha önce birçok araştırmacı tarafından özellikle sakız reçinesi yağından izole edilerek tanımlanmış α -pinen, β -myrcen, β -pinen ve limonen'in, mastik sakızının ve esansiyel yağının ana bileşenleri olduğu bulunmuştur (Akdemir ve ark., 2013). Bunların yanısıra verbenon, α -terpineol ve linalool gibi çeşitli iz bileşenlerin de sakız yağının antibakteriyel aktivitesine önemli ölçüde katkıda bulunduğu görülmüştür. Polimersiz sakız ekstraktı asidik ve nötral fraksiyonlara ayrılmaktadır. Asidik fraksiyonlar oleanonik asit, moronik asit, 24Z-mastikadienonik asit, 24Z-izomastikadienonik asit, 24Z-mastikadienolik asit ve 24Z-izomastikadienolik asit gibi major triterpenoid bileşikleri içermektedir. (Paraschos vd., 2007; Kaliora vd., 2007; Papageorgiou vd., 1997). Sakız reçinesinden, yağından ve diğer ekstraktlarından elde edilen triterpenoid bileşiklerin 3 boyutlu yapıları Şekil 3.7'de verilmiştir.



Şekil 3.7. Sakız reçinesinden, yağından ve diğer ekstraktlarından izole edilen doğal triterpenoidler

3.2.5. Terpen yapıdaki bileşenlerin analizi

3.2.5.1. Uçucu olmayan bileşenlerin ekstraksiyonu ve analizi

3.2.5.1.1. Sürgün kültürlerinin ekstraktlarının hazırlanması

Örnekler kurutulduktan sonra öğütülerek toz haline getirilmiş ve kullanılıncaya dek $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ta karanlık koşullarda saklanmıştır. 100 mg toz örneğin ekstraksiyonu öncelikle 5 gün boyunca 250 ml kloroform solüsyonunda akabinde 1.5 L etanolde 1 gün boyunca bekletilerek $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de masere edildi.

3.2.5.1.2. LC-MS/MS ile triterpenoidlerin analizi

Sürgün kültürlerinden elde edilen kuru ekstraktlar Shimadzu marka ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) cihazı ile analiz edildi.

3.2.5.1.2.1. LC-MS/MS sistemi

Tandem-MS, çok özgül ve duyarlı bir teknoloji olup geniş grubunun değerlendirilmesini mümkün kılar. Hızlı, kesin ve az miktarda kan örneği ile çalışılabilen bir yöntemdir. En önemli avantajı, oldukça az miktarda fizyolojik sıvı veya kuru örneğin birbiriyle bağlantısız çok sayıda farklı metabolit ve bileşiği aynı anda ölçebilmesidir. Tandem-MS kullanılarak tek bir örnek ile 25'den fazla metabolitin taranması mümkündür. Bitkilerin farmasötik aktif bileşenlerinin nitel ve nicel analizlerinde LC-MS ve özellikle de LC-MS/MS cihazları çok sık tercih edilmektedir. Tarama için Guthrie kartları üzerine alınmış ve kurutulmuş örneklerden alınacak küçük diskler yeterlidir. Guthrie kağıtları üzerine alınmış ve kurutulmuş örneklerden etanol ile elde edilen kısım, "soft iyonizasyon" veya "elektrospray" yöntemi ile cihaza yüklenir. İlk filtreleme kısmında iyonize olan ve iyonize olmayan moleküller ayrılır. İyonize ana moleküller daha sonra cihazın "çarpışma ünitesi" denilen bölümüne gelirler. Burada inert gazların (argon gazı vb) etkisi ile ana moleküller elektron yüklü daha küçük parçalara parçalanırlar (fragmentasyon). Ana molekülden ayrılan daha küçük iyonlar ikinci bir filtrede kütlelerine göre ayrıştırılır. Cihazda bulunan iki MS (kütle spektrometresi) aracılığıyla belli bir ana molekülün öncüsü olan küçük iyonize moleküller ile ana moleküller taranır ve gruplandırılırlar. Ana molekülden ayrılan küçük moleküllerin oluşturduğu spektrum, bu ana molekül için karakteristiktir. Cihazda iki adet kütle spektrometresi bulunduğundan MS-MM, MS/MS veya MS² olarak gösterilir. Döteryum işaretli internal bir standart ile karşılaştırılarak miktar tayini yapılır (Demirel 2010).

3.2.5.1.2.2. LC-MS/MS için mobil faz sistemi

Sıvı kromatografi cihazı için kullanılacak hareketli faz sistemi A ve B fazı olmak üzere ikili sistemden oluşmaktadır. A fazı ultra saf su, B fazı ise metanol, asetonitril, metanol-su, asetonitril-su şeklinde farklı varyasyonlar denenerek en iyi ayrımın gerçekleştiği mobil faz sistemi tercih edildi.

3.2.5.1.2.3. LC-MS/MS analizi için örneklerin hazırlanması

Bitki materyallerinden elde edilen kuru ekstreler metanol ile 500 mg/kg olacak şekilde seyreltilerek ve 0,22 µm şırınga ucu filtreden geçirilerek cihaza enjekte edildi.

3.2.5. İstatistiksel analizler

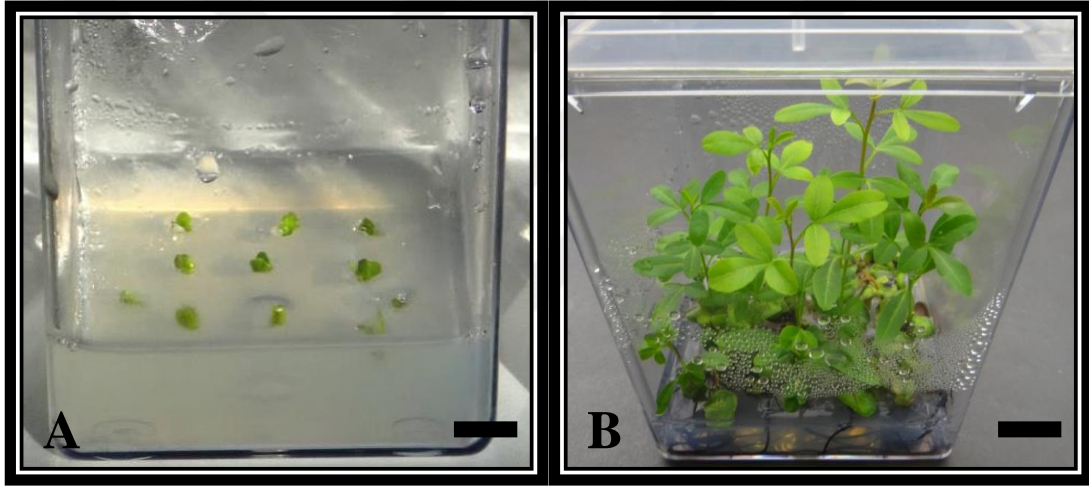
Çalışmalar sonucu elde edilen veriler (Eksplant başına düşen gövde sayısı, Gövde Uzunluğu, ve G.O.K) bakımından istatistiksel olarak değerlendirilecektir. Bütün çalışmalar tesadüf blokları deneme desenine göre yapılacaktır. Verilerdeki değişkenliği hızlı bir şekilde görmek için bütün çalışma sonuçlarının tanımlayıcı analizleri SPSS 19.0 paket programı kullanılarak yapılacaktır. Test edilen işlemler arasındaki farklılıkların belirlenebilmesi için veriler ANOVA'ya tabi tutulacaktır. İstatiksel olarak farklı görülen işlemler belirlendiğinde ortalama veriler arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ seviyesinde Duncan çoklu karşılaştırma testine tabi tutulacaktır. Oransal verilere ise, Ki kare (χ^2) testi ile istatistiksel olarak değerlendirilecektir.



4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Doku kültürü çalışmalarına ait sonuçlar ve tartışma

Doku kültürü uygulamalarında en temel konulardan biri, bitki parçaları ve kullanılacak alet ve ekipmanların sterilizasyonu ile besi ortamlarının hazırlanmasıdır. Bu bağlamda uygulamış olduğumuz teknikler sonuçların başarılı bir şekilde elde edilmesine olanak sağlamıştır. Bu tez kapsamında yüzey sterilizasyonu tamamlanmış tohumlar 1 mg/L IBA destekli MS besi ortamında çimlendirilmiş (**Şekil 4.1 A**) ve aksenik sürgünler, 1mg/L BAP, 0.5 mg/L GA₃ ile destekli MS besi ortamında prolifer edilmiştir (**Şekil 4.1 B**). Prolifere edilen juvenil sürgünler 1 mg/L BA, 50 mg/L valin, 30 g şeker ve 6,4 g/L agar içeren MS besi ortamına akatılmış ve ağır metal uygulamaları için yeterli sayıda stok kültürler elde edilmiştir.



Şekil 4.1. (A) 1 mg/l IBA destekli MS besi ortamında çimlenmeye bırakılan tohumlar, (B) Prolifere edilen fideler

Doku kültürü uygulamalarında, bütün bitki türleri için evrensel bir rejenerasyon protokolü bulunmadığından her bitki türü, hatta her bitki çeşidi için spesifik bir in vitro çoğaltım protokolünün oluşturulması gerekmektedir. Bu tez kapsamında nihai amaç sakız ağacının tohumlarından itibaren yeni bir mikroçoğaltım tekniği oluşturmak olmadığından daha önce, Onay ve ark., (2014) ve Kılınç ve ark., (2015)'nin geliştirmiş oldukları protokoller sürgün kültürü işlemlerini gerçekleştirmek için kullanılmıştır.

4.2. Ağır metal elisitasyonuna ait sonuçlar ve tartışma

Elisitör olarak yarı-katı besi ortamlarına ilave edilen farklı tipte ve konsantrasyonda ağır metal uygulamalarının *P. lentiscus* L. sürgün gelişimine ve triterpenoid içeriğinin değişimine etkisi aşağıda ayrı başlıklar halinde sunulmuştur.

4.2.1. Bakır nitrat (CuNO₃) elisitasyonuna ait sonuçlar

Elisitör olarak besi ortamına ilave edilen 1, 2 ve 4 mg/L CuNO₃ uygulamalarının, sürgün gelişimine etkisinin sunulduğu **Çizelge 4.1** irdelendiğinde, besi ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki CuNO₃ uygulamalarından elde edilen bitkilerin kontrol grubuna (9.03±0.71) oranla çok düşük sayıda gövde oluşturduğu gözlenmiştir.

Uygulanan ağır metal konsantrasyonunun artışına paralel olarak, gövde sayısının oldukça azaldığı, bundan dolayı gövde uzunluğunun toplam sürgün sayısına bölünmesiyle elde edilen ortalama gövde uzunluklarının, kontrol grubu hariç uygulanan CuNO₃ konsantrasyonları içerisinde en düşük değer 1.00±0.10 ile 4 mg/L CuNO₃ elisitasyonundan elde edildiği belirlenmiştir. Gövde oluşturma kapasitesi bakımından en yüksek sonuçların kontrol grubundan (0.09) elde edildiği, farklı konsantrasyonlarda CuNO₃ uygulanan bitkilerde istatistiksel olarak herhangi bir fark gözlenmediği ve her üç konsantrasyonda da sonuçların 0.01 olduğu tespit edilmiştir.

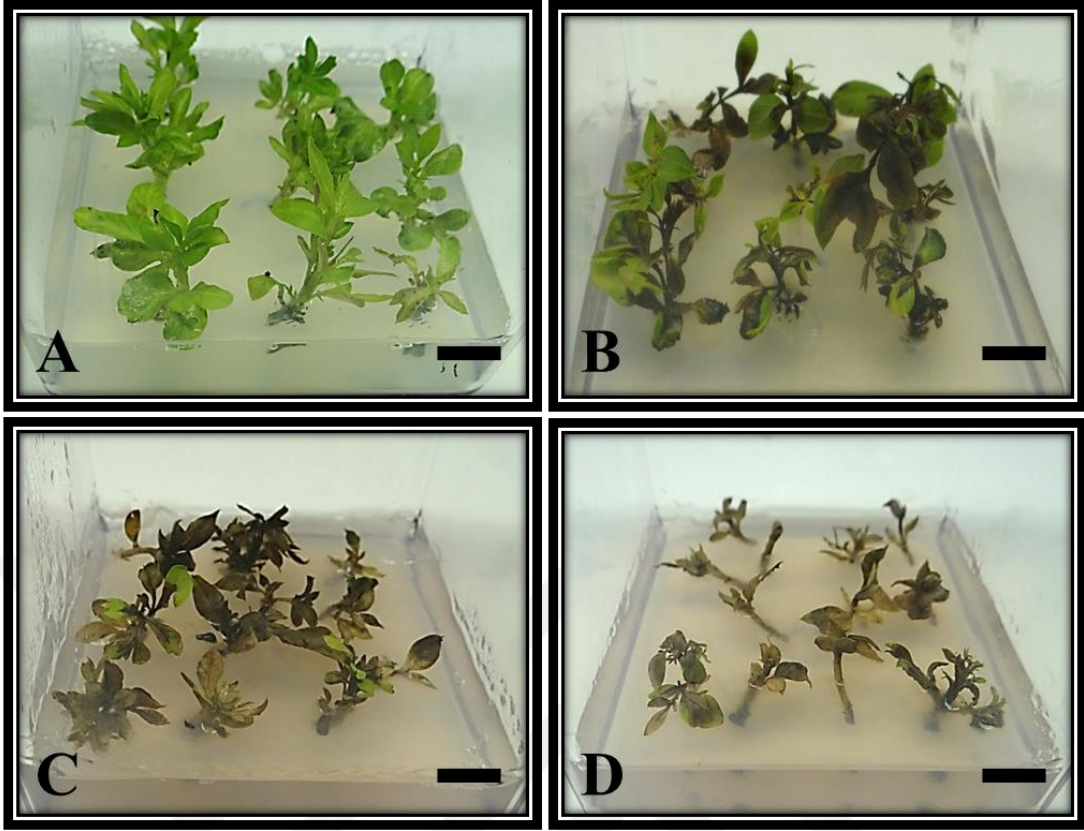
Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda CuNO₃ uygulamalarının *P. lentiscus* L'ta gövde gelişimine etkisi

Elistör Tipi (mg/L)	Ortalama	Ortalama	**G.O.K
	Gövde Sayısı ***Ort±SH	Gövde Uzunluğu (cm) Ort±SH	
Kontrol	9.03±0.71a	0.55±0.05d	0.09
1 mg/l CuNO ₃	1.12±0.08b	1.25±0.07b	0.01
2 mg/l CuNO ₃	1.03±0.04b	1.52±0.10a	0.01
4 mg/l CuNO ₃	1.02±0.11b	1.00±0.10c	0.01

Veriler kültürün 28. gününde toplam 30 eksplantın ortalamasından elde edilmiştir. Her bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, Post Hoc çoklu karşılaştırmalı testine göre belirgin bir fark (P≤0.05) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

** Gövde oluşturma kapasitesi indeksi.***Ortalama ± Standart hata.

Sürgün gelişimlerinin morfolojik özelliklerine bakıldığında ise, uygulanan CuNO₃ konsantrasyonunun artışına bağlı olarak, gövde sayısının ve uzunluğu ile kuru maddenin azaldığı, yaprak ve gövdelerde kırmızılaşma ve kararmaların arttığı tespit edilmiştir (**Şekil 4.2**). Morfolojik olarak sağlıklı sürgünlerin kontrol grubunda yer aldığı, bakır nitrat stresine bağlı olarak yaprak uçlarında başlayıp devam eden klorozis ve hasarlar meydana geldiği ve genel olarak sürgünlerin renginde koyulaşma olduğu görülmüştür.



Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda CuNO_3 (Bakır nitrat) uygulanan *P. lentiscus* L. fidelerinin genel görünümü Bar: 0.90 cm. (A) Kontrol (B) 1mg/L CuNO_3 (C) 2mg/L CuNO_3 (D) 4mg/L CuNO_3

Triterpenoid miktarlarının sunulduğu Çizelge 4.2 irdelendiğinde ise, besi ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki CuNO_3 elisitasyonundan elde edilen bitkilerin kontrol grubuna göre çok düşük sayıda gövde sayısı oluşturmasına rağmen hem gövde hem de yaprak ekstralarında farklı triterpenoid tespiti ve tirterpenoidlerde de artış tespit edilmiştir. Özellikle kontrol grubunda tespit edilemeyen moronik asit ve Oleanolik asitin, CuNO_3 uygulanan besi ortamlarından inkübe edilen sürgünlerin ekstralarında tespit edilirken diğer terpenoitler açısından herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. 4mg/L CuNO_3 uygulanan yaprak ekstresinde moronik asit, 0.063 ppm seviyesinde; Oleanonik asit, 0.031 ppm seviyesinde artış gösterirken, 2mg/L CuNO_3 uygulanan yaprak ekstresinde (0.005 ppm) kontrol grubuna göre (0.007 ppm) 0.002 seviyesinde bir azalma meydana gelmiştir. Özellikle CuNO_3 ilaveli besi ortamlarında inkübe edilen *P. lentiscus* L'nin yaprak ekstralarına nazaran gövde ekstralarında daha fazla sayı ve miktarda triterpenoid oluştuğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda CuNO₃ uygulanan *P. lentiscus* L'nin gövde ve yaprağındaki triterpenoid bileşiklerin miktar ve çeşidine etkisi

Elistör Tipi (mg/L)	Eksplant Tipi	Ursonik Asit	Moronik Asit	Oleanonik Asit	Mastikadienolik Asit	Oleanolik Asit	Ursolik Asit
Kontrol	Gövde	0.012	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	0.007	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
1 mg/l CuNO₃	Gövde	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2 mg/l CuNO₃	Gövde	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	0,005	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4 mg/l CuNO₃	Gövde	N.D.	0.063	0.031	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

*N.D; Tespit edilemedi

4.2.2. Kobalt klorür (CoCl₂) elisitasyonuna ait sonuçlar

1, 2 ve 4 mg/L CoCl elisitasyonunun, sürgün gelişimine etkisinin sunulduğu **Çizelge 4.3** irdelendiğinde, farklı konsantrasyonlardaki CoCl₂ uygulamalarından elde edilen bitkilerin kontrol grubuna (9.03±0.71) oranla çok düşük ortalama gövde sayısına sahip olduğu belirlenmiştir. 1 mg/L CoCl₂ uygulamasının ortalama gövde sayısı bakımından (1.48±0.12), 2 ve 4 mg/L CoCl₂ uygulamalarına göre daha iyi sonuç verdiği gözlenmede istatistiksel olarak aralarında herhangi bir fark gözlenmediği (1.00±0.00) tespit edilmiştir. Uygulanan ağır metal konsantrasyonunun artışına paralel olarak gövde sayısının oldukça azaldığı ve ortalama gövde uzunlukları bakımından da uygulanan CoCl₂ konsantrasyonları içerisinde en düşük değer 1.31±0.07 ile 2 mg/L CoCl₂ uygulamasından elde edildiği belirlenmiştir. En yüksek gövde oluşturma kapasitesinin yine kontrol grubundan (0.09) elde edildiği ve bunu sırasıyla 1 mg/L CoCl₂ (0.02) ile 2-4 mg/L CoCl₂ (0.01) uygulamalarının takip ettiği belirlenmiştir.

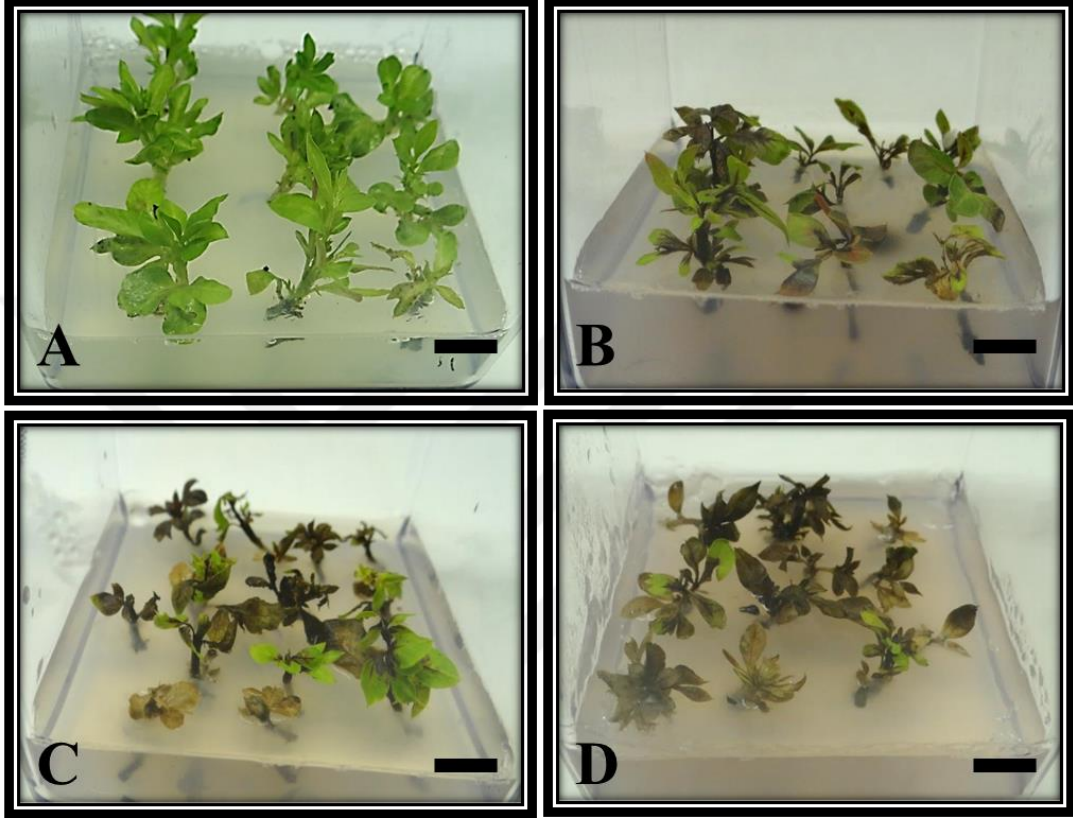
Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda CoCl₂ elisitasyonunun *P. lentiscus* L'ta gövde gelişimine etkisi

Elistör Tipi (mg/L)	Ortalama Gövde Sayısı ***Ort±SH	Ortalama Gövde Uzunluğu (cm) Ort±SH	**G.O.K
Kontrol	9.03±0.71a	0.55±0.05 d	0.09
1 mg/l CoCl₂	1.48±0.12b	1.50±0.07a	0.02
2 mg/l CoCl₂	1.00±0.00c	1.31±0.07c	0.01
4 mg/l CoCl₂	1.00±0.00c	1.44±0.04ab	0.01

Veriler kültürün 28. gününde toplam 30 eksplantın ortalamasından elde edilmiştir. Her bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, Post Hoc çoklu karşılaştırımlı testine göre belirgin bir fark (P<0.05) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

** Gövde oluşturma kapasitesi indeksi, ***Ortalama ± Standart hata.

Şekil 4.3 incelendiğinde, CoCl_2 elisitasyonunun artışına paralel olarak gövde sayısında ve uzunluğunda, gövde-yaprak kuru ağırlıklarında azalmalar olduğu, yaprak ve gövdelerde kararmaların arttığı belirlenmiştir. Yapraklarda stresin sonucu olarak klorofil kaybına bağlı yaprak uçlarında başlayıp devam eden klorozis ve nekrozların meydana geldiği görülmüştür.



Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda CoCl_2 elisitasyonunun *P. lentiscus* L. fidelerinin genel görünümü
Bar: 0.90 cm. (A) Kontrol (B) 1 mg/L CoCl_2 (C) 2 mg/L CoCl_2 (D) 4 mg/L CoCl_2

Çizelge 4.4 irdelendiğinde ise, CoCl_2 uygulamalarından elde edilen bitkilerin yine kontrol grubuna göre çok düşük sayıda gövde sayısı oluşturduğu, bazı gövde ve yaprak ekstralarında farklı triterpenoid tespiti ve tirterpenoid miktarlarında ise artış gözleendiği tespit edilmiştir. Moronik asit, oleanonik asit ve oleanolik asit'in kontrol grubunda gözlenmediği halde ilk kez CoCl_2 uygulanan ekstralarda açığa çıktığı belirlenmiştir. 2 mg/L CoCl_2 uygulamasının, gövde ekstralarında ursonik asit miktarını 0.018 ppm'e yükselttiği ve kontrol grubuna göre 1.5 kat arttırdığı, yaprak ekstralarında ise 0.016 ppm seviyesine ulaşarak 2.28 kat artış gösterdiği ve moronik asit'in ise 0.093 seviyelerine çıktığı tespit edilmiştir. Oleanonik ve oleanolik asit'in denenen parametreler içerisinde sırasıyla maksimum 0.045 ppm ve 0.012 ppm şeklinde elde edildiği ve farklı

konsantrasyonlarda CoCl_2 uygulamasının mastikadienolik asit ve ursolik asit üzerinde ise herhangi bir değişikliğe yol açmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda CoCl_2 elisitasyonunun *P. lentiscus* L'un gövde ve yaprağındaki trierpenoid bileşiklerin miktar ve çeşidine etkisi

Elistör Tipi (mg/L)	Eksplant Tipi	Ursonik Asit	Moronik Asit	Oleanonik Asit	Mastikadienolik Asit	Oleanolik Asit	Ursolik Asit
Kontrol	Gövde	0.012	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	0.007	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
1 mg/l CoCl_2	Gövde	N.D.	N.D.	0.045	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	0,004	N.D.	N.D.	N.D.	0,012	N.D.
2 mg/l CoCl_2	Gövde	0.018	0.093	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	0,016	0,074	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4 mg/l CoCl_2	Gövde	N.D.	0.045	0.028	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

*N.D; Tespit edilemedi

4.2.3. Nikel nitrat (NiNO_3) elisitasyonuna ait sonuçlar

Çizelge 4. 5. irdelendiğinde, farklı konsantrasyonlardaki NiNO_3 uygulamalarının ortalama gövde sayısı bakımından tüm bitki grupları arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark göstermediği (1.00 ± 0.00), ancak gövde uzunluğu bakımından maksimum 1.24 ± 0.05 cm olduğu belirlenmiştir. Maksimum ortalama gövde sayısının, kontrol grubuna ait bitkilerden (9.03 ± 0.71) ortalama gövde uzunlukları arasında, minimum sonucun (0.55 ± 0.05) ise kontrol grubundan elde edildiği görülmüştür. Maksimum gövde oluşturma kapasitesinin de kontrol grubuna ait olduğu (0.09), gövde oluşturma kapasitesi bakımından ağır metal uygulanan bitki grupları arasında fark gözlenmediği ve elisitasyonun tüm konsantrasyonlarda 0.01 sonucunu verdiği tespit edilmiştir.

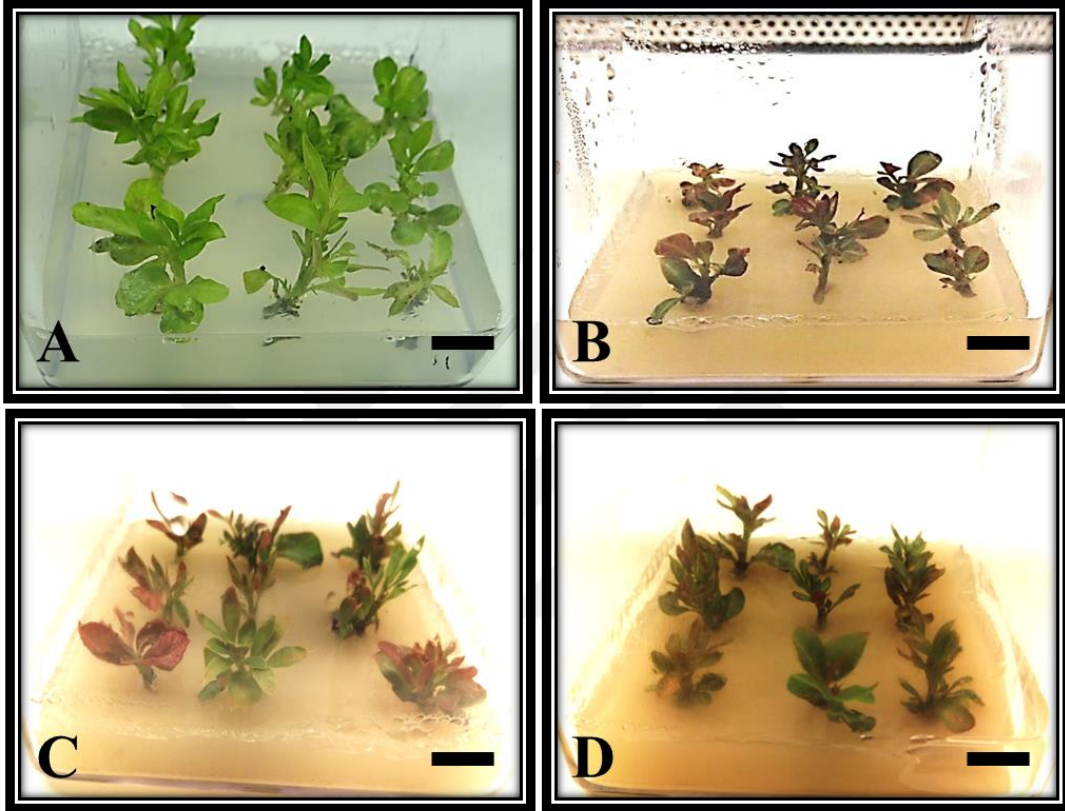
Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlarda NiNO_3 elisitasyonunun *P. lentiscus* L'ta gövde gelişimine etkisi

Elistör Tipi (mg/L)	Ortalama Gövde Sayısı ***Ort±SH	Ortalama Gövde Uzunluğu (cm) Ort±SH	**G.O.K
Kontrol	9.03 ± 0.71 a	0.55 ± 0.05 d	0.09
1 mg/l NiNO_3	1.00 ± 0.00 b	1.24 ± 0.05 a	0.01
2 mg/l NiNO_3	1.00 ± 0.00 b	1.00 ± 0.08 c	0.01
4 mg/l NiNO_3	1.00 ± 0.00 b	1.15 ± 0.08 ab	0.01

Her bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı testine göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

** Gövde oluşturma kapasitesi indeksi.***Ortalama \pm Standart hata.

NiNO_3 elisitasyonu sonucunda elde edilen morfolojik gözlemler **Şekil 4.4**'te sunulmuştur. Artan konsantrasyonların sürgün gelişimini olumsuz yönde etkilediği, gövde sayısı ve uzunluğunda, gövde-yaprak kuru ağırlıklarında düşüşe, yapraklarda kırmızılaşma ve kararmalara, gövdelerde daha çok kararmalara yol açtığı tespit edilmiştir. Nikel nitrat derişimine bağı olarak yapraklarda klorozis oluştuğı belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda NiNO_3 uygulanan *P. lentiscus* L. fidelerinin genel görünümü Bar: 0.90 cm. (A) Kontrol (B) 1 mg/L NiNO_3 (C) 2 mg/L NiNO_3 (D) 4 mg/L NiNO_3

Triterpenoid miktarlarının sunulduğu **Çizelge 4.6** irdelendiğinde ise, genel olarak besi ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki NiNO_3 uygulamalarından elde edilen bitkilerin gövde yaprak eksplantları üzerinde ursonik asit dışında araştırılan diğer triterpen çeşit ve miktarı bakımından etki göstermediği tespit edilmiştir. Sadece kontrol grubuna ait gövde (0.012 ppm) ve yaprak (0.007 ppm) ekstralarında tespit edilen ursonik asit miktarının 1 ve 4 mg/L'lik uygulamalarında düşüşe yol açarken, 2 mg/L NiNO_3 elisitasyonunun ise yaprak ekstresinde 1.8 kat artış gösterdiği ve 0.013 ppm seviyesine ulaştığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı konsantrasyonlarda NiNO₃ uygulanan *P. lentiscus* L'un gövde ve yaprağındaki trierpenoid bileşiklerin miktar ve çeşidine etkisi

Elistör Tipi (mg/L)	Eksplant Tipi	Ursonik Asit	Moronik Asit	Oleanonik Asit	Mastikadienolik Asit	Oleanolik Asit	Ursolik Asit
Kontrol	Gövde	0.012	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	0.007	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
1 mg/l NiNO₃	Gövde	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	0,005	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2 mg/l NiNO₃	Gövde	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	0,013	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4 mg/l NiNO₃	Gövde	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	0,004	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

*N.D.; Tespit edilemedi

4.2.4. Kurşun nitrat (PbNO₃) elisitasyonuna ait sonuçlar

Çizelge 4.7. irdelendiğinde, ortalama gövde sayısı bakımından maksimum sonucun kontrol grubuna ait olduğu, uygulanan PbNO₃ dozlarının artışına paralel olarak ortalama gövde sayısının azaldığı ve minimum gövde sayısının 4 mg/L'lik dozdan (1.00±0.00) elde edildiği görülmüştür. Ortalama gövde uzunluğunun en yüksek 0.92±0.07 cm ile 2 mg/L PbNO₃ elisitasyonundan elde edildiği belirlenmiştir. Maksimum gövde oluşturma kapasitesinin (0.09) kontrol grubuna ait olduğu, 1-2 mg/L PbNO₃ elisitasyonu arasında fark gözlenmediği ve 4 mg/L uygulamasının gövde oluşturma kapasitesini azalttığı görülmüştür.

Çizelge 4.7. Farklı konsantrasyonlarda PbNO₃ elisitasyonunun *P. lentiscus* L'ta gövde gelişimine etkisi

Elistör Tipi (mg/L)	Ortalama Gövde Sayısı ***Ort±SH	Ortalama Gövde Uzunluğu (cm) Ort±SH	**G.O.K
Kontrol	9.03±0.71a	0.55±0.05 c	0.09
1 mg/l PbNO₃	2.25±0.18b	0.74±0.08ab	0.02
2 mg/l PbNO₃	2.11±0.15b	0.92±0.07a	0.02
4 mg/l PbNO₃	1.00±0.00c	0.84±0.08ab	0.01

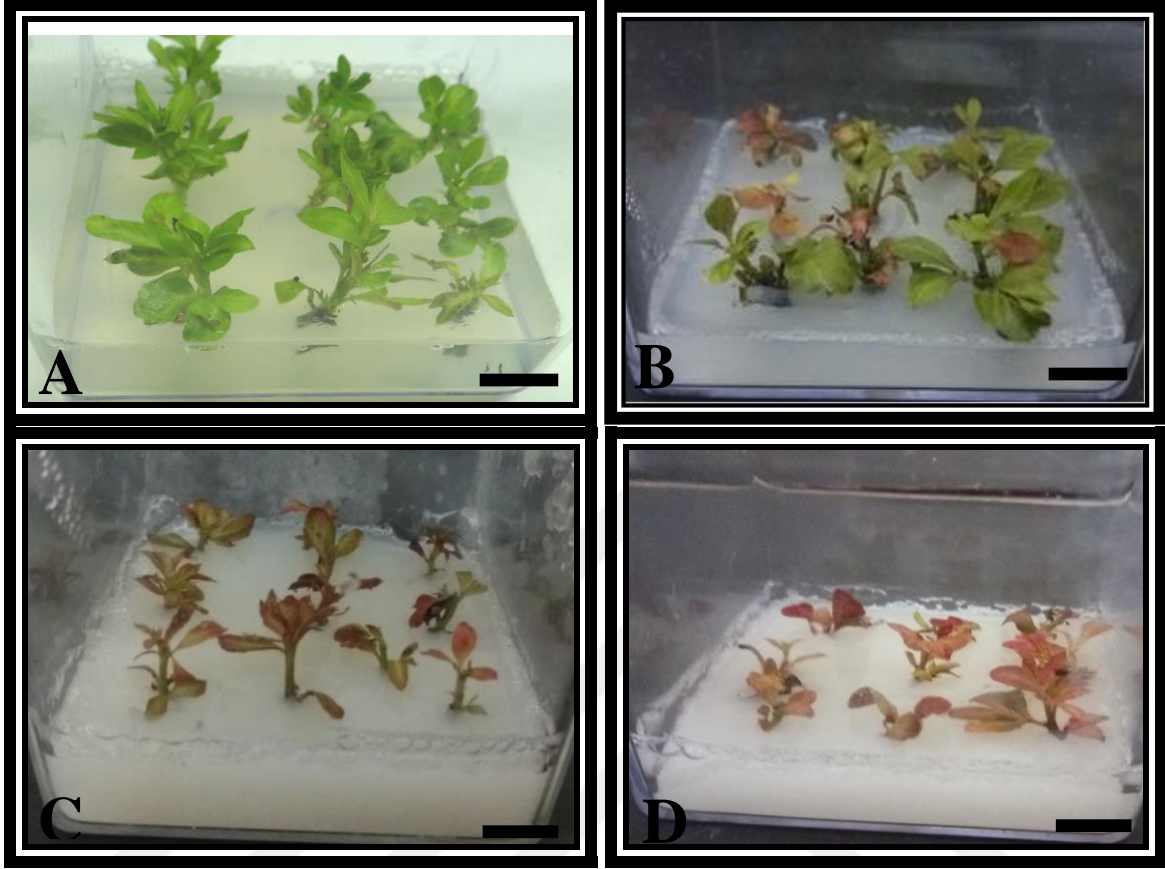
Her bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı testine göre belirgin bir fark (P≤0.05) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

** Gövde oluşturma kapasitesi indeksi.

***Ortalama ± Standart hata.

Mikro besin elemanı içerisinde yer almayan kurşunun toksik özelliğinin denenen diğer ağır metallere oranla daha olumsuz sonuçlar verdiği belirlenmiştir. **Şekil 4.4** incelendiğinde PbNO₃ elisitasyonu sonucunda artan ağır metal konsantrasyonların gövde sayısı ve uzunluğunda, gövde-yaprak kuru ağırlıklarında düşüşe, yapraklarda

daha çok kırmızılaşmaya ve klorozise, gövdelerde ise kararmalara yol açtığı belirlenmiştir.



Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda $PbNO_3$ uygulanan *P. lentiscus* L. fidelerinin genel görünümü Bar: 0.90 cm. (A) Kontrol (B) 1 mg/L $PbNO_3$ (C) 2 mg/L $PbNO_3$ (D) 4 mg/L $PbNO_3$

P. lentiscus L'un gövde ve yaprağındaki triterpenoid bileşiklerin miktar ve çeşidine farklı konsantrasyonlarda uygulanan $PbNO_3$ 'ın etkisi **Çizelge 4.8'**de sunulmuştur. Buna göre, $PbNO_3$ uygulamasının özellikle gövdeler üzerinde etkili olduğu ve moronik, oleanonik ile ursolik asit gibi kontrol grubunda bulunmayan triterpen bileşiklerin oluşumuna yol açtığı belirlenmiştir. Kontrol grubunun hem gövde hem de yaprak ekstrelerinde bulunan ursonik asit seviyesinin, 2 mg/L $PbNO_3$ uygulaması ile sırasıyla 1.2 ve 2.4 kat artış gösterdiği, 4 mg/L hariç diğer uygulamalara hem gövde hem de yaprak kısımlarında yanıt oluşturduğu, mastikadienolik ve oleanolik asit triterpenlerine ise kontrol grubu dâhil $PbNO_3$ elisitasyonlarının hiçbirinde rastlanmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.8. Farklı konsantrasyonlarda PbNO₃ elisitasyonunun *P. lentiscus* L'un gövde ve yaprağındaki triterpenoid bileşiklerin miktar ve çeşidine etkisi

Elistör Tipi (mg/L)	Eksplant Tipi	Ursonik Asit	Moronik Asit	Oleanonik Asit	Mastikadienolik Asit	Oleanolik Asit	Ursolik Asit
Kontrol	Gövde	0.012	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	0.007	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
1 mg/l PbNO₃	Gövde	0.006	N.D.	0.059	N.D.	N.D.	0.049
	Yaprak	0.008	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2 mg/l PbNO₃	Gövde	0.015	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.024
	Yaprak	0.017	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4 mg/l PbNO₃	Gövde	N.D.	0.052	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

*N.D.; Tespit edilemedi

4.2.5. Gümüş nitrat (AgNO₃) elisitasyonuna ait sonuçlar

Besi ortamına ilave edilen 1, 2 ve 4 mg/L AgNO₃ elisitasyonunun, sürgün gelişimine etkisi **Çizelge 4.7.**'de sunulmuştur. Buna göre, ortalama gövde sayısı bakımından en yüksek sonucu (9.03±0.71) kontrol grubuna ait bitkilerin verdiği belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda AgNO₃ uygulamalarından elde edilen bitkilerin ortalama gövde sayısı arasında istatistiksel olarak fark gözlenmediği, artan PbNO₃ dozlarının ortalama gövde uzunluğunda düşüşe yol açtığı, bununla birlikte denenen parametreler arasında minimum uzunluğun 0.46±0.02 cm ile 4 mg/L PbNO₃ ilave edilen gövdelerden elde edildiği görülmüştür. Gövde oluşturma kapasitesi bakımından PbNO₃ uygulanan sürgünler arasında istatistiksel olarak fark gözlenmezken yine maksimum kapasitenin 0.09 ile kontrol grubuna ait olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.9. Farklı konsantrasyonlarda AgNO₃ uygulamalarının *P. lentiscus* L'ta gövde gelişimine etkisi

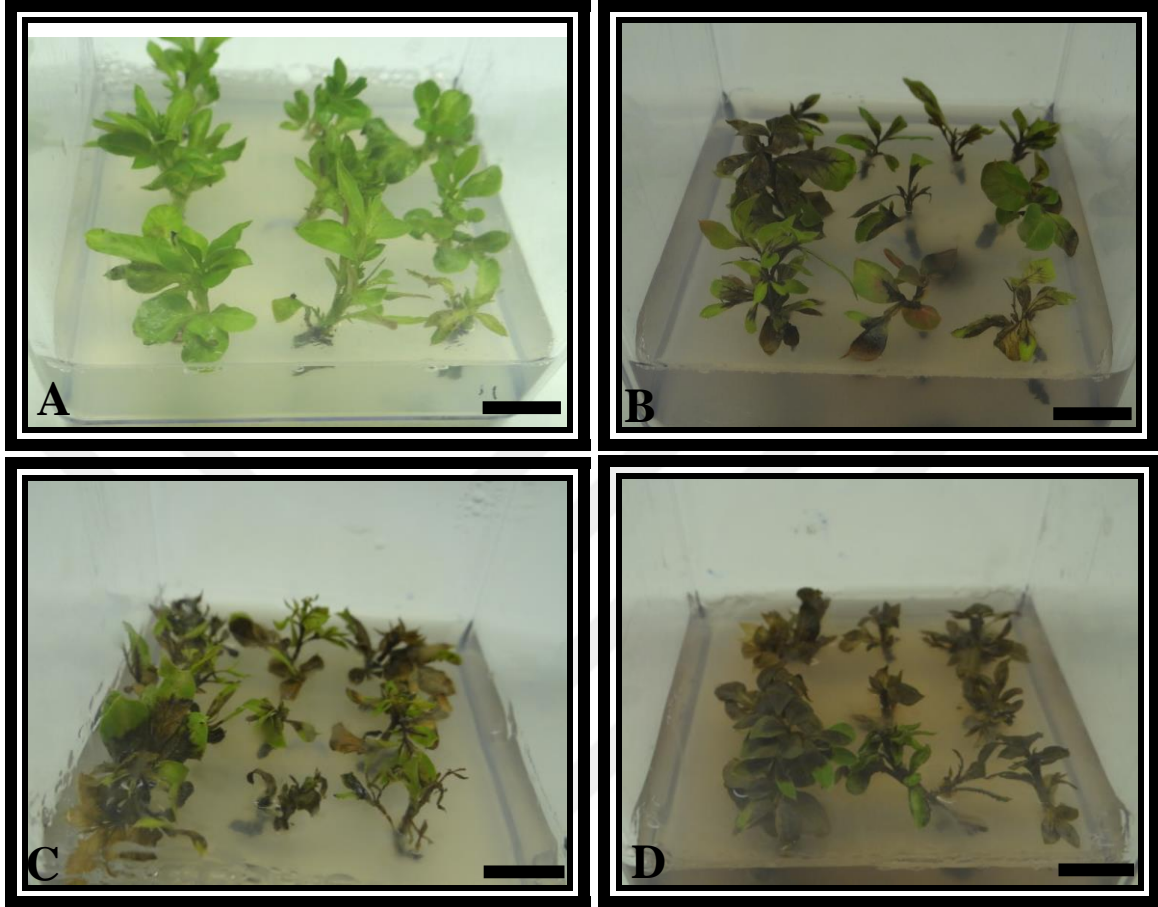
Elistör Tipi (mg/L)	Ortalama Gövde Sayısı ***Ort±SH	Ortalama Gövde Uzunluğu (cm) Ort±SH	**G.O.K
Kontrol	9.03±0.71a	0.55±0.05a	0.09
1 mg/l AgNO₃	1.11±0.06b	0.61±0.04a	0.01
2 mg/l AgNO₃	1.19±0.10b	0.55±0.02a	0.01
4 mg/l AgNO₃	1.00±0.00c	0.46±0.02b	0.01

Her bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı testine göre belirgin bir fark (P≤0.05) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

** Gövde oluşturma kapasitesi indeksi. ***Ortalama ± Standart hata.

Yine bir mikro besin özelliği taşımayan gümüş nitrat elisitasyonu sonucunda elde edilen morfolojik gözlemler **Şekil 4.4**'te sunulmuştur. Artan konsantrasyonların sürgün gelişimini olumsuz yönde etkilediği, gövde sayısı ve uzunluğunda, gövde-yaprak kuru ağırlıklarında düşüşe, gövdelerde ve yaprak uçlarından başlayıp devam eden

kararmalara yol açtığı tespit edilmiştir. Gümüş nitrat derişimine bağı olarak yapraklarda klorozis ve nekrozlar oluştuğı belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda AgNO_3 uygulanan *P.lentiscus* L. fidelerinin genel görünümü Bar: 0.90 cm. (A) Kontrol (B) 1 mg/L AgNO_3 (C) 2 mg/L AgNO_3 (D) 4 mg/L AgNO_3

Çizelge 4.10 irdelendiğinde, AgNO_3 elisitasyonunun gövde ve yaprak ekstrilerine ait triterpenoid bileşiklerin miktar ve çeşidinin arttığı gözlenmiştir. Kontrol grubu gövde ve yaprak ekstrilerinde bulunan ursolik asit'in elisite edilen bitkilerde hiç gözlenmediği, mastikadienolik asit bakımından ise herhangi bir değişikliğe yol açmadığı tespit edilmiş ancak kontrol grubunda bulunmayan moronik, oleanonik, oleanolik ve ursolik asit'in ise sentezine neden olduğu ve sentezlenen triterpenoitlerin miktarı dikkate alındığında ise, 4 mg/L AgNO_3 uygulanmış gövde ekstrilerinde **Ursolik asit'in 2.925 ppm** ile en çarpıcı sonucu verdiği gözlenmiştir.

Çizelge 4.10. Farklı konsantrasyonlarda AgNO₃ uygulanan *P. lentiscus* L'un gövde ve yaprağındaki terpenoid bileşiklerin miktar ve çeşidine etkisi

Elistör Tipi (mg/L)	Eksplant Tipi	Ursonik Asit	Moronik Asit	Oleanonik Asit	Mastikadienolik Asit	Oleanolik Asit	Ursolik Asit
Kontrol	Gövde	0.012	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	0.007	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
1 mg/l AgNO₃	Gövde	N.D.	0.074	0.032	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	N.D.	0,061	N.D.	N.D.	0,029	N.D.
2 mg/l AgNO₃	Gövde	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	N.D.	0,04	N.D.	N.D.	0,035	N.D.
4 mg/l AgNO₃	Gövde	N.D.	0.088	0.116	N.D.	N.D.	2.915
	Yaprak	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

*N.D.; Tespit edilemedi

Bitki hücre ve doku kültürleri, aseptik koşullar altında ve uygun besin ortamlarında bitki hücre (meristematik hücreler, hücre süspansiyonu veya kallus hücreleri) doku, organ (apikal meristem, kök, gövde, yaprak vb.) veya bitkiciklerin üretildiği ya da ürünlerin (metabolitler) elde edildiği tekniklerdir. Sekonder metabolitlerin bitki hücre ve doku kültürleri ile üretilmesi, geleneksel metotlara kıyasla ister tropik ister subtropik kökenli olsun, in vitro kültüre alınabilmesi, kültür şartlarının sekonder metabolit üretimini artıracak şekilde optimize edilebilmesi gibi belirgin avantajları söz konusudur (Erkoyuncu ve Yorgancılar 2015). Birçok tıbbi bitki türünde sürgün kültürleri yoluyla doğada yaşayan formlarından çok daha fazla miktarda sekonder metabolit birikimi sağlanmıştır. Örneğin, *Bacopa monnieri*'den bacoside A, *Nothapodytes nimmoniana*'dan kamptotesin ve *Digitalis purpurea* L. sürgün kültürlerinden digitoksin birikiminin ana bitkiden daha yüksek oranda üretilebildiği tespit edilmiştir (Sharma ve ark., 2015; Dandin ve Murthy 2012; Patil ve ark., 2013). İn vitro şartlarda bitki kısımlarına savunma ya da stres ile indüklenen cevapları teşvik eden bileşiklerin (elisitörler) uygulanması, bitkide mevcut olan veya olmayan sekonder metabolit üretimini arttırmak için kullanılan etkin stratejilerden biridir. (Ramachandra Rao ve Ravishankar 2002). Elisitörler orjinlerine ya da moleküler yapılarına göre fiziksel ya da kimyasal, biyotik ya da abiyotik ve kompleks ya da tanımlanmış olarak sınıflandırılmaktadır (Yamaner 2011). Tez çalışmamızda abiyotik stres kapsamında değerlendirilen, 5 farklı ağır metal elisitör olarak denenmiştir. Uygulanan elisitörün etkisinin, kültürün çeşidine, uygulanan elisitörün zamanlamasına, konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olarak metabolit üretimini etkilediği bilindiğinden (Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015) bu tez kapsamında 5 ağır metal çeşidine ait 3 farklı

konsantrasyon denenmiş ve in vitro sürgün kültürlerinden elde edilen yaprak ve gövde ekstralarında triterpen miktar ve çeşidi üzerine denemeler yapılmıştır. Huang ve Zhong (2013), NiSO₄, CuSO₄ ve MnSO₄ ağır metal tuzlarını süspansiyon kültürlerinde elisitör olarak kullanmış ve ginsenosid biyosentezini arttırdığını rapor etmişlerdir. Besi ortamına elisitör olarak eklenen ve bir ağır metal olan bakır (Cu)'ın *Bacopa monnieri* sürgün kültürlerinde Bacosid birikimine yol açtığı da bildirilmiştir (Sharma ve ark., 2015). *Epidyum sativum* olgun ve juvenil eksplantlarında 900 µM Zn⁺² veya 100 µM Cu⁺² uygulamasının ise lepidin seviyesini arttırdığını rapor etmişlerdir (Saba ve ark., 2000) *Rubia tinctorum* L. bitkisinde kök kültürlerinde fitoşelatin ve deglisil peptitleri üretimi üzerine çeşitli metal (Ag⁺², As⁺³, As⁺⁵, Cd⁺², Cu⁺², Ga⁺³, Hg⁺², Ni⁺², Pb⁺², Pd⁺², Se⁺² ve Zn⁺²) ve metal kompozisyonlarının etkilerini araştırdıkları çalışmalarında tüm metallerin fitoşelatinlerin üretimini çeşitli seviyelerde uyardığını ve diglisil peptitlerin oluşumunu sağladığını tespit etmişlerdir (Maitani va ark., 1996). *Pistacia lentiscus* L. juvenil sürgün kültürlerinde, gövde ve yaprak eksplantlarında denediğimiz abiyotik kökenli ağır metal elisitör uygulamaları sonucunda ise; antikanser özelliği bilinen Ursonik asit, Moronik asit, Oleonik asit, Mastikadienolik asit, Leonolik asit ve Ursolik asit triterpenlerine ait miktarların kontrol gruplarına oranla artış gösterdiği tespit edilmiştir. Kontrol gruplarına göre her bir triterpen için elde edilen maksimum miktarlara değinilecek olursa, juvenil gövde eksplantlarına 2 mg/L CoCl₂ elisitasyonunu sonrasında kontrol grubunda bulunmayan **Moronik asit** miktarı, sıfırdan **0,093 ppm** seviyesine; 4 mg/L AgNO₃ elisitasyonunu sonrasında kontrol grubunda bulunmayan **Oleonik asit** miktarı, sıfırdan **0,116 ppm** seviyesine; 4 mg/L AgNO₃ elisitasyonunu sonrasında kontrol grubunda bulunmayan **Ursolik asit** miktarı, yine sıfırdan **2,915 ppm** seviyesine; juvenil yaprak eksplantlarına 2 mg/L AgNO₃ elisitasyonunu sonrasında kontrol grubunda bulunmayan **Oleonolik asit** miktarı ise yine sıfırdan **0,035 ppm** seviyesine yükseldiği tespit edilmiştir. Bulgularımız yukarıda verilen literatür çalışmaları ile uyumlu olup elisitör uygulamasının çalışmamızda da sekonder metabolitlerin artışına yol açtığı belirlenmiştir. Yamaner ve ark., (2013) *Hypericum adenotrichum* Spach'un in vitro fidelerine 15 günlük 0.01 mM krom uygulamasının hiperosid ve izokuersitrin miktarlarını sırasıyla 1.7 ve 1.8 kat arttırdığını, 30 günlük 0.01 mM krom uygulamalarında önemli bir değişiklik olmadığını, hem 15 hem de 30 günlük 0.1 mM krom uygulamalarında flavonoid miktarlarının önemli ölçüde düştüğünü, 15 günlük 0.01 mM krom uygulamasında pseudohiperisin miktarının 2.2 kat ile hiperisin miktarının 1.7 kat arttırdığını ve son olarak 30 günlük krom

uygulamalarında hipersinlerin üretiminde önemli bir değişikliğe yol açmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmaya paralel olarak tez kapsamında *P. lentiscus* L.'un sürgün kültürlerine ait yaprak ve/veya gövde eksplantlarında genellikle bulunan ursonik asit'in besi ortamına ilave ettiğimiz 2mg/L CuNO_3 elisitasyonunu ile azaldığı; 2 mg/L CoCl_2 uygulaması ile kontrol grubuna oranla gövde ekstrelerinde 1.5 kat, yaprak ekstrelerinde ise 2.28 kat arttığı, 1 ve 4 mg/L NiNO_3 elisitasyonunun düşüşe yol açtığı; 2 mg/L NiNO_3 elisitasyonunun ise yaprak ekstresinde 1.8 kat artış gösterdiği ve yine 2 mg/L PbNO_3 elisitasyonunun da kontrol grubuna oranla gövde ve yaprak ekstelerinde sırasıyla 1.2 ve 2.4 kat arttığı belirlenmiştir.

Ağır metal stresinin, bitkilerde sekonder metabolit üretimini arttırmasının yanında, bitkilerin büyüme ve gelişimini düzenleyebilen, bitki üretimini sınırlayabilen, bitkilerin fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerini değiştirebilen en önemli çevresel streslerden biri olduğu bilinmektedir. Bitkiler, yaşam döngüsünde, büyüme ve gelişme için dozuna ve konsantrasyonuna bağlı olarak bazı ağır metalleri de kapsayan temel mikro besin maddelerine (Co, Cu, Ni gibi) ihtiyaç duyarlar. Ağır metal stresi bitkinin genotipine, ağır metal çeşidine, strese maruz kalma süresine ve strese maruz kalan doku veya organın yapısına bağlı olarak değişmekle birlikte genellikle yüksek konsantrasyonlarda kökleri kalınlaştırdığı, kök ve gövde uzunluğunu azaltarak bitki büyümesi ve gelişimini engellediği ile ilgili raporlar mevcuttur (Emamverdian ve Ding, 2017). 640 ve 1280 ppm bakır çözeltileri ile sulanan enginar (*Cynara scolymus* L.) tohumlarında aşırı metal stresi sonucu çimlenme oluşmadığı ayrıca kurşun ve bakır konsantrasyonunun artışına bağlı olarak fidelerinin kök uzunluğunda önemli derecede azalma gözlemlendiği (Batır, 2014), *Medicago sativa* tohumlarının 20 ppm Cd^{+2} , Cr^{+6} ve 40 ppm Cu^{+2} , Ni^{+2} 'den ciddi şekilde etkilendiği, tohum çimlenmesini, kök ve sürgün uzamasını azalttığı (Aydınalp ve Marinova 2009) *Dahlia cardiophylla* 'da farklı konsantrasyonlarda uygulanan Ni^{+2} ve Pb^{+2} 'un kontrol grubuna oranla tüm fidelerde kök ve sürgün uzunluğunu azalttığı, bitkinin büyüme ve gelişmesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Shivhare ve Sharma, 2012). Farklı patlıcan çeşitlerine (Burdur Merkez, Burdur Bucak, Kemer ve Giresun) uygulanan farklı konsantrasyonlarda Cu, Cd, Pb, Zn'nun yeşil aksam ve kök yaş ağırlığı, yeşil aksam ve kök kuru ağırlığı, gövde ve kök boyu ile yaprak alanında azalmaya neden olduğu belirtilmiştir. Tez kapsamında ise elisitör olarak kullanılan, 1, 2 ve 4 mg/L konsantrasyonlarda uygulanan bakır nitrat, gümüş nitrat, nikel nitrat, kurşun nitrat ve kobalt klorür'ün *P. lentiscus* L. juvenil sürgünlerinin gelişimi üzerindeki etkilerine baktığımızda, yukarıda verilen bulgulara

paralel olarak denenen tüm parametrelerde ağır metal uygulanmış sürgünlerin ortalama gövde sayısı bakımından oldukça azaldığı ve sonuç olarak en yüksek değerin kontrol grubuna ait bitkilerden elde edildiği görülmüştür. Gövde uzunluğunun toplam sürgün sayısına bölünmesiyle elde edilen ortalama gövde uzunlukları bakımından ise, bu kez en düşük değerin yine kontrol grubuna ait bitkilerden elde edildiği belirlenmiştir. Sürgünlerin morfolojik gözlemlerinde uygulanan ağır metal konsantrasyonuna bağlı olarak kararma ve kızarıklıkların arttığı da belirlenmiştir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Anacardiaceae familyasının önemli bir üyesi olan *P. lentiscus* L. herdem yeşil ve kuraklığa dayanıklı bir bitkidir. *P. lentiscus* bitkisi gövdesinden yaralanma sonucu elde edilen ve bir reçine olan mastik sakızı ile birlikte antifungal, antibakteriyal, antimikrobiyal, antienflamatuar, antihelicobacter pylori aktivitesi, antiatherogenik, antitumor, yara iyileştirici, karaciğer koruyucu, antiproliferatif, proapoptotik, tansiyon düşürücü ve antikanser gibi tıbbi öneme sahip pek çok sekonder metaboliti bünyesinde barındırır. Biyoteknolojik yöntemler, sekonder metabolitlerin, elisitör ve öncül bileşiklerin kullanılmasıyla artırılmasını ve buna bağlı olarak iş gücü ve maliyeti azaltabilmektedir. Bu bağlamda *P. lentiscus* L'un anti-kanser başta olmak üzere çok sayıda işleve sahip değerli terpenoid yapısındaki sekonder metabolitlerin biyoteknolojik yöntemler kullanılarak geliştirilmesi önem arz etmektedir.

Yapılan literatür taramalarında sakız ağacının elisitör kullanılarak sekonder metabolitlerinin arttırılması ve sürgün gelişimine etkisi üzerine yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tez kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verimiştir.

- Olgun tohumların yüzey sterilizasyonu %20 lik NaOCl içerisinde 20 dakika boyunca bekletilerek ve akabinde 3 defa 5' er dakika steril distile suda çalkalanarak yapılmıştır.

- Olgun tohumlar 1 mg/L IBA destekli MS besi ortamında çimlendirilerek juvenil sürgün kültürleri başlatılmıştır.

- Aksenik gövdeler, 1mg/L BAP, 0.5 mg/L GA₃ ile destekli MS besi ortamında prolifere edilmiştir ve 1 mg/L BA, 50 mg/l valin, 30 g şeker ve 5.4 gr agar içeren MS besi ortamından stok kültürler oluşturulmuştur.

- Besi ortamına ilave edilen 1, 2 ve 4 mg/L CuNO₃ elisitasyonu sonucunda, uygulanan ağır metal konsantrasyonunun artışına paralel olarak, gövde sayısının azaldığı, en yüksek ortalama gövde uzunluğun kontrol grubundan elde edildiği, GOK bakımından farklı konsantrasyonlarda CuNO₃ uygulanan bitkilerde istatistiksel olarak herhangi bir fark gözlenmediği ve her üç konsantrasyonda da sonuçların 0.01 olduğu bulunmuştur. Yine uygulanan CuNO₃ konsantrasyonunun artışına bağlı olarak, gövde ve yaprakta kuru maddenin azaldığı, kırmızılaşma ve kararma ile birlikte klorozis görülmüştür. Triterpenoid bakımından hem gövde hem de yaprak ekstralarında farklı

triterpenoid tespiti ve tirterpenoidlerde de artış olduğu, moronik asit ve oleanolik asitin, kontrol grubunda bulunmadığı halde CuNO_3 elisitasyonu ile sentezlenmeye başladığını yaprak ekstresinde moronik asit ve oleanonik asit miktarında artış görüldüğü, yaprak ekstrelerine nazaran gövde ekstrelerinde daha fazla sayı ve miktarda triterpenoid oluştuğu belirlenmiştir.

- Kültür ortamına ilave edilen 1, 2 ve 4 mg/L CoCl elisitasyonu sonucunda kontrol grubuna oranla çok düşük ortalama gövde sayısına sahip olduğu, ortalama gövde sayısı bakımından 2 ve 4 mg/L dozları arasında herhangi bir fark gözlenmediği, ortalama gövde uzunlukları bakımından en düşük değerin 2 mg/L dozundan ve en yüksek GOK'nin de kontrol grubundan elde edildiği belirlenmiştir. Sürgün gelişimi bakımından gövde-yaprak kuru ağırlıklarında azalma ve kararmaların doz artışına bağlı olarak arttığı, yaprak uçlarında başlayıp devam eden klorozis ve nekrozların meydana geldiği görülmüştür. Elisitasyon sonucunda bazı gövde ve yaprak ekstrelerinde farklı triterpenoid tespiti ve tirterpenoid miktarlarında ise artış gözlendiği, moronik, oleanonik ve oleanolik asit ilk kez CoCl_2 uygulanan ekstrelerde sentezlendiği, ursonik asit miktarının 1.5 kat ve 2.28 kat artış gösterdiği belirlenmiştir.

- Farklı konsantrasyonlardaki NiNO_3 elisitasyonu sonucunda ise, ortalama gövde sayısı bakımından ağır metal uygulanmış sürgünlerde istatistiksel olarak herhangi bir fark göstermediği (1.00 ± 0.00), ortalama gövde uzunlukları arasında, minimum sonucun (0.55 ± 0.05) ise kontrol grubundan elde edildiği ve maksimum GOK'nin yine kontrol grubuna ait olduğu elisitasyonun tüm konsantrasyonlarda 0.01 sonucunu verdiği görüldü. Artan dozların sürgün gelişimini olumsuz yönde etkilediği, gövde-yaprak kuru ağırlıklarında azalmaya, yapraklarda kırmızılaşma, kararma ve klorozise, gövdelerde ise daha çok kararmalara yol açtığı görülmüştür. Besi ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki NiNO_3 elisitasyonunun ursonik asit dışında diğer triterpen çeşit ve miktarına etki göstermeği, 1 ve 4 mg/L dozlar ursonik asit miktarında düşüşe, 2 mg/L dozu ise 1.8 kat artışa yol açtığı belirlenmiştir.

- PbNO_3 elisitasyonu sonucunda ortalama gövde sayısı bakımından maksimum sonucun kontrol grubuna ait olduğu, ortalama gövde uzunluğunun en yüksek 2 mg/L dozundan elde edildiği gözlenmiştir. GOK bakımından maksimum sonucun kontrol grubuna ait olduğu, 1-2 mg/L dozları arasında fark gözlenmediği 4 mg/L uygulamasının gövde oluşturma kapasitesini düşürdüğü görülmüştür. Artan PbNO_3 dozlarının gövde-yaprak kuru ağırlıklarında düşüşe, yapraklarda daha çok kırmızılaşmaya ve klorozise, gövdelerde ise kararmalara yol açtığı belirlenmiştir. Triterpenoit bakımından PbNO_3

elisitasyonun özellikle gövdeler üzerinde etkili olduğu ve moronik, oleanonik ile ursolik asit gibi kontrol grubunda bulunmayan triterpen bileşiklerin oluşumuna yol açtığı, ursonik asit seviyesinin 1.2 ve 2.4 kat artış gösterdiği, mastikadienolik ve oleanolik asit triterpenlerine ise etki etmediği görülmüştür.

- Besi ortamına ilave edilen 1, 2 ve 4 mg/L AgNO₃ elisitasyonu sonucunda ortalama gövde sayısı bakımından en yüksek sonucun kontrol grubuna ait olduğu, artan PbNO₃ dozlarının ortalama gövde uzunluğunda düşüşe yol açtığı, GOK bakımından elisite edilen sürgünler arasında istatistiksel olarak fark gözlenmediği ve maksimum kapasitenin kontrol grubuna ait olduğu tespit edilmiştir. Artan konsantrasyonların sürgün gelişimini olumsuz yönde etkilediği, gövde-yaprak kuru ağırlıklarında düşüşe, gövdelerde ve yaprak uçlarından başlayıp devam eden kararmalara ve yapraklarda klorozis ve nekrozlara yol açtığı belirlenmiştir. AgNO₃ elisitasyonunun gövde ve yaprak ekstrilerine ait triterpenoid bileşiklerin miktar ve çeşidinin arttığı, kontrol grubunda bulunan ursonik asit'in elisite edilen bitkilerde sentezlenmediği, mastikadienolik asit bakımından ise herhangi bir değişikliğe yol açmadığı, kontrol grubunda bulunmayan moronik, oleanonik, oleanolik ve ursolik asit'in ise sentezine neden olduğu ve 4 mg/L dozunun gövde ekstrilerinde **Ursolik asit'in 2.925 ppm** ile en çarpıcı sonucu verdiği görülmüştür.

5.2 .Öneriler

Tez kapsamında *P. lentiscus* L.'un sürgün kültürlerinden elde edilen ekstrilerin hücre metabolizması düzeyinde araştırılması ve saflaştırma işlemlerinin yapılarak geliştirilmesi ile kanserli hücre hatlarında bu saf bileşiklerin etkilerinin belirlenmesi ve daha sonra geniş ölçekli biyoreaktörlerde üretim işlemlerinin başlatılması doğru bir yaklaşım olacaktır.

KAYNAKLAR

- Acharya, K., Chakraborty, N., Dutta, A.K., Sarkar, S. and Acharya, R., 2011, Signaling role of nitric oxide in the induction of plant defense by exogenous application of abiotic inducers, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44 (15), 1501–1511.
- Akdemir, Ö.F, Tilkat, E., Onay, A., Kılınç, F.M., Süzerer, V. ve Çiftçi, Y.Ö. 2013, Geçmişten Günümüze Sakız Ağacı *Pistacia lentiscus* L., *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 3 (2),1-28.
- Amin Al-Gendy, A., 2016, Elicitation induced flavonoids, phenolic constituents, antioxidant and cytotoxic activities of *Artemisia monosperma* callus cultures, *Journal of Medicinal Plants Research*, 10 (40), 717.
- Aydınalp, C. and Marinova, S., 2009, The effect of heavy metals on seed germination and plant growth on alfalfa plant (*Medicago sativa*), *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 15 (4), 348-351
- Ayhan, B., Ekmekçi, Y. ve Tanyolaç, D., 2006, Bitkilerde ağır metal zararları ve korunma mekanizmaları. *Anadolu Üniversitesi Bilim Ve Teknoloji Dergisi* 7 (1), 1-16.
- Aziz, A., Trotel-Aziz, P., Dhuicq, L., Jeandet, P., Couderchet, M. and Vernet, G., 2006, Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew, *Phytopathology*, 96 (11), 1188–1194.
- Batır, M.B., Kurşun (Pb) ve Bakır (Cu) Ağır metal stresi uygulanan enginar (*Cynara scolymus* L.) tohumlarının fidelerinde oluşan dna değişikliklerinin belirlenmesi “Yüksek Lisans Tezi”, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 47s.
- Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Surmaghi, M.H.S., 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., 2007, Doğal sakız bitkileri (*Pistacia lentiscus* L.)’nin ekonomiye kazandırılması, *Ege Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi Bülteni*, Yayın Bülteni No: 51.

- Çetin, E.S. ve Baydar, N.G., 2016, Elicitor applications to cell suspension culture for production of phenolic compounds in grapevine, *Tarım Bilimleri Dergisi*, 22(1), 42-53.
- Dandin, V.S. and Murthy, H.N., 2012, Enhanced in vitro multiplication of *Nothapodytes nimmoniana* Graham using semisolid and liquid cultures and estimation of camptothecin in the regenerated plants, *Acta Physiologiae Plantarum*, 34:1381–1386.
- Demirel, R.D., 2010, Kütle spektroskopisi ve günümüz uygulamaları. Bitirme Tezi, Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, 51s.
- Dimas, K. ve Hatziantoniou, S., Wyche, J.H., Pantazis, P., 2009, A mastic gum extract induces suppression of growth of human colorectal tumor xenografts in immunodeficient mice. *In Vivo*. 23(1):63–68.
- Emamverdian, A. and Ding, Y., 2017, Effects of heavy metals' toxicity on plants and enhancement of plant defense mechanisms of Si-mediation "Review", *International Journal of Environmental & Agriculture Research*, 3 (4), 41.
- Erkoyuncu, M.T., ve Yorgancılar, M., 2015, Bitki doku kültürü yöntemleri ile sekonder metabolitlerin üretimi, *Selçuk Tar Bil Der*, 2 (1), 66-76.
- Fakhari, A. R., Salehi, P., Heydari, R., Ebrahimi, S. N., Haddad, P. R., 2005, Hydrodistillation-Headspace Solvent Microextracti On, A New Method For Analysis Of The Essential Oil Components Of *Lavandula angustifolia* Mill., *J. of Chromatography A*, 1098, 14-18.
- Garófalo Chaves, L.H., Estrela, M.A. and Sena de Souza, R., 2011, Effect on plant growth and heavy metal accumulation by sunflower, *Journal of Phytology* 3 (12), 04-09.
- Gould, K.S., 2004, Nature's Swiss Army Knife: The diverse protective roles of anthocyanins in leaves, *J. Biomed. Biotechnol.* 2004 (5), 314-320.
- Huang, C. and Zhong, J.J., 2013, Elicitation of ginsenoside biosynthesis in cell cultures of *Panax ginseng* by vanadate. *Process Biochem* 48,1227–1234.
- Kaliora, A.C., Stathopoulou, M.G., Triantafillidis, J.K., Dedoussis, G.V. and Andrikopoulos, N.K. 2007,. Chios mastic treatment of patients with active Crohn's disease, *World J Gastroenterol*, 13, 748–753.
- Kıran, S., Fatma Özkay, F., Şebnem Kuşvuran, Ş. ve Ellialtıoğlu, Ş., 2014., Ağır metal içeriği yüksek sularla sulanan patlıcan bitkilerine uygulanan humik asidin bazı

- morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikler üzerine etkisi, *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2 (6), 280-288.
- 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 Regulation*, 75, 75-78.
- Koç, E. ve İşlek, Cemil., 2015, Kadmiyumun biber (*Capsicum annuum* L.) fidelerinde fenilalanin amonyum liyaz aktivitesi ve lipid peroksidasyonu üzerine etkisi, *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 16 (1), 50-54.
- Maitani, T., Kubota, H., Sato, K. and Yamada, T., 1996, The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*, *Plant Physiol.*, 110, 1145-1150.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15(3), 473-497.
- Onay, A., Özden-Çiftçi, Y., Yıldırım, H. ve 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. ve Yavuz, A.M., 2016, Sakız Ağacı (*Pistacia lentiscus* L.) Yetiştiriciliği ve Reçinesi., *Batman Üniversitesi Yaşam Bilim Dergisi*, 3 (2), 1-28.
- Onay, A., Yıldırım, H., Altinkut Uncuoğlu, A., Özden Çiftçi, Y. and Tilkat, E., 2016, Sakız ağacı (*Pistacia lentiscus* L.) yetiştiriciliği. Edt: Oral, B., Han, B., Süer, S., Dicle Üniversitesi Basımevi, Diyarbakır, 102s.
- Palazon, J., Cusido, R.M., Bonfill, M., Mallol, A., Moyano, E., Morales, C. and Pino, M.T., 2003, Elicitation of different *Panax ginseng* transformed root phenotypes for an improved ginsenoside production, *Plant Physiol Bioch.*, 41, 1019-1025.
- Papageorgiou, V.P., Bakola-Christianopoulou, M.N., Apazidou, K.K. and Psarros, E.E. 1997, Gas chromatographic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum, *J Chromatogr*, 769, 262–273.
- 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.

- Patil, J.G., Ahire, M.L., Nitnaware, K.M., Panda, S., Bhatt, V.P. and Kisho, P.B.K., 2013, In vitro propagation and production of cardiotoxic glycosides in shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. by elicitation and precursor feeding, *Appl Microbiol Biotechnol* 97,2379–2393
- Ramachandra Rao, S. and Ravishankar, G.A., 2002, Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnology Advances*, 20, 101-153.
- Saba, P.D., Iqbal, M. and Srivastava, P.S.. 2000, Effect of ZnSO₄ and CuSO₄ on regeneration and lepidine content in *Lepidium sativum*, *Biol Plant*, 43, 253–256.
- Sandra, I., Alvarez, P., Spollansky, T.C. and Giuletta, A.M., 2000. The Influence of different biotic and abiotic elicitor on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme Microb Tech.*, 26, 252-258.
- Sharma, M., Ahuja, A., Gupta, R. and Mallubhotla, S. 2015, Enhanced bacoside production in shoot cultures of *Bacopa monnieri* under the influence of abiotic elicitors. *Nat Prod Res*;29 (8):745-9.
- Shivhare, L. and Sharma, S., 2012, Effect of toxic heavy metal contaminated soil on an ornamental plant georgina wild (Dahlia), *J Environ Anal Toxicol* 2:156.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2008, Bitki Fizyolojisi. Çev. Türkan, İ., Palme Yayınları. 455s, Ankara.
- Tumova, L. ve Ruskova, R., 1998, Effect of CdCl₂ and CuSO₄ on the production of flavonoids by the culture of *Ononis arvensis* L. in vitro, *Ceska Slovenska Farmacie* 47, 261-263.
- Vanisree, M. and Tsay, H.S., 2004, Plant cellcultures an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites, *International Journal of Applied Science and Engineering*, 2, 29–48.
- Vasconsuelo, A., Giuletta, A.M., Picatto, G., Rodriguez, J.T. and Boland, R., 2003, Involvement of the PLC/PKC pathway in Chitosan-induced anthraquinone production by *Rubia tinctorum* L. cell cultures, *Plant Sci.*, 165, 429-436.
- Vijaya Sree, N., P.V.V. Udayasri, K.Y. Aswani, B.B. Ravi, K.Y. Phani and V.M. Vijay 2010, Advancements in the production of secondary metabolites. *J. of Natural Products*. 3:112-123
- Wu, C.H., Tewari, R.K., Hahn, E.J. and Paek, K.Y., 2007. Nitric oxide elicitation induces the accumulation of secondary metabolites and antioxidant

- defense in adventitious roots of *Echinacea purpurea*, *Journal of Plant Biology*, 50, 636-643.
- Xiao, Y., Gao, S., Di, P., Chen, J., Chen, W. and Zhang, L., 2010, Lithospermic acid B is more responsive to silver ions (Ag⁺) than rosmarinic acid in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures, *Bioscience Rep.*, 30, 33-40.
- Yamaner, Ö., 2011, “*Hypericum adenotrichum* spach’un doku kültürü teknikleri ile çoğaltılması ve in vitro koşullarda sekonder metabolit değişiminin araştırılması” Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 137s.
- Yamaner, Ö., Erdağ, B. and Gökbulut, C., 2013, Stimulation of the production of hypericins in in vitro seedlings of *Hypericum adenotrichum* by some biotic elicitors, *Turk J Bot*, 37, 153-159.
- Yaoya, S., Kanho, H., Mikami, Y., Itani, T., Umehara, K. and Kuroyanagi, M., 2004, Umbelliferone released from hairy root cultures of *Pharbitis nil* treated with copper sulfate and its subsequent glucosylation, *Biosci Biotechnol Biochem*, 68, 1837–1841.
- Yıldırım, H., 2012, Micropropagation of *Pistacia lentiscus* L. from axenic seedling-derived explants, *Sci. Hort.*, 137, 29-35.
- Zou, J., Wang, M., Jiang, W., and Liu, D., 2006, Chromium accumulation and its effects on other mineral elements in *Amaranthus viridis* L, *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 48 (1), 7–12.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hatice AKKUŞ
Uyruğu : T.C
Doğum Yeri ve Tarihi : 05.01.1988
Telefon : 05432340040
Faks : -
e-mail : haticeakkus09@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı,	İlçe,	İl	Bitirme Yılı
Lise	: Gazi Lisesi,	Merkez	Batman	2006
Üniversite	: Batman Üniversitesi	Merkez	Batman	2014
Yüksek Lisans	: Batman Üniversitesi			Devam ediyor
Doktora	: -			

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2014-2015	İMKB Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi	Biyoloji Öğretmeni
2016-2017	Özel Silvan Uğur Temel Lisesi	Biyoloji Öğretmeni

UZMANLIK ALANI

-

YABANCI DİLLER

İngilizce

YAYINLAR

Akkuş, H., Ayaz Tilkat, E., Yılmaz, M.A., Çetin, Y., Bağlamış, G., Süzerer, V., Ertaş, A., Tilkat, E. and Onay, A., 2017, Effects of heavy metals elicitation on therapeutic agent production in in vitro lentisk culture, *International Green Biotechnology Congress*, 104-104.