



**T.C.**

**BATMAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI ABİYOTİK STRES  
UYGULAMALARININ *İN VİTRO* ORTAMDA  
ÇOĞALTILMIŞ JUVENİL SAKIZ AĞACI  
(*Pistacia lentiscus* L.) EKSPANTLARINDA  
TRİTERPENÖİT MİKTARLARI ÜZERİNE  
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

**Yüstra SİĞİNÇ ÇETİN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Eylül-2018  
BATMAN  
Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ KABUL VE ONAYI

Yüstra SİĞİNÇ ÇETİN tarafından hazırlanan “Bazı Abiyotik Stres Uygulamalarının *In vitro* Ortamda Çoğaltılmış Juvenil Sakız Ağacı (*Pistacia lentiscus* L.) Eksplantlarında Triterpenoit Miktarları Üzerine Etkisinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması 04/09/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

#### Başkan

Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ

#### Danışman

Doç. Dr. Emine AYAZ TİLKAT

#### Üye

Prof. Dr. Engin TİLKAT

### İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Doç. Dr. Bahattin İŞCAN  
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Tübitak 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.

İmza

Yüstra SİĞİNÇ ÇETİN

**ÖZET****YÜKSEK LİSANS TEZİ****BAZI ABİYOTİK STRES UYGULAMALARININ IN VITRO ORTAMDA  
ÇOĞALTILMIŞ JUVENİL SAKIZ AĞACI (*Pistacia lentiscus* L.)  
EKSPLANTLARINDA TRİTERPENİT MİKTARLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN  
BELİRLENMESİ****Yüstra SİĞİNÇ ÇETİN****BATMAN ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI****Danışman: Doç. Dr. Emine AYZAZ TİLKAT  
2018, 56 Sayfa****Jüri****Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ  
Prof. Dr. Engin TİLKAT  
Doç. Dr. Emine AYZAZ TİLKAT****ÖZET**

Bu çalışmanın amacı, sakız bitkisinin *in vitro* sürgün kültürlerine farklı stres (tuz, sıcaklık, ışık, UV-B) uygulamalarının bu bitkinin ekstraktlarında doğal olarak bulunan başta antikanser olmak üzere çok sayıda tıbbi etki gösterdiği bilinen bazı triterpenoit yapıdaki sekonder metabolitlerin miktarlarının arttırılması üzerine etkisinin araştırılmasıdır. Söz konusu stres uygulamalarına *in vitro* koşullarda maruz bırakılan *Pistacia lentiscus* L'ün sürgün kültürlerinde bu metabolitlerin iz miktarlardan gram seviyelerine kadar arttırılabilme yollarının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu bağlamda *in vitro* kültür uygulamalarında öncelikle yüzey sterilizasyonu yapılan sakız ağaçlarına ait tohumlar 1mg/l IBA destekli MS besi ortamında çimlendirilmiş, elde edilen juvenil sürgünler 1 mg/l BAP, 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> ile destekli MS besi ortamında proliferere edilmiştir. *In vitro* çoğaltılan aksenik sürgünlerden yaklaşık 1 cm boyunda alınan eksplantlar düşük ve yüksek sıcaklık (4 ve 37 °C); aydınlık ve karanlık; farklı miktarlarda tuz (25, 50 ve 100 mg/l olmak üzere 3 farklı oranda) ve 5 gün boyunca 15, 30 ve 45 dk süreyle UV-B uygulamalarına maruz bırakılarak kültüre alınmıştır. Yapılan tüm denemelerde 30 gL<sup>-1</sup> sukroz ile desteklenmiş 1mgL<sup>-1</sup> BAP ve 0,5 mgL<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> içeren MS (Murashige Skoog,1962) bazal besi ortamı kullanılmıştır. Kültür başlangıcından itibaren 28 gün sonra gövde ile yaprak kısımları oda sıcaklığında kurutularak etanol ekstraktları hazırlanmış ve LC-MS/MS analizleri yapılmıştır.

Elisitasyon uygulamalarının sürgün gelişimi ile triterpenoit içeriğinin değişimi üzerine olan etkisinin araştırıldığı çalışmada;15 dk UV-B uygulamasının juvenil yaprak ekstraktlarında kontrol grubunda bulunmayan Mastikadienolik asit miktarını 0,012 ppm seviyesine yükselttiği tespit edilmiştir. Yine 25 mg/l NaCl uygulamasının gövde ekstraktlarında kontrol grubunda hiç bulunmayan Ursolik asit miktarını 0,028 ppm seviyesine; bunun yanısıra 4°C düşük sıcaklık uygulaması Ursonik asit miktarını ise gövde ekstraktlarında 0,037 ppm seviyesine; yaprak ekstraktlarında ise 25 mg/l NaCl uygulamasının 0,015 ppm seviyesine yükselttiği tespit edilmiştir. Sürgün gelişimlerine ait morfolojik gözlemlere bakıldığında ise stres uygulamalarının gövde sayısını, yaprak ve gövde kuru ağırlığını azalttığı, özellikle yapraklarda klorozis, sararma ve kırmızılaşmalara yol açtığı görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** *Pistacia lentiscus* L., *in vitro*, stres, triterpenoitler

**ABSTRACT****MSc THESIS****EFFECTS OF SOME ABIOTIC STRESS CONDITIONS ON ASSESSMENT OF TRITERPENOIDS AMOUNTS IN *IN VITRO* JUVENILE LENTISK (*Pistacia lentiscus* L.) SHOOT CULTURE****Yüstra SİĞİNÇ ÇETİN****THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF  
BATMAN UNIVERSITY  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOLOGY****Advisor: Assoc. Prof. Dr. Emine AYZAZ TİLKAT  
2018, 56 Pages****Jury****Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ  
Prof. Dr. Engin TİLKAT  
Assoc. Prof. Dr. Emine AYZAZ TİLKAT****ABSTRACT**

The purpose of this study, in vitro shoot cultures of different stress gum plants (salt, temperature, light, UV-B) applications, this plant anticancer naturally present in the extract and antihelikobakt illustrate some triterpenoids feature known to act to investigate the effect of increasing the amount of secondary metabolites. This study aimed to investigate the ways to be able to increase the stress application in said exposed in vitro shoot cultures of *Pistacia lentiscus* L. level of up to gram quantities of these metabobolit track.

In this context, seeds of surface-sterilized mastic tree were first germinated in an MS medium supplemented with 1 mg/l IBA, and the obtained juvenile shoots were proliferated in MS medium supplemented with 1 mg/l BAP, 0.5 mg/l GA<sub>3</sub>. Explants taken about 1 cm in length from in vitro proliferated axenic shoots were cultured in low and high temperature (4 and 37 ° C); light and dark; UV-B irradiation for 5, 15, 30 and 45 minutes for 5 days and salt (3 different doses, 25, 50 and 100 mg/l). MS (Murashige Skoog, 1962) basal medium supplemented with 1 mg/l BAP and 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> supplemented with 30 g/l sucrose was used in all experiments. 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.

In the study of the effects of elicitation on shoot growth and triterpenoid content change, it was determined that 15 min UV-B application increased the amount of Masticadienolic acid in juvenile leaf extracts not present in the control group to 0.012 ppm level. In the stem extracts of 25 mg/l NaCl, the amount of Ursolic acid, which is not present in the control group, is about 0.028 ppm; in addition, low temperature application at 4°C resulted in a level of Ursolic acid of 0.037 ppm in stem extracts; leaf extracts increased the level of 25 mg/l NaCl to 0.015 ppm. When morphological observations of shoot growth were taken into consideration, it was seen that stress application reduced the number of hulls, leaf and stem dry weight, especially chlorosis, redness and redness in leaves.

**Key words:** *Pistacia lentiscus* L., *in vitro*, stress, triterpenoids.

## ÖNSÖZ

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve tüm çalışmalar boyunca yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Emine AYAZ TİLKAT'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Doku kültürü çalışmalarını gerçekleştirebilmem için Batman Üniversitesi Biyoloji Araştırma Laboratuvarının kapılarını ardına kadar açan ve çalışmalarım 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 Öğr. Gör. Veysel SÜZERER'e, çalışmaların her aşamasında yardımlarını esirgemediğinden dolayı çok teşekkür ederim. Maddi ve manevi her zaman yanımda olan, desteğini esirgemeyen eşim Haluk ÇETİN'e ve her zaman yanımda olan tüm aile fertlerine fedakârlığından dolayı çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Tübitak tarafından, 114Z842 nolu proje ile desteklendiğinden Türkiye Bilim Teknik Araştırma Kurumu'na da ayrıca teşekkür ederim.

Yüstra SİĞİNÇ ÇETİN  
BATMAN-2018

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>v</b>
<b>ÖNSÖZ .....</b>	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER .....</b>	<b>vii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR.....</b>	<b>viii</b>
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....</b>	<b>5</b>
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>10</b>
3.1. Materyal .....	10
3.1.1. Bitkisel materyal .....	10
3.2. Yöntem.....	12
3.2.1. Doku kültürü ön hazırlık uygulamaları.....	12
3.2.2. Doku kültürü uygulamaları.....	14
3.2.3. Sekonder metabolitler .....	16
3.2.4. Terpen yapıdaki bileşenlerin analizi .....	19
3.2.5. İstatistiksel analizler .....	21
<b>4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA .....</b>	<b>22</b>
4.1. Doku kültürü uygulamalarına ait sonuçlar ve tartışma .....	22
4.2. Abiyotik stres uygulamalarına ait sonuçlar ve tartışma.....	22
4.2.1. Farklı sıcaklık elisitasyonuna ait sonuçlar.....	23
4.2.2. Farklı ışık elisitasyonuna ait sonuçlar .....	25
4.2.3. Farklı konsantrasyonlarda tuz (NaCl) elisitasyonuna ait sonuçlar .....	26
4.2.4. Farklı sürelerde UV-B ışını elisitasyonuna ait sonuçlar .....	28
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>34</b>
<b>5.1 Sonuçlar .....</b>	<b>34</b>
<b>5.2 Öneriler .....</b>	<b>35</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>36</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

°C	: Santigrat derece
2,4-D	: 2,4 Diklorofenoksi asetik asit
AlCl <sub>3</sub>	: Alüminyum klorür
BAP	: Benzil amino pürin
BBD	: Bitki büyüme düzenleyicileri
CaCl <sub>2</sub>	: Kalsiyum klorür
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	: Kalsiyum klorür dihidrat
CHN	: Kitosan oligomerleri
cm	: Santimetre
CoCl <sub>2</sub>	: Kobalt klorür
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	: Kobalt klorür heksahidrat
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	: Bakır sülfat pentahidrat
dk	: Dakika
FeSO <sub>4</sub>	: Demir sülfat
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	: Demir sülfat heptahidrat
g/l	: Gram/litre
GA <sub>3</sub>	: Gibberellik asit
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
gr	: Gram
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	: Borik asit
HCl	: Hidrojen klorür
IAA	: Indol asetik asit
IBA	: İndol bütirik asit
IPP	: İzopentil pirofosfat
JA	: Jasmonik asit
kg	: Kilogram
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	: Potasyum dihidrojen fosfat
KI	: Potasyum iyodür
Kin	: Kinetin
KNO <sub>3</sub>	: Potasyum nitrat
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografisi-Kütle spektrometresi
MeJA	: Metil jasmonat
mg	: Miligram
mg/l	: Miligram/litre
MgSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	: Magnezyum sülfat tetrahidrat
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	: Magnezyum sülfat heptahidrat
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	: Mangan sülfat tetrahidrat
MS	: Murashige ve Skoog
Na <sub>2</sub> EDTA	: Sodyum etilen diamin tetra asetik asit
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	: Sodyum molibdat dihidrat
NAA	: Naftalen asetik asit
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
NaOH	: Sodyum hidroksit
NH <sub>4</sub> NO	: Amonyum nitrat
NO	: Nitrik oksit
PAL	: Fenilalanin amonyum liyaz
pH	: Hidrojen iyon konsantrasyonu



RA	: Rosmarinik asit
s	: Saat
Sn	: Saniye
TDZ	: Thidiazuron
UHPLC	: Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi
UV	: Ultraviyole
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	: Çinko sülfat heptahidrat
µM	: Mikromolar



## 1. GİRİŞ

Pek çok yüksek bitki, birbirinden çok farklı yapı ve fonksiyonlara sahip, sıcaklık, tuzluluk, ultraviyole (UV) ışınları ve kuraklık gibi farklı stres ortamlarına karşı koyma, mikroorganizmalar ile herbivora karşı savunma ve böceklerle tozlanan bitkilerde tozlanma sırasında böcekleri kendine çekme gibi birçok önemli olayda rol oynayan çeşitli sayı ve yapıdaki sekonder metabolitleri bünyesinde biriktirir. Sekonder metabolitler (fitokimyasallar), biyosentez mekanizmalarına göre terpen veya terpenoitler, fenolik bileşikler ve azot içeren sekonder metabolitler şeklinde kategorize olan, ekonomik, tıbbi, endüstriyel ve zirai kullanımları başta olmak üzere birçok sektörde yaygın kullanıma sahip, çeşitli bilimsel, teknolojik ve ticari uygulamalar için ham madde kaynağı olabilen organik bileşiklerdir (Murthy ve ark., 2014). Fitokimyasallar doğal olarak tarımsal yöntemlerle de elde edilebilirler. Ancak, tarımsal üretim, pek çok bitki için mevsimsel olduğu gibi, coğrafi konuma, iklim ve büyüme koşullarına da bağlılık gösterir. Doğadan toplama sırasında karşılaşılan problemlerin uzaklaştırılması, iş gücünün azalması ve ana bitkide normal şartlarda üretilmeyen yeni metabolitlerin sentezine imkân vermesi nedeniyle, değerli sekonder metabolitlerin bitkinin hücre ve dokularından biyoteknolojik yöntemler kullanılarak üretilmesi alternatif bir yol olarak öne çıkmaktadır. Yaklaşık 50.000 tanımlanmış sekonder metabolit bulunmakla birlikte, günümüze kadar bitki doku kültürleri aracılığı ile 30.000'den fazla biyoaktif kimyasal bileşik üretilmiştir (Güven ve Gürsul 2014). Biyoteknolojik yöntemlere ek olarak biyotik ve abiyotik stres kaynakları gibi elisitörlerin veya öncül bileşiklerin kullanılması, metabolit miktarının arttırılmasında başarılı sonuçlar alınmasını sağlamıştır.

Elisitörler ya da öncül bileşikler (metil jasmonat, jasmonik asit, maya ekstraktları, tuz vb), genellikle besi ortamına ilave edilerek veya ortam koşullarının değiştirilmesiyle (sıcaklık, ışık, UV ışını vb.) herhangi bir bitkiye ait sekonder metabolitlerin miktarlarının artmasına yol açabilir. Literatürde *in vitro* şartlarda yetiştirilen bitkilere, çeşitli stres koşullarının uygulanmasıyla sekonder metabolit üretiminin artış gösterdiği birçok çalışma mevcuttur (Akkuş ve ark., 2017, Xu ve ark., 2015, Fatima ve ark., 2015, Chan ve ark., 2010, Jochum ve ark., 2007). Yapılan çalışmalar sonucunda, kök, embriyo ve sürgün kültürleri gibi farklılaşmış dokuların sekonder metabolit üretiminde yüksek kapasiteye sahip oldukları tespit edilmiştir (Aghighi Shahverdi ve ark., 2017; Valifard ve ark., 2014; Namlı ve ark., 2014). Hatta sürgün kültürlerinde kallus ve hücre süspansiyon kültürleri gibi farklılaşmamış dokulara

kıyasla metabolit üretimi daha yüksek olmakta, bazen üretilen madde miktarı ana bitkininkinden bile daha fazla olabilmektedir (Erkoyuncu ve Yorgancılar 2015).

Bitkilerin stres faktörlerine karşı olan toleransında bitkinin genotipi ve gelişim dönemi, stres çeşidi, strese maruz kalma süresi ve stres uygulanan bitkinin doku veya organın yapısı etkili olmakla birlikte, bitkide fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler bazı değişikliklere neden olmaktadır. Biyotik veya abiyotik olsun hemen hemen tüm stres kaynakları bitki bünyesinde sekonder metabolitler adı verilen savunma mekanizmasını da harekete geçirmektedir. Ultraviyole (UV) ışığı da sekonder metabolitlerin biosentezini uyaran abiyotik faktörden biri olup UV-C (280 nm'nin altındaki dalga boyları), UV-B (280- 315 nm) ve UV-A (315-400 nm) olmak üzere üç bölgeye ayrılmaktadır. UV-C dalga boyunun diğerlerine oranla daha kısa olmasından ötürü toksik etkilere sahiptir. Ancak neredeyse tamamen stratosfer tarafından emilir. Buna karşılık, UV-B radyasyonu stratosferik ozon tabakası tarafından kısmen emilmekle birlikte UV-A ise hiç emilmez. Bu bakımdan hem UV-A hem de UV-B radyasyonu, bitkiler için bir stres faktörü olarak görülmüştür. UV-B'nin, bitkinin ikincil metabolizmasında, flavonoidler ve glukosinolatlar gibi fenolik bileşiklerin birikimi ile sonuçlanan farklı değişiklikleri tetiklediği bildirilmiştir (Schreiner ve ark., 2016). Bir diğer stres çeşidi olan tuz stresi, pratikte Na<sup>+</sup> ve Cl<sup>-</sup> gibi iyonların fazlalığı olarak tanımlanır. Yeryüzünde doğal olarak kıyı tuz bataklıkları (özellikle nehir ağzı ile haliçler) ve çöller yüksek oranda tuz içerirler. Bunların dışında uzun süreli ve çok sulanan zirai alanlarda da tuzlanma görülür. Kurak bölgelerde sulama yoğun olduğundan, evapotranspirasyon adı verilen ve evaporasyon ve transpirasyonun karışımından oluşan bir su kaybı vardır. Toprak çözeltisindeki aşırı miktarda bulunan çözülebilir tuzlar, bitkilerin sudan yararlanabilirliğini azaltmaktadır (Yılmaz ve ark., 2011). Tuz stresi, bitkilerde çimlenme ve canlılık değerlerini düşüren, hatta stresin yoğunluğu ve süresine bağlı olarak bitkinin tamamen canlılığını yitirmesine neden olan, morfolojik özellikler ile başta fotosentez ve solunum olmak üzere birçok fizyolojik olayı olumsuz yönde etkileyen ve bütün bunların sonucu olarak da büyüme, gelişme ve verimde kayıpların ortaya çıkmasına neden olan önemli bir stres faktörüdür. Bunun yanı sıra tuzluluk sekonder metabolit birikimini de etkilemekte olup bu bileşenler üzerinde farklı şekillerde etkide bulunduğu belirlenmiştir (Baydar ve Çoban, 2017). Türkiye'de sulanan alanların yaklaşık %32,5'inde tuzluluk probleminin bulunduğu bildirilmektedir (Ekmekçi ve ark., 2005). Bitki büyüme ve gelişmesi ile verimini etkileyen önemli diğer faktörlerden biri de yüksek sıcaklıktır. Bitkilerin farklı gelişme kademelerinde farklı

minimum, maksimum ve optimum sıcaklık gereksinimleri vardır. Bunlara kardinal sınırları denir. Sıcaklık bu limitlere ulaştığında ise gelişme azalır ve bu limitler dışında daha fazla gelişme olmaz (Çil, 2006).

Sakız ağacı (*Pistacia lentiscus* L.) herdem yeşil, kuraklığa dayanıklı, dioik ve çalı formunda odunsu bir bitki olup Ege ve Akdeniz bölgelerinde doğal olarak yayılış gösteren ve Anacardiaceae familyasının *Pistacia* cinsine ait on dört üyesinden biridir (Onay ve ark., 2016; Stevens 2008). Sakız ağacı ülkemizde, Akdeniz ve Ege bölgelerinde doğuda ise Hatay'a kadar maki vejetasyonu içerisinde yayılış gösterir. Dünya'da ise, Mısır ve Sina yarımadası dışında bütün Akdeniz ülkeleri ve batıda Kanarya Adalarına kadar deniz seviyesinden 500 m'ye kadar varan yükseklikte sahil bölgelerindeki maki formasyonunda doğal yayılışa sahiptir (Zohary, 1952; Davis, 1967). *P. lentiscus*'un yayılış alanı oldukça geniştir (**Şekil 1.1**), ancak sakız üretimi sadece Sakız Adası'nın güneydoğu kesimleri ve bu bölgenin tam karşı sahilinde bulunan Çeşme ilçesindeki belirli yörelerde yer alan *P. lentiscus* var. chia'nın erkek ağaçlarından elde edilmektedir (Acar, 1988).

**Şekil 1.1.** Ülkemizde ve Ege Denizi'nde bulunan Yunan adalarında *P. lentiscus* L. yetiştiği tespit edilen bölgeler (Onay ve ark.,2014).



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, antiinflamatuvar, antihelikobacter pilori aktivitesi, antiatherogenik, antitumor, yara

iyileştirici, karaciğer koruyucu, antiproliferatif, proapoptotik, tansiyon düşürücü ve antikanser gibi) kullanıldığı uzun zamandan beri bilinmektedir (Marone ve ark., 2001; Akdemir ve ark., 2015; Dimas ve ark., 2009). Bitkinin gövdesine atılan çiziklerle elde edilen reçineye mastik sakızı ismi verilmektedir ve elde edilen bu metabolitin şu ana kadar bilinen 60 farklı kullanım alanı vardır (Onay ve ark., 2014). Bunlar arasında, uçucu yağları Mısır, Eski Yunanlılar ve Romalılar tarafından mide yanması, kuduz hastalığı, uyuz ve yılan ısırıkları, bağırsak, akciğer hastalıkları, boğaz ağrısı, egzama, mide ağrısı, böbrek taşları, sarılık ve değişik diş hastalıklarında uzun yıllar tedavi edici olarak kullanılmışken, Tunus ve Cezayir gibi bazı ülkeler besinlerde, salatalarda ve hamur işlerinde kullanmışlardır. Ayrıca kozmetik ve parfümeride, farmasötik şirketler hap, kapsül ve kendinden emici cerrahi sütür üretiminde kullanmıştır. (Karakır ve İsfendiyaroğlu, 1993; Ljubuncic ve ark., 2005; Anonim, 2008).

Yapılan literatür incelemelerinde günümüze kadar gıda sektöründen, ilaç, boya ve gemi inşaat sanayisine kadar geniş bir kullanımı söz konusu olan ticari değeri yüksek değerli sekonder metabolitleri bünyesinde barındıran *Pistacia* cinsine ait türlerde sekonder metabolitlerin arttırılması ile ilgili yapılmış sadece bir çalışma bulunmakta olup bu çalışmada ağır metal elisitasyonunun etkisi araştırılmıştır.

Bu çalışmada ise, amacımız *Pistacia lentiscus* bitkisinin *in vitro* sürgün kültürleri üzerine bazı abiyotik stres faktörleri (sıcaklık, ışık, tuz ve UV-B ışını) uygulayarak antikanser özellik gösteren triterpenoit yapıdaki bazı sekonder metabolitlerin üretiminin arttırılmasıdır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

**Rivero ve ark., (2001)** yaptıkları çalışmada *Lycopersicum esculentum* L.cv. Tmknvf2 (Domates) ve *Citrullus lanatus* [Thomb.] Mansf. Dulcemaravilla (Karpuz) bitkilerini, 30 gün boyunca farklı sıcaklıklarda (15, 25 ve 35°C) yetiştirmiş ve domates bitkilerinde ısı stresinin 35°C'de, karpuz bitkilerinde ise üşüme stresinin 15°C'de meydana geldiğini belirtmişlerdir. Her iki bitkide de termal stresin sürgün ağırlığının azalmasına, fenol birikimine, yüksek fenilalanin amonyum liyaz aktivitesi ve düşük peroksidaz ve polifenoloksidaz aktivitesine yol açtığını bildirmişlerdir.

**Liu ve ark., (2002)** *Artemisia annua* L'nin saçak kök kültürlerinde artemisin üretimi ve bitkinin büyümesi üzerine ışığın etkisini incelenmişlerdir. Saçak kökler soğuk beyaz floresan lamba kullanılarak 16 saat 3000 lüks aydınlatma altında kültüre alınmış daha sonra 8 saat karanlık altında bekletildiğinde kuru ağırlık ve artemisin konsantrasyonunun sırasıyla 13.8 g/l ve 244.5 mg/l'ye ulaştığını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak ışık koşullarının iyileştirilmesinin artemisin birikimi ve büyümeyi arttırdığını bildirmişlerdir.

**Hemm ve ark., (2004)** yaptıkları çalışmada mutant *Arabidopsis* bitkilerinde ışığın kök sekonder metabolizmasını indüklediği mekanizmayı ve fenilpropanoid üretimi bakımından yanıtlarını incelemişlerdir. Sonuç olarak fitokrom (PHY) B ve kriptokrom (CRY) 2'nin ışığa bağımlı fenilpropanoid birikiminde rol oynayan birincil fotoreseptörler olduğunu ve bu yanıt için hipokotil uzamasında görev yapan (HY5) transkripsiyon faktörünün de gerekli olduğunu bildirmişlerdir. *Arabidopsis* köklerinde koniferin, siringin ve flavonoidlerin birikiminin yüksek yoğunluklu ışığın cevabı (HIR) olduğunu ileri sürmüşlerdir.

**Yu ve ark., (2005)** yaptıkları çalışmada, *Panax ginseng*'in saçak kök kültürlerinde, sıcaklık ve ışık kalitesinin biyokütle ve ginsenosid üretimi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Biyokütle birikiminin en yüksek karanlık veya koyu kırmızı ışık altında yetiştirilen kültürlerden, ginsenosid birikiminin ise floresan ışığı altında yetiştirilen kültürlerden elde edildiğini, optimum fotoperiyodun ise 20 °C/13 °C ışık (12 saat) /gece (8 saat) olduğunu bildirmişlerdir.

**Jochum ve ark., ( 2007)** Kuzey Amerika'nın yaprak dökken ormanlarında yaşayan endemik olan bir bitki olan üç yıllık *Panax quinquefolius* fidesi 25/20°C (gündüz / gece)'de veya 30/25°C (gündüz / gece)'de bir büyüme mevsimi süresince serada yetiştirilmiş ve her ay analiz edilmiştir. Yüksek sıcaklık altında yetişen bitkilerin daha

erken yaprak senesensi gösterdiğini ve doğal olarak daha az karbon biriktirdiğini gözlemlemişlerdir. Mayıs'tan temmuza kadar yüksek sıcaklıkta yetişen bitkilerde düşük sıcaklıklarda yetiştirilen bitkilere kıyasla fotosentezi (%52), stoma iletkenliğini (%60) ve kök ve toplam biyokütleyi (sırasıyla %33 ve %28) azalttığını, bir kış geçiren yüksek sıcaklıkta yetiştirilen bitkilerin düşük sıcaklıkta yetiştirilenlere kıyasla daha düşük kök biyokütlesi (%53) oluşturduğunu, *Panax quinquefolius* bitkisinin açık bir şekilde 5°C'lik sıcaklık artışlarına oldukça duyarlı bir bitki olduğunu belirtmişlerdir.

**Simões ve ark., (2009)** *Cleome rosea*'nın kallus kültürlerinde sıcaklık (24 ±2°C ve 32 ±2°C) ve ışık (67 ve 80 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) yoğunluğunun antosiyanin içeriği üzerine etkisi incelemişler ve antosiyanin üretiminin, sıcaklığın düşmesi ve ışık şiddetinin artmasıyla yükseldiğini bildirmişlerdir.

**Ajungla ve ark., (2009)** *Datura metel* L.'de yaprak kökenli kök kültürlerini 1.2 μM IAA içeren B5 besi ortamında kültüre almışlar, biyotik (*Aspergillus niger*, *Alternaria* sp., *Fusarium moniliforme* ve maya ekstraktı) ve abiyotik elisitörlerin (salisilik asit, AlCl<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaCl ve Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) büyümesi veyhoscyamine ve scopolamine gibi tıbbi öneme sahip tropan alkaloidlerinin üretimi üzerine etkisini araştırmışlardır. Kontrol kök kültürlerindeki hiyosiyamin ve skopolamin içerikleri sırasıyla 1,39 mg/g dw ve 0,069 mg/g dw iken, en yüksek Hiyosiyamin (4.35 mg/g dw) ve skopolamin (0.28 mg/g dw) birikimini 500 uM salisilik asit, akabinde 0.75 g L<sup>-1</sup> maya ekstraktı (3.17 mg/g dw Hiyosiyamin ve 0.16 mg/g dw skopolamin) ve 250 uM AlCl<sub>3</sub> (2.49 mg/g dw hyoscyamine ve 0.11 mg/g dw skopolamin) ile muamele edilmiş kültürlerden elde edildiğini rapor etmişlerdir.

**Khatami ve Ghanati (2011)** *Malva neglecta*'nın yaprak eksplantlarından *in vitro* kallus hücrelerinde UV-B ve UV-C'nin UV absorblayan bileşenler (flavonoid, antosiyanin, tannin) üzerine etkilerini araştırmışlardır. Kalluslar farklı UV radyasyon dozlarına (UV-B için: 144, 288, 432, 576, 720, 864, 1296, 1728 j/m<sup>2</sup> UV-C için: 204, 408, 612, 816, 1020, 1284, 1836, and 2448 j/m<sup>2</sup>) maruz bırakılmıştır. UV uygulanmış hücrelerin flavonoid ve antosiyanin seviyeleri kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. Kateşin gibi tanenlerin kontrole kıyasla UV-C ve UV-B'nin daha uzun süre maruz bırakılan dozlarında arttığı rapor edilmiştir. Sonuç olarak UV'ye maruz kalan hücrelerin kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında yaşama oranlarının düştüğü belirtilmiştir.

**Abbaspour ve ark., (2012)** üç antepfıstığı çeşidinde (Akbari, Ouhadi ve Kaleghouchi) farklı konsantrasyonlarda tuz stresinin büyüme performansları ile bazı fizyolojik

parametreleri üzerine yanıtlarını araştırdıkları çalışmada, artan tuz dozlarının üç çeşitte de büyüme performanslarını düşürdüğünü ortaya çıkarmıştır. Akbari kültüründe, yüksek tuz dozlarında diğer iki kültüvare göre önemli ölçüde daha yüksek pigment miktarı görüldüğü, Akbari çeşidinde yüksek ve orta derecedeki tuzluluğun toplam çözünebilir şeker miktarını arttırdığı diğer iki çeşit arasında ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik görülmediği, düşük ve orta düzeyde tuzluluğun diğer iki çeşit ile karşılaştırıldığında Akbari çeşidinde potasyum konsantrasyonunu arttırdığı bu nedenle, incelenen parametreler bakımından Akbari çeşidinin daha yüksek tuz toleransına sahip olduğu bildirilmiştir.

**Valifard ve ark., (2014)** *Salvia mirzayanii*'nin yeşil aksamalarında farklı tuz konsantrasyonlarının (0.40, 2.3, 4.5, 6.8 ve 9.1 dS m<sup>-1</sup>), total fenol içeriği, antioksidan aktiviteleri ve uçucu yağ bileşenleri üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada tuz konsantrasyonundaki artışa paralel olarak toplam fenol içeriğinin arttığı bildirilmiştir. Artışın, orta derecede tuzluluk (6.8 dS m<sup>-1</sup>) oranında daha belirginleştiği, en yüksek antioksidan aktivitenin 6.8 dS m<sup>-1</sup> tuz konsantrasyonundan elde edildiğini ve  $\alpha$ -terpinyl asetat, 1,8-sineol ve bisiklogermakren gibi uçucu bileşenlerin arttığını rapor etmişlerdir.

**Namlı ve ark. (2014)**, *in vitro* ve *in vivo* şartlarda *Hypericum retusum* Aucher üzerine farklı sürelerde (15, 30, 45 ve 60 dk) uygulanan UV-B ışının bitkilerin total fenolik, flavonoid ve hiperisin birikimi üzerine etkisinin araştırıldığı ve karşılaştırılmasını yaptıkları çalışmada, öncelikle bitkinin tohumlarını *in vitro* koşullarda MS besi ortamında çimlendirmiş ve elde edilen sürgünleri 0.5mg/L BA ilave edilmiş MS besi ortamında çoğaltmışlardır. Buna göre *in vitro* yetiştirilen bitkiler için en yüksek total fenolik, flavonoid ve hiperisin birikiminin her iki grup için de 45 dk.'lık UV-B ışını uygulamasından elde edildiği, ayrıca *in vitro* yetiştirilen bitkilerin söz konusu parametreler bakımından daha yüksek sonuçlar verdiğini rapor etmişlerdir.

**Fatıma ve ark., (2015)** *Catharanthus roseus* L.(G). Don' da elisitör olarak kullanılan NaCl uygulaması ile vinblastin ve vincristin sentezinin önemli derecede arttığını belirtmişlerdir. *In vitro* üretilen çok sayıda embriyojenik doku tuz stresi altında alkaloid sentezini arttırmak amacıyla kültüre alınmıştır. Farklı tuz konsantrasyonları [kontrol (0 mM), NT1 (25 mM), NT2 (50 mM), NT3 (75 mM), NT4 (100 mM) ve NT5 (125 mM)], MS kültür ortamına eklenmiş ve kallusların biyokütlelerindeki değişiklikler (taze ve kuru ağırlık) ile embriyojenik dokuların çeşitli aşamalarındaki biyokimyasal özellikleri incelemişlerdir. Kallus biyokütlelerinde maksimum azalma 125 mM NaCl konsantrasyonlarında görüldüğü rapor edilmiştir. Ek olarak farklı NaCl dozlarının



antioksidan enzimler [süperoksitdismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz ve glutatyon redüktaz] üzerine etkilerinin araştırdığı çalışmada artan tuz konsantrasyonlarına paralel olarak antioksidan enzim aktivitelerinin arttığını rapor etmişlerdir.

**Çetin ve Baydar (2016)** *Vitis vinifera* L. 'ya ait Kalecik Karası ve Öküzgözü kültivarları hücre süspansiyon kültürlerinde fenolik bileşiklerin üretimi üzerine 0,1 ve 1.5 mM kadmiyum sülfat ( $\text{CdSO}_4$ ), 0 ve 10  $\mu\text{M}$  metil jasmonat (MeJA) ve 0, 0.20 ve 0.25 M sakaroz uygulamalarının etkilerini araştırmışlardır. 1.5 mM  $\text{CdSO}_4$  ve 1.0 mM MeJA uygulamasının iki kültivarlarda da en yüksek fenolik üretime, özellikle Kalecik Karası'nın 1.5 mM  $\text{CdSO}_4$  uygulaması en yüksek toplam fenolik ( $3.144 \text{ mg g}^{-1}$ ), antosiyanin ( $1.672 \text{ CV g}^{-1}$ ) ve trans-resveratrol ( $3.650 \mu\text{g g}^{-1}$ ) oluşumuna, 10  $\mu\text{M}$ 'de MeJA uygulamasının Öküzgözü'nde en yüksek transresveratrol birikimine ( $11.681 \mu\text{g g}^{-1}$ ) ve 0.20 M sukroz uygulamasının Kalecik Karası'nda en yüksek toplam fenolik ( $4.215 \text{ mg g}^{-1}$ ) ve trans-resveratrol ( $7.550 \mu\text{g g}^{-1}$ ) ile en çok antosiyanin oluşumuna yol açtığını bildirmişlerdir.

**Akkuş ve ark., (2017)** *P.lentiscus* L. in vitro juvenil sürgünlerine uyguladıkları farklı ağır metal elisitasyonu çalışmalarında, yaprak ve gövde ekstraktlarının antikanser özelliği bilinen Ursonik, Moronik, Oleonik, Mastikadienolik, Leonolik 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.

**Sirhindi ve ark., (2017)** 130 mM tuz stresine maruz bıraktıkları 7 günlük *Vigna radiata* fiderinde jasmonik asit (JA) 'nın toplam fenolik, flavonoid bileşiklerin kantitatif ve kalitatif analizi ile fizyo-biyokimyasal özellikleri ve fenilalanin amonyum liyaz (PAL) aktivitesi üzerindeki etkisini incelenmişler, sonuç olarak tuz uygulamasının kök ve sürgün uzunluğunu ve klorofil içeriğini azalttığını, ancak JA'nın eksojen uygulamasının hem kök hem de sürgün uzunluğunu iyileştirdiğini ve PAL aktivitesini arttırdığını, böylece toplam fenol ve flavonoid seviyelerini de yükselttiğini belirtmişlerdir.

**Aghighi Shahverdi ve ark., (2017)** yaptıkları çalışmada 62 gün boyunca 6 farklı tuz konsantrasyonuna (0, 30, 60, 90, 120 ve 150 mM) maruz bıraktıkları *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinde en yüksek Steviosid (Stev) ve Rebaudiosid-A (Reb-A) diterpenlerinin ifadesinin 30 mM tuz konsantrasyonundan elde edildiğini rapor etmişlerdir

**Karimi ve Sadeghi-Seresht, (2018)** Antep fıstığı için ana olarak kullanılabilen ve *Pistacia* cinsinde doğal bir melez olarak kabul edilen Banebaghi eşidi üzerinde tuzluluk stresinin büyüme indeksleri, fizyolojik parametreler ve element konsantrasyonu etkilerini araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, tuzluluğun su içeriği ve su kullanım verimliliğini, fidelerin kuru ağırlığı ile kökün taze ve kuru ağırlığını düşürdüğü, kök ve sürgünlerde Na içeriğini arttırdığını rapor etmişlerdir.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bitkisel materyal

Sakız bitkisi için materyal kaynağı olarak, İzmir'in Çeşme ilçesinde bulunan Çiftlikköy beldesi civarında doğal olarak yetişen dişi ağaçlardan elde edilen tohumlar kullanılmıştır (Şekil 3.1). Kültür başlatma çalışmaları için, tohumlar kuru plastik kaplar içinde laboratuvara getirilerek kültüre alınana kadar +4°C' de buzdolabında muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. (A).Çeşme ilçesinin Çiftlikköy civarında doğal olarak yetişen dişi *P. lentiscus* L. ağacı genel görünümü (B). Laboratuvara getirilip temizlenmiş ve muhafaza edilmeye hazır tohum içeren meyveler (C). Ekzokaplarından arındırılmış tohum içeren meyveler.

##### 3.1.1.1. Sakız ağacının morfolojik özellikleri

###### 3.1.1.1.1. Kök yapısı

Sakız bitkisi genç iken kazık kök ve yan köklere, yetişkin evrede ise oldukça geniş yan kök ve saçaklarla sahiptir (Kılınç, 2013).

###### 3.1.1.1.2. Gövde yapısı

Çalı veya ağaççık formundaki sakız ağacı, genellikle 1-3 m boyunda bazen 10 m'ye kadar uzayabilen bir bitkidir. Gövdesi düz değildir. Genç iken açık gri renkte olgunlaştığında ise kül karası renkte ve "riknides" adıyla anılan çizgilerle kaplı pürüzlü bir yapıya sahiptir (Kılınç, 2013)

###### 3.1.1.1.3. Çiçek yapısı

Dioik bir tür olan sakız ağacında, 1 yıllık sürgünlerin yaprak koltuklarında periant içermeyen çiçekler bulunur. Çok sayıda çiçek üretimi söz konusu olan sakız ağacında çiçeklenme bahar aylarında gerçekleşmektedir. Çiçekleri salkım halinde kümelenmiş küçük, kırmızımsı veya sarımsıdır. Dişi çiçekler 1-3 cm uzunlukta seyrek

dallanmış salkımlar, erkek çiçekler ise 1-2.5 cm uzunlukta bileşik salkımlar halindedir (Palli ve Aronne, 2000; Kılınç, 2013).

#### 3.1.1.1.4. Meyve yapısı

Başlangıçta kırmızı, olgunlaştığında ise siyah renkte yuvarlak, basık ve sivri uçlu, 4-7 mm çapında drupa tipi olan meyveler, kemiksi bir endokarp ve etli-sulu bir mezokarpa sahiptir. Meyveler ekim sonu ile aralık ayı ortasına kadar olgunlaşmaktadır (Boztok, 2004; Browicz, 1987; Kılınç, 2013).

#### 3.1.1.1.5. Yaprak yapısı

Sakız ağacı gövdeye bağlı dal üzerinde 2-12 adet dikdörtgen, mızraksı veya oval biçiminde bileşik yaprak ekseninde bulunan kanatçıklarla çok karakteristik yapraklara sahip, genellikle 2-4, nadiren de 5-7 çift yumurtamsı, mızrak, eliptik, küt veya dikenimsi uçlu gibi formlar gösteren, tüysüz, uçları genelde keskin bir noktayla sonlanan yaprakçıktan oluşur (Davis, 1967). Sakız ağacı, cins içinde en kalın (etli) yaprakçıklara (490 µm) sahip olan türdür. *Pistacia* türlerinin tanımlayıcılarına göre bu cinse giren türlerde (*P. vera* L. hariç) yaprak genişliği 5.38 cm ve yaprak uzunluğu ise 5.13 cm'dir (Anonymous, 1998). Erkek ağacın yaprak yapısı Genellikle paripinnat 1-3 çift yaprakçıklı, nadiren imparipinnat (3 veya 5 yaprakçıklı), yaprakçıklar eş büyüklükte, yaprak eksenini belirgin alt kısımda dar kanatlı, üst kısımda belirgin kanatlı, 1-3 cm uzunlukta, eksen çıkıntısız, yaprakçıklarda damarlar pinnat, sapsız oval, nadiren eliptik, yaprak uçları kör uçlu, hafifçe girintili iken (Nicotra ve ark., 2003), Dişi ağacın yaprak yapısı genellikle paripinnat 2-3 yaprakçıklı (nadiren 1 çift 3 yaprakçıklı), yaprakçıklar eşit büyüklüktedir. Eksen kanatlı, 2.5-4.5 cm, çıkıntısız veya mukroludur. Yaprakçıklar sapsız, dar eliptik ve damarlanma pinnattır. Yaprakçık uçları kamamsı, kısa ve mukronattır. Erkek ağaçlar stres yokluğunda dişi ağaçlara göre daha yüksek fotosentetik kapasite sergilerken, kuraklık stresinde eşdeğer oranda fotosentetik kapasite ve düşük su kullanım etkinliği gösterirler (Nicotra ve ark., 2003; Kılınç, 2013).

#### 3.1.1.1.6. Tohum

Yuvarlak ve düz yüzeyle ekim-kasım ayları arasında olgunlaşan  $2n=24$  kromozom sayısına sahip sakız ağacı tohumlarının çimlenmesi epigeiktir. Buna karşın, tüm diğer *Pistacia* türlerinde çimlenme hipogeiktir. Ayrıca tohum içeren meyvelerin üretimi tek bir popülasyondaki bitkilerde bile değişiklik göstermektedir (Onay ve ark., 2016)

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Doku kültürü ön hazırlık uygulamaları

#### 3.2.1.1. Sterilizasyon işlemleri ve besi ortamlarının hazırlanması

*In vitro* çalışmalarda, laboratuvarında 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 sn. 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  $25\pm 2$  °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 ayarlandı. 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 tartılmıştır. Stok çözeltiler genellikle mg/ml konsantrasyonlarında hazırlandı. Tartımdan sonra 50 ya da 100 ml steril balon jöjelere

aktarıldı. Her madde 5-10 ml kadar 1N HCl içinde küçük magnetik karıştırıcılarla birlikte çözdürüldü. IBA ise 5-10 ml'lik alkolde eritildi. Eritilen BBD steril saf suyla 50 ml ya da 100ml'ye tamamlanmış 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 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

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

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

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

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

<b>Vitamin Karışımı Ana Solüsyonu</b>	
Nikotinik Asit	50 mg
Glisin	200 mg
Piridoksin HCl	50 mg
Steril saf su	100 ml'ye tamamlanır.
<b>B1 Vitamini Ana Solüsyonu</b>	
Tiamin HCl	10 mg
Steril saf su	100 ml'ye tamamlanır.
<b>Myo-inositol</b>	
myo-inositol	100 mg
Steril saf su	1000 ml'ye tamamlanır.

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

<b>BAP (6-Benzylaminopürin) Ana Solüsyonu (<math>10^{-3}</math>)</b>	
BAP	100 mg
1N NaOH	2-3 ml
Steril saf su	100 ml'ye tamamlanır.
<b>IBA (Indol-3 butirik asit) Ana Solüsyonu (<math>10^{-3}</math>)</b>	
IBA	100 mg
% 95 lik Etil Alkol	3-5 ml
Steril saf su	100 ml'ye tamamlanır.
<b>GA<sub>3</sub> (Gibberelik asit) Ana Solüsyonu</b>	
GA <sub>3</sub>	100 mg
3-5cc	%95'lik etil alkol
Steril saf su	100 ml'ye tamamlanır.

**Çizelge 3.3.** Standart MS besi ortam içeriği\* ( $g l^{-1}$ )

<b>Temel MS besi ortamının içeriği</b>	
MS ana solüsyonu	100 ml
MS-1	10 ml
MS-2	1ml
Komplex kelatör	10 ml
Vitamin karışımı	1 ml
myo-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.

### 3.2.2. Doku kültürü uygulamaları

#### 3.2.2.1. 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 (Kilinç ve ark., 2015).

### **3.2.2.2. Tohum çimlendirilmesi ve sürgünlerin proliferasyonu ve muhafazası**

Yüze 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 GA<sub>3</sub> ile destekli MS besi ortamında gerçekleştirildi (Kilinç ve ark., 2015). Özetlenecek olursa, juvenil sürgünlerin proliferasyonu için 1 mg/l BAP, 50 mg/l valin, 30 g şeker ve 6.4 gr agar içeren MS besi ortamı temel proliferasyon ortamı olarak kullanılarak stok kültürler üretildi.

### **3.2.2.3. Aksenik sürgün kültürlerinde abiyotik stres (elisitör) uygulamaları**

Sürgün kültürleri üzerine farklı stres uygulama çalışmalarında, *P. lentiscus* L. bitkisine ait aksenik stok materyallerden yaklaşık 1 cm uzunluğunda sürgünler alınarak, temel besi ortamı olarak kullanılan 1 mg/l BAP ve 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> destekli MS besi ortamında kültüre alındı. Sürgün kültürleri üzerine abiyotik stres faktörleri olarak; sıcaklık, UV-B ışını uygulaması, ışık ve tuz denemeleri uygulandı. Yaptığımız literatür çalışmaları ışığında, farklı stres uygulama çalışmaları kapsamında her bir stres faktörü için yapılacak olan çalışmalar aşağıda anlatıldığı şekilde gerçekleştirdi. Sıcaklık uygulaması çalışmalarında ortalama 28 gün bekletilen stok kültürlerinden, steril pens ve bisturiler kullanılarak alınan 1 cm uzunluğundaki aksenik sürgünler, MS besi ortamında sırasıyla 4 ve 37 °C'de 28 gün boyunca bir bitki büyüme odasında (25±2 °C de 16/8 saat ışık fotoperiyodu uygulanan ortamlarda) bekletildi. Işık uygulaması çalışmalarında stok kültürlerden, yine aynı şekilde ortalama 1 cm uzunluğunda alınan aksenik sürgünler, MS besi ortamında bu kez aydınlık ve karanlık ortamlarda bitki büyüme odasında bekletildi. Tuz uygulaması çalışmalarında ise ortalama 1 cm uzunluğundaki aksenik sürgünler, MS besi ortamında sırasıyla 25, 50 ve 100 mg/l olmak üzere 3 farklı oranda tuz (NaCl) ilavesi yapılarak 28 günlük kültür süresi boyunca bitki büyüme odasında bekletildi. UV-B (philips G15 T8E lamba) ışını uygulaması çalışmalarında ise, yine aksenik stok kültürlerden alınan 1 cm uzunluğundaki sürgünler, MS besi ortamında 5 gün boyunca sırasıyla 15, 30 ve 45 dk süreyle UV-B ışınına maruz bırakılarak ve 28 gün boyunca bitki büyüme odasında kültüre alındı. 28 günlük kültür periyodu sonrasında gelişen bitkicikler, oda sıcaklığında bekletilerek kurutulmuş ve gövde ile



yaprak kısımları ayrı olacak şekilde triterpen analizleri için oda sıcaklığı koşullarında saklandı.

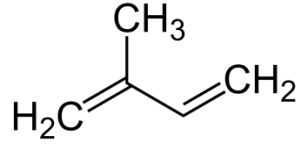
Farklı abiyotik stres uygulamalarına tabi tutulan sürgünlerin proliferasyon çalışmalarında veriler kültürün 28. gününde toplam 30 eksplantın ortalamasından elde edildi. Yapılan gözlemler ve alınan ölçümler şu şekildedir: Eksplant başına oluşan gövde sayısı, ortalama gövde uzunlukları ve gövde oluşturma kapasitesi (GOK) hesaplandı.  $GOK = \text{Rejenere olan eksplant başına oluşan ortalama gövde sayısı} \times \text{rejenere olan eksplant yüzdesi} / 100$ .

### 3.2.3. Sekonder metabolitler

Bitkiler genellikle primer ve sekonder olmak üzere 2 farklı şekilde metabolit üretirler. Primer metabolitler (karbonhidratlar, yağlar, proteinler vb) doğada oldukça yaygın olup, yüksek bitkilerin tohum ile vejetatif dokularında oldukça fazladır ve hücre metabolizmasındaki temel görevlerinden dolayı, bitkinin fizyolojik gelişimi için gereklidirler. Pekçok yüksek bitki, ekonomik açıdan önem taşıyan organik kimyasalları (alkoloid, terpen, fenolik bileşikler, nadir amino asitler, bitki aminleri ve glikosidler, vb) bünyesinde biriktirerek çeşitli bilimsel, teknolojik ve ticari uygulamalara ham madde oluşturur. Bitki sekonder metabolitleri bitki için çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Bunlar; 1- Bitkiyi herbivor, bakteriyel ve fungal patojen saldırılarına karşı korur, aynı ortamdaki diğer bitkilerle rekabet güçlerini artırır, 2- Tozlanmada faydalı organizmaları (özellikle böcekleri) çeker, simbiyotik ilişkilerde görev alır, 3- Bitkiyi sıcaklık değişimleri, su, ışık, ultraviyole ve mineral madde gibi abiyotik stress faktörlerine karşı korur ve 4- Hücre düzeyinde bitki büyüme düzenleyicileri, gen ekspresyon düzenleyicileri ve transdüksiyon mekanizmalarında görevlerinin bulunması şeklinde sıralanabilir (Oskay ve Oskay,2009). Bu bağlamda, sekonder metabolitler terpen veya terpenoidler, fenolik bileşikler ve azot içeren sekonder metabolitler olmak üzere 3 grupta incelenir.

#### 3.2.3.1. Terpenlerin sınıflandırılması

Terpenler veya terpenoidler, doğada en çok bulunan fitokimyasallardan biridir. Oldukça geniş yelpazede işlevleri bulunmakla birlikte genellikle tat ve aroma verici özellikleri yanında savunma mekanizmasında da önemli rolleri mevcuttur. 5C'lu izopren birimlerinden oluşan organik bileşiklerdir (**Şekil 3.2**).

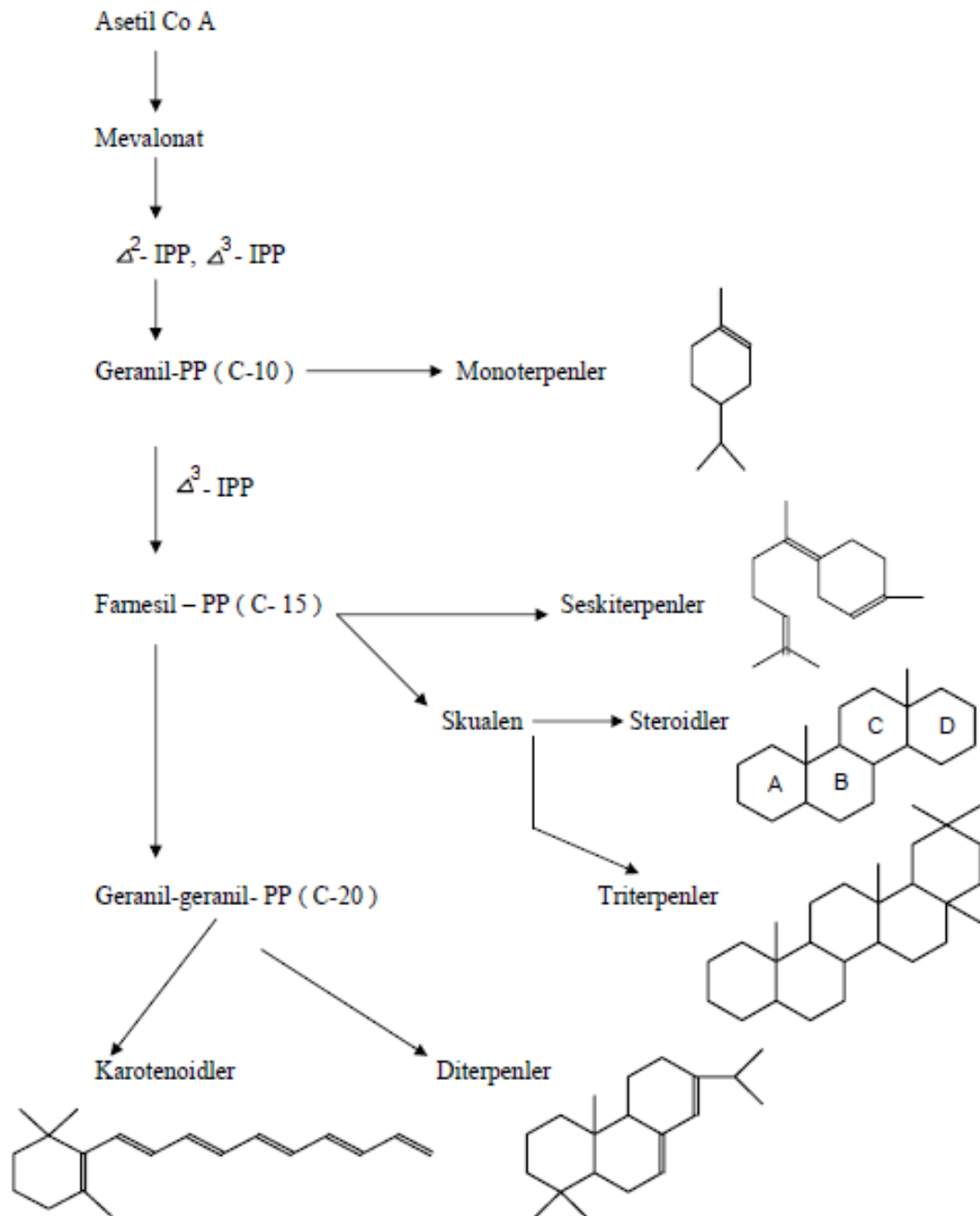


Şekil 3.2. 5 C'lu izopren halkası

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

### 3.2.3.2. Terpenlerin biyosentezi

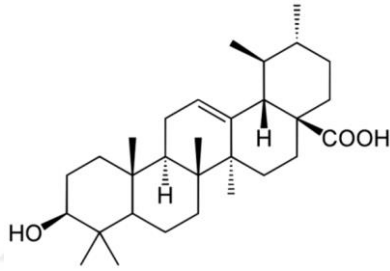
Terpenlerin biyosentezinde (Şekil 3.3) önemli yeri bulunan mevalonik asit (3-metil-3,5- dihidroksi pentanoik asit) 3 mol asetil koenzim A'nın kondenzasyonu ile oluşur. Mevalonik asidin su ve karbondioksit kaybetmesi ile terpenleri oluşturan izopren (2- metil-1,3-butadien) birimleri meydana gelir. Şekerlerin oksidasyonu sonucu oluşan asetil CoA, pek çok doğal bileşiğin sentezinde olduğu gibi mevalonik asit sentezinde de başlangıç maddesi olarak kullanılır. İki mol asetil CoA'nın kondenzasyonundan elde edilen asetoasetil CoA'nın başka bir mol asetil CoA ile birleşmesiyle 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA elde edilir. Bunun ardından enzimatik heterolitik bölünme ve tiyol ester grubunun NADPH (nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) ile indirgenmesi sonucunda mevalonik asit elde edilir. Bu reaksiyon geri dönüşümsüzdür. Mevalonik asidin 2 molekül ATP (Adenosin trifosfat) ile fosfatlanması sonucu mevalonik asit-5-pirofosfat bileşiği oluşur. Bu bileşikteki tersiyer hidroksil grubu da bir mol ATP ile fosfatlanarak daha kolay ayrılabilen bir grup haline gelir. Sonra su ve karbondioksit çıkmasıyla izopentil pirofosfat molekülü oluşur. Oluşan izopentil pirofosfatın enzim izomerizasyonu sonucu dimetil allil ester oluşur. Bu iki izomerin birbiriyle olan kondenzasyonu ile geranil pirofosfat oluşur. Bu bileşik de monoterpenleri meydana getirir. Geranil pirofosfatın izopentil pirofosfat ile kondenzasyonu farnesil pirofosfatı oluşturur. Oluşan bu bileşik seskiterpenlerin geçiş bileşiğidir. Farnesil pirofosfatın tekrar izopentil pirofosfat ile kondenzasyonu sonucu diterpenlerin ve karotenoidlerin yapı taşı olan geranil-geranil pirofosfat bileşiği oluşur. İki farnesil pirofosfatın kondenzasyonu ile de triterpenler, iki geranil-geranil pirofosfatın kondenzasyonu ile karotenoidler oluşur (Karabacak, 2007).



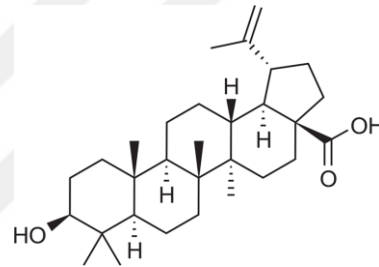
Şekil 3.3. Terpen yapıdaki bileşiklerin sentez yolu (Işık, 2005)

### 3.2.3.3. Triterpenlerin genel özellikleri

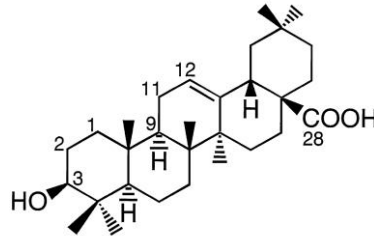
Triterpenler yapılarında 6 izopren grubu bulunduran bileşiklerdir. 100 farklı fitosterol ve 4000 den fazla diğer tip triterpenleri içerir. Çoğu uçucu yağda karışım halinde bulunmaktadır. Asit, alkol, ester, aldehit, keton, fenol ve eter gibi organik fonksiyonel gruplar taşıyabilirler. Oksijen içeren terpen türevleri ise terpenoid adını alırlar. Uçucu yağların tat ve koku açısından çok önemli, belirgin bazı fizyolojik etkilere sahip, kısmını oluştururlar. Triterpenlerin prekürsörü olan skualen iki adet farnesil pirofosfat molekülünün birbirlerine kuyruk-kuyruk konfügirasyonu ile bağlanması ile oluşur. Triterpenler glikozitleri olarak (saponin) veya aglikon olarak (streol, triterpen) bulunurlar. Genellikle yapraklarda ve bazı meyvelerde mumsu tabakalar içinde bulunurlar. Ursolik asit, betulinik asit ve oleanolik asit bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan triterpenlerdir (Şekil 3.4, 3.5 ve 3.6) (Arsal Kor, 2016).



Şekil 3.4. Ursolik asit



Şekil 3.5. Betulinik asit



Şekil 3.6. Oleanolik asit

### 3.2.4. Terpen yapıdaki bileşenlerin bileşenlerin ekstraksiyonu ve analizi

#### 3.2.4.1. Sürgün kültürlerinin ekstrelerinin hazırlanması

Örnekler kurutulduktan sonra öğütülerek toz haline getirilmiş ve kullanılıncaya dek 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°C'de masere edilmiştir.

### 3.2.4.2. LC-MS/MS ile triterpenoitlerin analizi

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

#### 3.2.4.2.1. 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 kâğıtları üzerine alınmış ve kurutulmuş örneklerden etanolle 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 elektronyüklü daha küçük parçalara parçalanırlar (fragmentasyon). Ana molekülden ayrılana 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 MS<sup>2</sup> olarak gösterilir. Döteryum işaretli internal bir standart ile karşılaştırılarak miktar tayini yapılır (Demirel 2010).

#### 3.2.4.2.2. 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.

### **3.2.4.2.3. LC-MS/MS analizi için örneklerin hazırlanması**

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

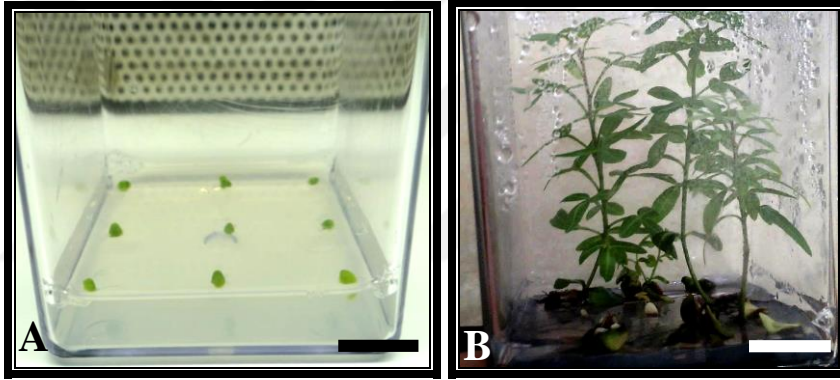
### **3.2.5. İstatistiksel analizler**

Çalışmalar sonucu elde edilen veriler (Eksplant başına düşen gövde sayısı, Gövde Uzunluğu ve Gövde oluşturma kapasitesi) (Lambardi ve ark., 1993) bakımından istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bütün çalışmalar tesadüf blokları deneme desenine göre yapılmıştır. Verilerdeki değişkenliği hızlı bir şekilde görmek için bütün çalışma sonuçlarının tanımlayıcı analizleri SPSS 19.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Test edilen işlemler arasındaki farklılıkların belirlenebilmesi için veriler ANOVA'ya tabi tutulmuştur. İstatistiksel olarak farklı görülen işlemler belirlendiğinde ortalama veriler arasındaki farklılıklar  $P < 0.05$  seviyesinde Duncan çoklu karşılaştırma testine tabi tutulmuştur. Oransal verilere ise, Ki kare ( $\chi^2$ ) testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Doku kültürü uygulamalarına ait sonuçlar ve tartışma

Yüze sterilizasyonu ile kullanılacak alet ve ekipmanların sterilizasyonu bitki doku kültürü uygulamalarında başarıyı etkileyen en temel konulardan biridir. Bu bağlamda uygulamış olduğumuz teknikler sonuçların başarılı bir şekilde elde edilmesine olanak sağlamıştır. Sodyum hipoklorit (%20) (NaOCl-ACE) içerisinde 20 dakika süresince çalkalanan tohumlar, 3 defa 5' er dakika steril distile suda yıkanan tohumlar 1 mg/l IBA destekli MS besi ortamında çimlendirilmiş (**Şekil 4.1 A**) ve aksenik sürgünler, 1mg/l BAP, 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> ile destekli MS besi ortamında prolifer edilmıştır (**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 abiyotik stres 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 Bar: 0.90 cm.

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. Abiyotik stres uygulamalarına ait sonuçlar ve tartışma

*Pistacia lentiscus* L. sürgünleri düşük ve yüksek sıcaklık derecelerinde (4 ve 37 °C) bekletilerek sıcaklık; aydınlık ve karanlık ortamlarda bekletilerek ışık; MS besi ortamına 25, 50 ve 100 mg/l olmak üzere 3 farklı oranda NaCl ilave edilerek tuz, ve 5 gün boyunca 15, 30 ve 45 dk süreyle UV-B stresi şeklindeki elisitasyon tiplerine maruz

birakılarak kültüre alınmıştır. Elisitasyon uygulamalarının sürgün gelişimine ve triterpenoit içeriğinin değişimine etkisi aşağıda ayrı başlıklar halinde sunulmuştur.

#### 4.2.1. Farklı sıcaklık elisitasyonuna ait sonuçlar

Elisitör olarak düşük ve yüksek sıcaklık uygulamalarına (4 ve 37°C) 28 gün süreyle tabi tutulan juvenil sürgünlerin gelişimine etkisi **Çizelge 4.1**'de sunulmuştur. Buna göre, 4 ve 37 °C'de elde edilen bitkilerin kontrol grubuna (9.03±0.71) oranla çok düşük sayıda gövde oluşturduğu gözlenmiştir.

Düşük sıcaklık (4°C) elisitasyonunun ortalama gövde sayısını yüksek sıcaklık (37°C) uygulamasına göre biraz daha düşürdüğü, gövde uzunluğunun toplam sürgün sayısına bölünmesiyle elde edilen ortalama gövde uzunlukları bakımından en yüksek sonucun 37°C'de bekletilen bitkilerden (0.93±0.07) elde edildiği gözlenmiştir. Gövde oluşturma kapasitesi bakımından en yüksek sonuçların kontrol grubundan (9.03) elde edildiği, bunu sırasıyla 37 ve 4°C sıcaklık uygulamalarının takip ettiği tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Farklı sıcaklık uygulamalarının *P.lentiscus* L. sürgünlerinde gövde gelişimine etkisi

Elisitör Tipi	Ortalama Gövde Sayısı ***Ort±SH	Ortalama Gövde Uzunluğu (cm) Ort±SH	**G.O.K
25°C (Kontrol)	9.03±0.71 a	0.55±0.05 c	9.03
4 °C	1.33±0.11 c	0.72±0.06 b	1.33
37 °C	2.03±0.17 b	0.93±0.07 a	2.03

Veriler kültürün 28. gününde toplam 30 eksplantın ortalamasından elde edilmiştir. 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 ± Standart hata.

Sürgün gelişimlerine ait morfolojik gözlemlere bakıldığında hem düşük hem de yüksek sıcaklık uygulamasının, gövde sayısını, yaprak ve gövde kuru ağırlığını azalttığı, yüksek sıcaklığın özellikle yapraklarda klorozise, sararma ve kırmızılaşma ile incelmelere düşük sıcaklıkta ise yaprak kalınlaşması ve renk koyuluğuna yol açtığı görülmüştür. Morfolojik bakımdan sağlıklı sürgünlerin kontrol grubuna ait bitkilerden elde edildiği belirlenmiştir.





**Şekil 4.2.** Farklı sıcaklık uygulamasına tabi tutulan *P.lentiscus* L. fidelerinin genel görünümü Bar: 0.90 cm. (A) Kontrol (25°C) (B) 4°C (C) 37°C

Triterpenoit miktarlarının sunulduğu **Çizelge 4.2** irdelendiğinde, kontrol grubu yaprak ve gövde ekstralarında bulunan Ursonik asit üzerinde sadece düşük sıcaklık uygulamasının etki gösterdiği görülmüştür. Düşük sıcaklık, Ursonik asit'in gövdede 3.08 kat artışına, yaprakta ise 1.75 kat azalmasına neden olmuş ancak yapraklarda yapraklarda Ursonik asit yanı sıra kontrol grubunda tespit edilemeyen Mastikadienolik asit'in 0.002 ppm seviyesinde sentezlendiği tespit edilmiştir. Yüksek sıcaklık (37°C) uygulamasının ise, triterpenler üzerinde herhangi bir etki göstermediği belirlenmiştir.

**Çizelge 4.2.** Farklı sıcaklık uygulamasına tabi tutulan *P.lentiscus* L. 'un gövde ve yaprağındaki triterpenoid bileşiklerin miktar ve çeşidine etkisi

Elisitör Tipi	Eksplant Tipi	Ursonik Asit	Moronik Asit	Oleanonik Asit	Mastikadienolik Asit	Oleanolik Asit	Ursolik Asit
<b>Kontrol</b>	Gövde	<b>0.012</b>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	<b>0.007</b>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<b>4 °C</b>	Gövde	<b>0.037</b>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	<b>0.004</b>	N.D.	N.D.	<b>0.002</b>	N.D.	N.D.
<b>37 °C</b>	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.

\*N.D; Tespit edilemedi

#### 4.2.2. Farklı ışık elisitasyonuna ait sonuçlar

28 gün süreyle aydınlık (kontrol) ve karanlık elisitasyonunun, juvenil sürgünlerin gelişimine etkisi **Çizelge 4.3**'de sunulmuştur. Buna göre, karanlık uygulamasından elde edilen bitkilerin kontrol grubuna ( $9.03 \pm 0.71$ ) oranla çok düşük ortalama gövde sayısına sahip olduğu ( $2.66 \pm 0.15$ ), ortalama gövde uzunlukları bakımından ise karanlık uygulamasının  $0.84 \pm 0.10$  cm ile en yüksek sonucu verdiği belirlenmiştir. Maksimum gövde oluşturma kapasitesinin kontrol grubundan (9.03) elde edildiği karanlık uygulamasının da 2.66 ile takip ettiği belirlenmiştir.

**Çizelge 4.3.** Farklı ışık elisitasyonunun *P.lentiscus* L. sürgünlerinde gövde gelişimine etkisi

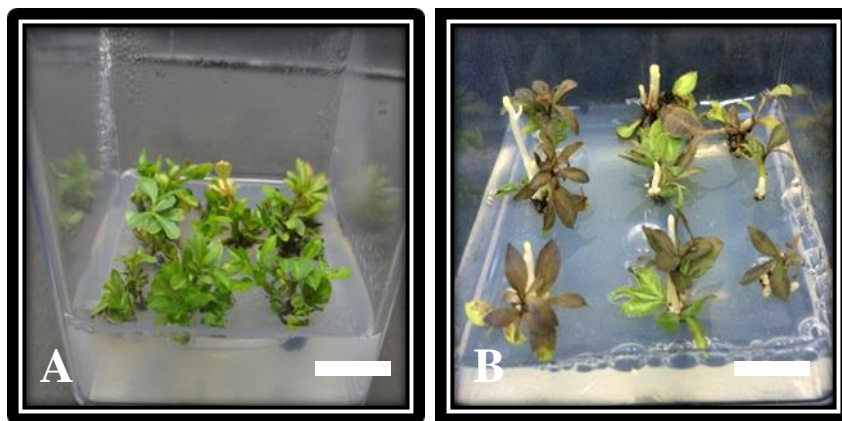
Elisitör Tipi	Ortalama Gövde Sayısı ***Ort±SH	Ortalama Gövde Uzunluğu (cm) Ort±SH	**G.O.K
Aydınlık	$9.03 \pm 0.71$ a	$0.55 \pm 0.05$ b	9.03
Karanlık	$2.66 \pm 0.15$ b	$0.84 \pm 0.10$ a	2.66

Veriler kültürün 28. gününde toplam 30 eksplantın ortalamasından elde edilmiştir. 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.

**Şekil 4.3** incelendiğinde, karanlık elisitasyonuna bırakılan sürgünlerin etiyole gövdeler oluşturduğu, gövde sayısında ve uzunluğunda, gövde-yaprak kuru ağırlıklarında azalmaların, özellikle yaprakların karararak kuruduğu ve ışık stresinin bir sonucu olarak klorofil kaybının (klorozis) olduğu görülmüştür.



**Şekil 4.3.** Farklı ışık elisitasyonuna tabi tutulan *P.lentiscus* L. fidelerinin genel görünümü. Bar: 0.90 cm  
(A) Kontrol (Aydınlık) (B) Karanlık

Aydınlık ve karanlık uygulamalarının gövde yapraklardaki triterpenoit miktar ve çeşitlerine etkisi **Çizelge 4.4**'te sunulmuştur. Buna göre, kontrol grubu hem gövde hem de yapraklarında bulunan Ursonik asit, 28 gün boyunca karanlık elisitasyonuna tabi tutulan sürgünlerin gövde kısımlarında kontrol grubuna oranla daha düşük seviyede

bulunmuş olup, buna ek olarak 0.012 ppm seviyesinde Ursolik asit'in sentezlendiği görülmüştür. Karanlık elisitasyonunun sürgünlerin yapraklarında ise Ursonik asit sentezini inhibe ettiği ve triterpenoit yapıdaki bileşikler üzerinde miktar ve çeşit bakımından etki göstermediği tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.4.** Farklı ışık elisitasyonunun *P.lentiscus* L'un gövde ve yaprağındaki triterpenoid bileşiklerin miktar ve çeşidine etkisi

Elisitör Tipi	Eksplant Tipi	Ursonik Asit	Moronik Asit	Oleanonik Asit	Mastikadienolik Asit	Oleanolik Asit	Ursolik Asit
<b>Kontrol (Aydınlık)</b>	Gövde	<b>0.012</b>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	<b>0.007</b>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Karanlık</b>	Gövde	<b>0.009</b>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	<b>0.012</b>
	Yaprak	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

\*N.D; Tespit edilemedi

#### 4.2.3. Farklı konsantrasyonlarda tuz (NaCl) elisitasyonuna ait sonuçlar

Besi ortamına 25, 50 ve 100 mg/l olmak üzere 3 farklı oranda NaCl ilave edilen sürgünlerin gelişimine ait veriler **Çizelge 4.5**'te sunulmuştur. Ortalama gövde sayısı maksimum seviyede kontrol grubuna ait bitkilerden elde edilmiş olup, tuz elisitasyonuna maruz bırakılan bitkilerde ise kontrol grubuna oranla çok daha düşük sonuçlar elde edilmiştir. 25 ve 50 mg/l'lik uygulama sonuçları arasında istatistiksel olarak fark gözlenmemiş olup sırasıyla  $1.96 \pm 0.18$  ve  $1.88 \pm 0.10$  ortalama gövde sayısına sahip oldukları belirlenmiş, en düşük değer ise  $1.33 \pm 0.19$  ile 100 mg/l tuz uygulamasından elde edilmiştir. Ortalama gövde uzunluğunun ise, konsantrasyon artışına bağlı olarak azaldığı, elisitasyon sonuçlarının kontrol grubuna oranla daha yüksek sonuçları verdiği görülmüştür. En yüksek gövde oluşturma kapasitesinin kontrol grubundan elde edildiği, 25 ve 50 mg/l'lik uygulama sonuçları arasında istatistiksel olarak fark gözlenmediği (1.33), en düşük kapasitenin ise 100 mg/l'lik elisitasyon sonucundan elde edildiği belirlenmiştir.

**Çizelge 4.5.** Farklı konsantrasyonlarda NaCl elisitasyonunun *P.lentiscus* L. sürgünlerinde gövde gelişimine etkisi

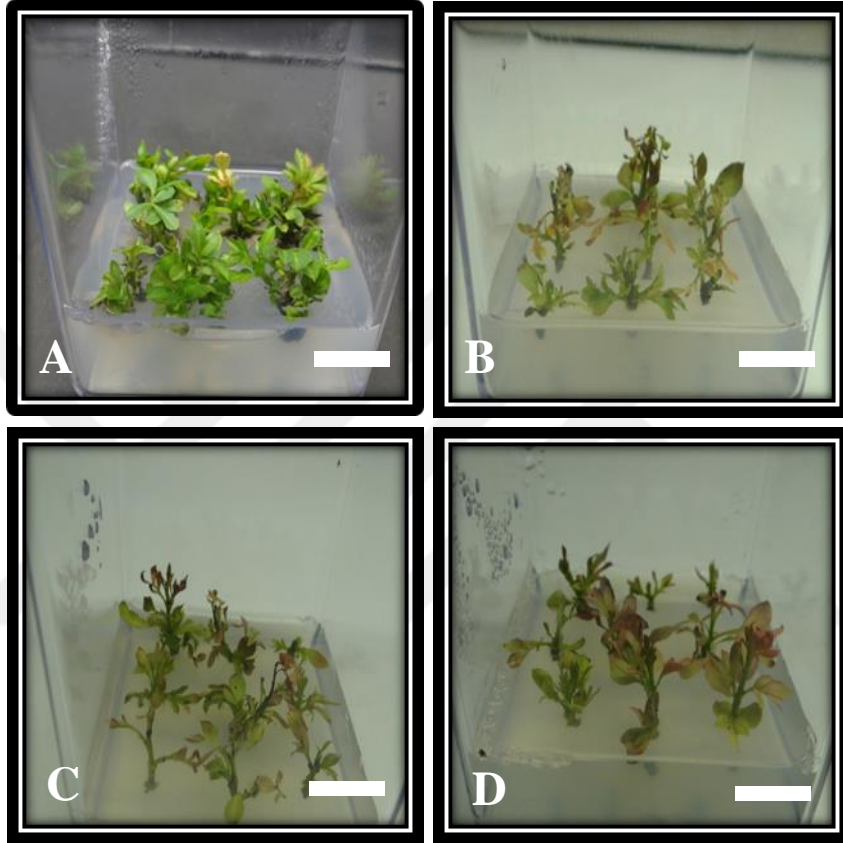
Elisitör Tipi	Ortalama Gövde Sayısı ***Ort±SH	Ortalama Gövde Uzunluğu (cm) Ort±SH	**G.O.K
<b>Kontrol</b>	9.03±0.71a	0.55±0.05 c	9.03
<b>25 mg/l NaCl</b>	1.96±0.18 b	1.05±0.07 a	1.96
<b>50 mg/l NaCl</b>	1.88±0.10 b	0.81±0.06 b	1.88
<b>100 mg/l NaCl</b>	1.33±0.19 c	0.71±0.05 b	1.33

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 ± Standart hata.

**Şekil 4.4**'te 28 gün süreyle artan tuz konsantrasyonları uygulamalarının sürgün gelişimini olumsuz yönde etkilediği, ortalama gövde sayısında, gövde-yaprak kuru ağırlıklarında düşüğe, yapraklarda özellikle sürgün uçlarında sararma ve klorozis ile yaprak uçlarından başlayıp ilerleyen kırmızılaşmaya yol açtığı tespit edilmiştir.



**Şekil 4.4.** Farklı NaCl konsantrasyonlarına tabi tutulan *P.lentiscus* L. fidelerinin genel görünümü Bar:0.90 cm (A) Kontrol (B) 25 mg/l NaCl (C) 50 mg/l NaCl (D) 100 mg/l NaCl

Triterpenoit miktarlarının sunulduğu **Çizelge 4.6** irdelendiğinde ise, genel olarak besi ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki NaCl uygulamalarının bazı triterpenoit çeşit ve miktarları üzerinde etki gösterdiği görülmüştür. Buna göre, sadece kontrol grubuna ait gövde (0.012 ppm) ve yaprak (0.007 ppm) ekstratlarında tespit edilen Ursolik asit miktarının gövde de 25 mg/l'lık elisitasyon sonucunda 2.16 kat, yine gövde de 50 mg/l'lık elisitasyon sonucunda 3.33 kat yaprak kısımlarında ise 2.14 artış gösterdiği görülmüştür. Bunun yanı sıra, Kontrol grubunda hiç bulunmayan Mastikadienolik asit'in 100 mg/l'lık tuz elisitasyonu ile yapraklarda 0.003 ppm; Ursolik asit'in ise 25 mg/l'lık uygulamalarda 0.028 ppm, 50 mg/l'lık uygulamalarda yapraklarda 0.030 gövde de ise 0.040 ppm seviyesinde sentezlendiği tespit edilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda tuz elisitasyonunun kontrol grubuna oranla Moronik, Oleanonik ve Oleanolik asit üzerinde miktar ve çeşit bakımından değişiklik oluşturmadığı belirlendi.

**Çizelge 4.6.** Farklı konsantrasyonlarda NaCl elisitasyonunun *P.lentiscus* L'un gövde ve yaprağındaki triterpenoit bileşiklerin miktar ve çeşidine etkisi

Elisitör Tipi	Eksplant Tipi	Ursonik Asit	Moronik Asit	Oleanonik Asit	Mastikadienolik Asit	Oleanolik Asit	Ursolik Asit
<b>Kontrol</b>	Gövde	<b>0.012</b>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	<b>0.007</b>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<b>25 mg/l NaCl</b>	Gövde	<b>0.026</b>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	<b>0.028</b>
	Yaprak	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<b>50 mg/l NaCl</b>	Gövde	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	<b>0.015</b>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	<b>0.030</b>
<b>100 mg/l NaCl</b>	Gövde	<b>0.040</b>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	<b>0.040</b>
	Yaprak	N.D.	N.D.	N.D.	<b>0.003</b>	N.D.	N.D.

\*N.D; Tespit edilemedi

#### 4.2.4. Farklı sürelerde UV-B ışını elisitasyonuna ait sonuçlar

**Çizelge 4.7.** irdelendiğinde, maksimum ortalama gövde sayısının kontrol grubundan elde edildiği, UV-B elisitasyonu uygulanan sürgünler arasında ise istatistiksel olarak fark gözlenmediği ve kontrol grubuna oranla oldukça düşük olduğu gözlemlendi. Ortalama gövde uzunluğunun uygulama süresinin artışına bağlı olarak arttığı, en yüksek sonucun 45 dk.'lık uygulamadan elde edildiği belirlenmiştir ( $2.76 \pm 0.16$  cm). Maksimum gövde oluşturma kapasitesinin ise kontrol grubuna ait olduğu (9.03), diğer üç elisitasyon sonucu arasında istatistiksel olarak fark gözlenmediği görülmüştür (2.19).

**Çizelge 4.7.** Farklı sürelerde UV-B elisitasyonunun *P.lentiscus* L. sürgünlerinin gövde gelişimine etkisi

Elisitör Tipi ve Uygulama Süresi (dk.)	Ortalama Gövde Sayısı ***Ort±SH	Ortalama Gövde Uzunluğu (cm) Ort±SH	**G.O.K
<b>Kontrol</b>	9.03±0.71a	0.55±0.05 d	9.03
<b>UV-B 15 dk</b>	2.19±0.14 b	1.64±0.16 c	2.19
<b>UV-B 30 dk</b>	2.19±0.10 b	2.25±0.14 b	2.19
<b>UV-B 45 dk</b>	2.11±0.11 b	2.76±0.16 a	2.11

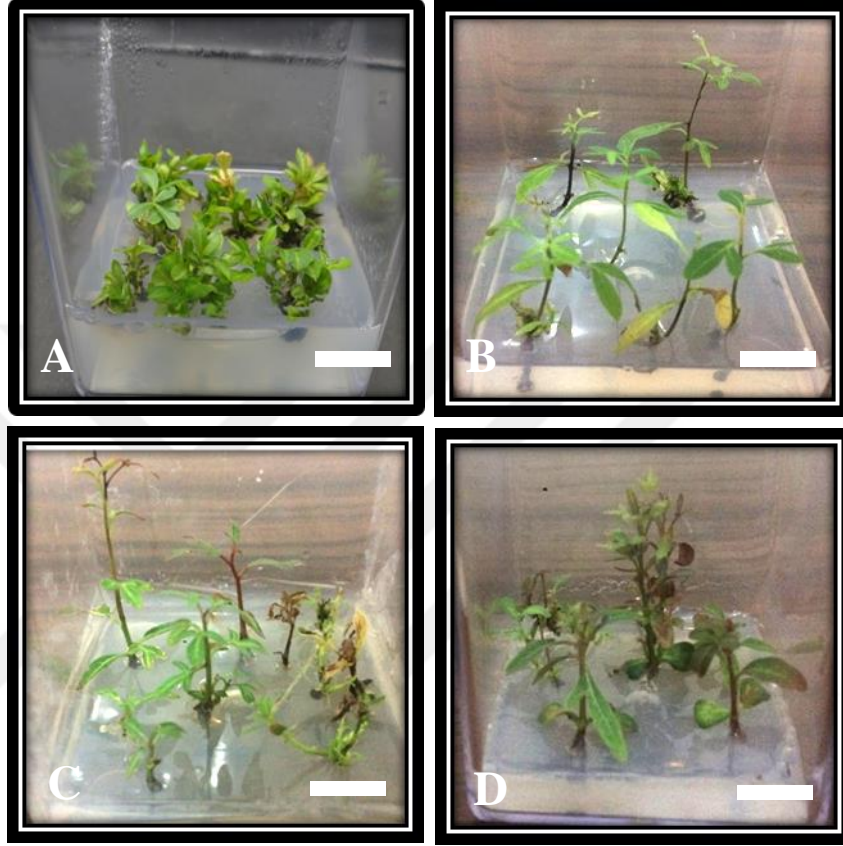
Her bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı testine göre belirgin bir fark ( $P \leq 0.05$ ) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

\*\* Gövde oluşturma kapasitesi indeksi.

\*\*\*Ortalama ± Standart hata.

Farklı bekleme sürelerinde uygulanan UV-B elisitasyonunun sürgün gelişimi üzerinde olumsuz sonuçlar verdiği görülmüştür. **Şekil 4.5** incelendiğinde ışına maruz kalma süresi arttıkça gövde sayısında, gövde ve yaprak kuru ağırlıklarında azalma,

yapraklarda klorozis ve kurumamanın olduğu gözlenmiştir. Özellikle 15 ve 30 dk. bekleme süresinin gövde kalınlığında incelme ve sürgün boyunda artışa yol açtığı yapraklarda daha çok kırmızılaşmaya ve klorozise, 45 dk.'nın ise sürgünün genelinde kurumaya yol açtığı belirlenmiştir.



**Şekil 4.5.** Farklı sürelerde uygulanan UV-B ışınma tabi tutulan *P.lentiscus* L. fidelerinin genel görünümü Bar: 0.90 cm. (A) Kontrol (B) 15 dk UV-B (C) 30 dk UV-B (D) 45 dk UV-B

*P.lentiscus* L'un gövde ve yaprağındaki triterpenoit bileşiklerin miktar ve çeşidine farklı bekleme sürelerinde uygulanan UV-B ışının etkisi **Çizelge 4.8'**de sunulmuştur. Buna göre, 15 dk. UV-B elisitasyonunun gövde ve yaprakta Ursonik asit seviyesini düşürdüğü, 45 dk.'nın ise gövde kısımlarında 1.16 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir. Mastikadienolik ve Ursolik asit gibi kontrol grubunda bulunmayan triterpenoit bileşiklerin oluşumuna yol açtığı belirlenmiştir. Mastikadienolik asit 15 ve 30 dk UV-B uygulaması sonucunda yapraklarda sentezlenirken, Ursolik asit ise 45 dk.'lık uygulama sonucunda gövde kısımlarında sentezlenmiştir. Moronik, Oleanonik ve Oleanolik asit triterpenlerine ise ne kontrol grubunda ne de elisitasyon sonuçlarında rastlanmadığı tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.8.** Farklı sürelerde uygulanan UV-B ışını elisitasyonunun *P.lentiscus* L'un gövde ve yaprağındaki triterpenoid bileşiklerin miktar ve çeşidine etkisi

Elisitör Tipi	Eksplant Tipi	Ursonik Asit	Moronik Asit	Oleanonik Asit	Mastikadienolik Asit	Oleanolik Asit	Ursolik Asit
<b>Kontrol</b>	Gövde	<b>0.012</b>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	<b>0.007</b>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<b>UV-B 15 dk</b>	Gövde	<b>0.009</b>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	<b>0.005</b>	N.D.	N.D.	<b>0.012</b>	N.D.	N.D.
<b>UV-B 30 dk</b>	Gövde	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Yaprak	N.D.	N.D.	N.D.	<b>0.006</b>	N.D.	N.D.
<b>UV-B 45 dk</b>	Gövde	<b>0.014</b>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	<b>0.008</b>
	Yaprak	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

\*N.D; Tespit edilemedi

Sekonder metabolitlerin biyoteknolojik yöntemler kullanılarak üretilmesinin, klasik metotlara oranla pek çok avantajı olduğu bilinmektedir. Bitkinin yetişme ortamına bakılmaksızın in vitro şartlarda kültüre alınabilmesi, kültür şartlarının optimize edilebilmesi ve öncül bileşikler ve elisitör gibi sekonder metabolit üretimini artıracak uygulamaların yapılabilirliği mümkündür (Erkoyuncu ve Yorgancılar 2015). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, pek çok ekonomik ve tıbbi öneme sahip bitki türünde özellikle sürgün kültürleri yoluyla in vivo ortama oranla daha fazla sekonder metabolit birikiminin meydana geldiği rapor edilmiştir. Örneğin, *Bacopa monnieri*'den bacoside A, *Nothapodytes nimmoniana*'dan kamptotesin ve *Digitalis purpurea* L. sürgün kültürlerinden digitoksin birikiminin ana bitkiden daha yüksek oranda üretilbildiği tespit edilmiştir (Munish ve ark., 2015; Dandin ve Murthy 2012; Patil ve ark., 2013). Bu bağlamda sekonder metabolit üretimini arttırmak amacıyla kullanılan elisitörler kökenlerine ya da moleküler yapılarına göre fiziksel ya da kimyasal, biyotik ya da abiyotik ve kompleks ya da tanımlanmış şekilde sınıflandırılabilir (Yamaner 2011). Tez çalışmamızda ise elisitör olarak farklı abiyotik stres kapsamında değerlendirilen denemeler yapılmıştır. Elisitör uygulamalarının, kültürün koşullarına, elisitörün konsantrasyonuna ve uygulandığı zaman dilimine bağlı olarak metabolit üretimini etkilediği bilindiğinden (Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015) bu tez kapsamında abiyotik elisitör uygulamalarına ait farklı konsantrasyon ve süreleri denenmiş ve in vitro elde edilen sürgün kültürlerinin yaprak ve gövde kısımlarında triterpen miktar ve çeşidi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Yapılan elisitör uygulamaları sonucunda; antikanser özellik gösterdiği bilinen Ursonik asit seviyesinin kontrol gruplarına oranla artış gösterdiği tespit edilmiştir. Mastikadienolik ve Ursolik asit triterpenoitlerinin ise kontrol grubunda hiç bulunmadığı

ancak ancak elisitör uygulamaları sonucunda sentezlendiği belirlenmiştir. Moronik, Oleanonik ve Oleanolik asit triterpenoitlerinin ise kontrol grubunda bulunmadığı ve elisitör uygulamalarından etkilenmediği görülmüştür. Kontrol gruplarına göre her bir triterpenoit için elde edilen maksimum miktarlara değinilecek olursa, **15 dk. UV-B** uygulamasının yaprak ekstralarında kontrol grubunda bulunmayan **Mastikadienolik asit** miktarını **0,012 ppm** seviyesine; **25 mg/l NaCl** elisitasyonunun gövde ekstralarında kontrol grubunda hiç bulunmayan **Ursolik asit** miktarını 0,028 ppm seviyesine; bunun yanısıra kontrol grubunda bulunan **Ursonik asit** miktarını ise gövde ekstralarında **4°C** düşük sıcaklık uygulaması **0,037 ppm** seviyesine; yaprak ekstralarında ise **25 mg/l NaCl** uygulamasının **0,015 ppm** seviyesine yükselttiği tespit edilmiştir. Akkuş ve arkadaşları, çalışmamıza benzer şekilde farklı ağır metal elisitasyonu denedikleri *P.lentiscus* L. sürgünlerinin hem gövde hem de yaprak ekstralarında farklı triterpenoit çeşidi ve mevcut triterpenoitlerde de artış elde ettiklerini, Moronik asit ve Oleanolik asitin, kontrol grubunda bulunmadığı halde  $\text{CuNO}_3$  elisitasyonu ile sentezlenmeye başladığını, yaprak ekstresinde ise Moronik asit ve Oleanonik asit miktarında artış görüldüğünü, yaprak ekstralarına nazaran gövde ekstralarında daha fazla sayı ve miktarda triterpenoit oluştuğunu rapor etmişlerdir. Uygulanan elisitasyon çeşidinin farklı triterpenoitler üzerinde farklı sonuçlara yol açtığı aşikârdır. Çalışmamızda, 50 mg/l NaCl elisitasyonu kontrol grubu gövdelerine oranla Ursonik asit miktarını 2.16 kat, 25 mg/l NaCl elisitasyonu ise kontrol grubu yapraklarına oranla Ursonik asit miktarını 3.71 kat arttırmıştır. *Catharanthus roseus*'ta 0.05 M potasyum klorür ilavesi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ajmalisin üretimini 4 kat arttırdığı bildirilmiştir (Zhao ve ark., 2001). Namlı ve ark., (2014) in vitro yetiştirdikleri *Hypericum retusum* Aucher üzerine de 45 dk.'lık UV-B ışını uygulaması sonucunda en yüksek total fenolik, flavonoid ve hiperisin birikimini elde etmişlerdir. Ramani ve Jayabaskaran (2008), *Catharanthus roseus*'un süspansiyon kültürlerinde UV-B ışığı ile catharanthin ve vindolin üretiminin arttırıldığını bildirmişlerdir. UV-C ışınının, farklı üzüm genotiplerine ait kallus hatlarında stilben üretimini arttırmak için etkili bir yöntem olduğu rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2010). Çalışmamızda literatür çalışmalarına paralel olarak 45 dk.'lık UV-B ışını elisitasyonunun kontrol grubu gövde kısımlarına oranla Ursonik asit miktarını 1.16 kat arttırmanın yanında kontrol grubunda hiç tespit edilmemiş triterpenoit bileşiklerinde sentezini sağladığı görülmüştür. Aşırı sıcaklık, bitkilerin büyümesini ve üretkenliğini sınırlayan olumsuz bir çevresel faktör olarak bilinmekte ve birincil metabolitlerin sentezi ve bozulması gibi çeşitli metabolik



süreçleri manipüle ederek bitki büyümesini de engellemektedir (Xu ve ark.,2013). Bunların yanında sıcaklık elisitasyonun bitkilerde sekonder metabolit üretimini arttırdığı ile ilgili raporlar da mevcuttur. Rivero ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada *Lycopersicum esculentum* L.cv. Tmknvf2 (Domates) ve *Citrullus lanatus* [Thomb.] Mansf. Dulcemaravilla (Karpuz) sürgün kültürlerinde termal stresin fenol birikimine ve yüksek fenilalanin amonyum liyaz aktivitesine yol açtığını bildirmişlerdir. Yine 5°C'lik bir sıcaklık artışının, *Panax quinquefolius*'un köklerindeki ginsenosid içeriğini önemli ölçüde arttırdığı rapor edilmiştir (Jochum ve ark., 2007). 20±2°C sıcaklık aralığında inkübe edilen *Melastoma malabathricum* hücre kültürlerinin, 26 ve 29±2°C'de yetiştirilenlere oranla daha yüksek antosiyanin üretimine sahip olduğu bildirilmiştir (Chan ve ark., 2010). Çalışmamızda düşük sıcaklığın *P.lentiscus* L. sürgün kültürlerinde belki de ılıman iklim kuşağı bitkisi olması dolayısıyla sekonder metabolitlerin artırılmasında daha iyi sonuçların alınmasına yol açtığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlar ışığında 4°C sıcaklık uygulamasının özellikle gövde kısımlarında Ursonik asit'in 3.08 kat artışına yol açtığı görülmüş ve kontrol grubunda tespit edilmeyen triterpenoit bileşiklerin sentezini sağlamıştır. Sıcaklık çalışmalarına yönelik bulgularımız yukarıda verilen literatür çalışmaları ile uyumlu olup elisitör uygulamasının çalışmamızda da sekonder metabolitlerin genel anlamda artışına yol açtığı belirlenmiştir. *Panax ginseng*'in kök kültürlerinde en yüksek biyokütle birikiminin karanlık altında yetiştirilen kültürlerden elde edildiği ancak ginsenoid birikiminin floresan ışık altında arttığı (Yu vd., 2005), Gamay, Kalecik karası ve Öküzgözü üzüm çeşitlerine (*Vitis vinifera* L.) ait süspansiyon kültürlerinde ise, karanlığın tüm çeşitlerde trans-resveratrol içeriğini güçlü bir şekilde arttırdığı bildirilmiştir (Çetin ve Baydar, 2016). Keza çalışmamızda *P.lentiscus* sürgün kültürlerinde de 28 gün boyunca karanlık uygulamasının Ursonik asit miktarında kontrol grubuna oranla düşüşe yol açtığı bunun yanı sıra Ursolik asit sentezini de tetiklediği gözlenmiştir.

Stres uygulamalarının, bitkilerde korunma, savunma ve neslin devamlılığı gibi çeşitli sebeplerle sekonder metabolit üretimini ve çeşidini arttırmanın yanında, bitkilerin büyüme ve gelişimini kısıtlayan, bitki üretimini sınırlayabilen, bitkilerin fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerini değiştirebilen en önemli çevresel etkilerden biri olduğu da bilinmektedir. Genellikle stresin yanıtları bitkinin genotipine, maruz kaldığı stresin çeşidine, süresine ve maruz kalan doku veya organın yapısına bağlı olarak değişmekle birlikte genellikle yüksek seviyelerdeki uygulamaların bitkide kökleri kalınlaştırdığı, kök ve gövde uzunluğunu azaltarak bitki büyümesi ve gelişimini engellediği ile ilgili

raporlar da mevcuttur (Emamverdian ve ark., 2015). Artan ağır metal dozlarının *P.lentiscus* juvenil sürgünlerinde, sürgün gelişimini olumsuz yönde etkilediği, gövde-yaprak kuru ağırlıklarında azalmaya, yapraklarda kırmızılaşma, kararma ve klorozise, gövdelerde ise daha çok kararmalara yol açtığı görülmüştür (Akkuş ve ark., 2017). *Pistacia vera* L. üç çeşidi üzerine yapılan bir çalışmada, özellikle Akbari kültivarının artan tuz konsantrasyonlarında kontrol grubuna oranla daha düşük sayıda bitki boyu, yaprak alanı, yaprak ve dal sayısı ile toplam taze ve kuru ağırlıklara sahip olduğu rapor edilmiştir (Abbaspour ve ark., 2012). Yine Antepfıstığı üzerine yapılan başka bir çalışmada ise Karimi ve Sadeghi-Seresht, (2018) Banebaghi çeşidinde atran tuzluluğun, nispi nem içeriğini, fidelerin kuru ağırlığı ile kökün taze ve kuru ağırlığını düşürdüğünü bildirmiştir. Tez kapsamında ise elisitör olarak kullanılan, farklı abiyotik stres uygulamalarının *P. lentiscus* L. juvenil sürgünlerinin gelişimi üzerindeki etkilerine baktığımızda, yukarıda verilen bulgulara paralel olarak denenen tüm parametrelerde stres 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 ise Akkuş ve arkadaşlarının çalışmasına paralel şekilde uygulanan stres tipi ve konsantrasyonuna bağlı olarak gövde sayısını, yaprak ve gövde kuru ağırlığını azalttığı, özellikle yapraklarda klorozis, sararma ve kırmızılaşmalara yol açtığı görülmüştür.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 5.1 Sonuçlar

*Anacardiaceae* familyasının önemli bir üyesi olan *Pistacia 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, antiinflamatuar, antihelicobacter pylori aktivitesi, antiatherogenik, antitümör, 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 antikanser başta olmak üzere çok sayıda işleve sahip değerli terpenoit yapısındaki sekonder metabolitlerin biyoteknolojik yöntemler kullanılarak geliştirilmesi önem arz etmektedir.

Tez kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- 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 GA<sub>3</sub> ile destekli MS besi ortamında proliferate edilmiştir ve 1 mg/l BA, 50 mg/l valin, 30 g şeker ve 6.4 gr agar içeren MS besi ortamından stok kültürler oluşturulmuştur.

- Juvenil sürgünlere 28 gün boyunca elisitör olarak düşük ve yüksek sıcaklık uygulamaları (4 ve 37°C) sonucunda, elisitör uygulanan bitkilerin kontrol grubuna oranla çok düşük sayıda gövde oluşturduğu, 4°C'nin ortalama gövde sayısında daha fazla düşüşe yol açtığı, ortalama gövde uzunlukları bakımından 37°C'nin daha yüksek sonuçlar verdiği ve en yüksek GOK'un kontrol grubundan elde edildiği gözlenmiştir. 4 ve 37°C'nin sürgün gelişimini olumsuz yönde etkilediği, gövde sayısını, yaprak ve gövde kuru ağırlığını azalttığı, yüksek sıcaklığın özellikle yapraklarda klorozise, sararma ve kırmızılaşma ile incelmelere düşük sıcaklıkta ise yaprak kalınlaşması ve renk koyuluğuna yol açtığı görüldü. Triterpenoit içeriği bakımından ise düşük sıcaklığın Ursonik asit'in gövdede artışına, yaprakta ise azalmasına, kontrol grubunda tespit edilemeyen Mastikadienolik asit'in sentezine yol açtığı, bununla birlikte yüksek

sıcaklığın ise, triterpenoitler üzerinde herhangi bir değişikliğe yol açmadığı tespit edilmiştir.

- 28 gün süreyle aydınlık (kontrol) ve karanlık elisitasyonunun, juvenil sürgünlere uygulanması sonucunda, karanlık uygulamasının ortalama gövde sayısını ve gövde oluşturma kapasitesini düşürdüğü ancak, ortalama gövde uzunluğunu arttırdığı görülmüştür. Karanlık ortamın sürgünlerin gövde yapılarını inceltip uzatarak etiyole forma dönüşmelerine aynı zamanda gövde sayısında ve uzunluğunda, gövde-yaprak kuru ağırlıklarında azalmaya ve yapraklarda klorozise yol açtığı belirlenmiştir. Yine karanlık uygulaması gövdede bulunan Ursonik asit seviyesinde azalmaya yol açarken kontrol grubunda hiç bulunmayan Ursolik asit'in de sentezine neden olmuştur.

- Farklı konsantrasyonlarda tuz uygulamalarına bırakılan sürgünlerde ortalama gövde sayısı ve gövde oluşturma kapasitesi kontrol grubuna oranla azalırken ortalama gövde uzunluğu artmıştır. Ortalama gövde sayısı, gövde-yaprak kuru ağırlığı azalmış, yapraklarda klorozis ve kırmızılaşmalar tespit edilmiştir. Tuz uygulaması bazı triterpenoit çeşit ve miktarları üzerinde pozitif etkilere yol açmıştır. Bu bağlamda, Ursonik asit miktarı maksimum 3.33 kat ile yaprak kısımlarında tespit edilmiştir. Bununla birlikte Mastikadienolik asit, Ursolik asit gibi kontrol grubunda hi bulunmayan triterpenoitlerin de sentezine neden olmuştur

- 5 gün süreyle UV-B elisitasyonu uygulanan juvenil sürgünlerin ise ortalama gövde uzunluğunu arttırdığı ancak ortalama gövde sayısı ve gövde oluşturma kapasitesini düşürdüğü görülmüştür. Gövde sayısı, gövde-yaprak kuru ağırlığı üzerinde olumsuz etkilere açtığı aynı zamanda yapraklarda klorozis, kırmızılaşma ve kurumunun meydana geldiği belirlenmiştir. 45 dk. uygulamanın Ursonik asit seviyesini gövde kısımlarında 1.16 kat arttırdığı, UV-B elisitasyonunun kontrol grubunda bulunmayan Mastikadienolik ve Ursolik asit gibi triterpenoit bileşiklerin sentezine yol açtığı tespit edilmiştir.

## 5.2 Öneriler

Yukarıda ifade edilen sonuçlar doğrultusunda, tez kapsamında *P. lentiscus* L.'un sürgün kültürlerinden elde edilen ekstraların hücre metabolizması düzeyinde araştırılması ve saflaştırma işlemlerinin yapılarak geliştirilmesi, kanserli hücre hatlarında bu saf bileşiklerin etkilerinin belirlenmesi ve daha sonra geniş ölçekli biyoreaktörlerde üretim işlemlerinin başlatılmasınının faydalı olacağı kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR

- Abbaspour, H., Afshari, H., ve Abdel-Wahhab, M.A. 2012, Influence of salt stress on growth, pigments, soluble sugars and ion accumulation in three pistachio cultivars, *Journal of Medicinal Plants Research*, 6 (12), 2468-2473.
- 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.
- Akkuş, H., Ayaz Tilkat, E., Yılmaz, M.A., Sığınç 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*, 104-104pp.
- Acar, İ. 1988, *P. lentiscus* L. var Chia. sakızı üretiminin geliştirilmesine esas olmak üzere sakızın fiziko-kimyasal yönden incelenmesi, Ormancılık Araştırma Ens., Teknik Rap.Ser.No.35.
- Aghighi Shahverdi, Omidi, H. and Tabatabaei, S.J., 2017, Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) responses to NaCl stress: Growth, photosynthetic pigments, diterpene glycosides and ion content in root and shoot, *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2017.12.00>.
- Akdemir, H., Suzerer, V., Tilkat, E., Yildirim, H., Onay, A. and Ozden Tokatlı, Y., 2013. *In vitro* conservation and cryopreservation of mature pistachio (*Pistacia vera* L.) germplasm, *J. Plant Biochem. Biot.*, 21, 43-51.
- 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.
- Anonim2008,<http://www.nutricology.com/proddesc/discuss/NCMasticGumPDFProductSheet01605.pdf>
- Al-Habbal, M.J., Al-Habbal, Z. and Huwez, F.U. 1984, A double-blind controlled clinical trial of mastic and placebo in the treatment of duodenal ulcer, *Clin. Exp. Pharmacol P.*, 11 (5), 541-544.
- Al-Said, M.S., Ageel, A.M., Parmar, N.S. and Tariq, M. 1986, Evaluation of mastic, a crude drug obtained from *Pistacia lentiscus* for gastric and duodenal antiulcer activity. *J. Ethnopharmacol*, 15 (3), 271-278.

- Ali, M, Yu, K.W, Hahn, E.J. and Paek, K.Y. 2006, Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. *Plant Cell Reports*, 25, 613–620.
- Andrikopoulos, N.K., Kaliora, A.C., Assimopoulou, A.N. and Papageorgiou, V.P. 2003, Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against *in vitro* LDL oxidation, *Phytother.Res.*, 17 (5), 501–507.
- Arsal Kor, S., 2016, KKTC'de Yetißen *Lathyrus Ochrus* (L.) da uçucu yağ içeriğinin, uçucu sekonder metabolitlerinin ve bazı aktivite özelliklerinin tayin edilmesi, KKTC Yakın Doğu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 85 sayfa.
- Assimopoulou, A.N. and Papageorgiou, V.P. 2005, GC-MS analysis of penta- and tetracyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species, Part I. *Pistacia lentiscus* var. chia. *Biomed Chromatogr.*, 19 (4), 285–311.
- Ajungla, L., Patil, P.P., Barmukh, R.B. and Nikam, T.D. 2009, Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hiyosiyamin and scopolamine in root cultures of *Datura metel* L. *Indian Journal of Biotechnology*, 8,317-322.
- Bae, K.H., Choi, Y.E., Shin, C.G., Kim, Y.Y. and Kim, Y.S. 2006, Enhanced ginsenoside productivity by combination of ethephon and methyl jasmoante in ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) adventitious root cultures. *Biotechnol Lett* 28,1163-1166.
- Balan, K.V., Prince, J., Han, Z., Dimas, K., Cladaras, M., Wyche, G.H., Sitaras, N.M. and Pantazis, P. 2007, Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated *in vitro* with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. chia, *Phyto Med.*, 14(4), 263–272.
- Göktürk Baydar, N., Özkan, Ç., 2017, Tuz Stresinin Nane (*Mentha piperita* L.)'de büyüme ile uçucu yağ miktarı ve bileşenleri üzerine etkileri, *Türk Tarım -Gıda Bilim ve Teknolojisi Dergisi*, 5, 757-762.
- Boztok, Ş. ve Zeybek, U., (2004). *Pistacia* cinsine dâhil bazı doğal bitkilerin sakız reçinesi kalitesi açısından irdelenmesi, gıda ve ilaç sanayinde değerlendirilmesi üzerine araştırma, Ege Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi, İzmir.
- Browicz, F.A. 1987, *Pistacia lentiscus* L. var. chia (Anacardiaceae) on chios island, *Pl.Sys.Evol.*, 155,189-195.

- 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.
- Calabro, G. and Curro, P. 1974, Costituenti degli olii essenziali.Nota IV- essenza di lentisco, *Estratto da Essenze Derivati Agrumari*, 44,82–92 (in Italian).
- Chan, L.K., Koay, S.S., Boey, P.L. and Bhatt, A., 2010, Effects of abiotic stress on biomass and anthocyanin production in cell cultures of *Melastoma malabathricum*. *Biological Research*, 43, 127-135.
- Çil, E.E., 2006, UV-C ışın stresinin sera şartlarında yetiştirilen fasulye (*Phaseolus vulgaris* l. cv. atlanta) üzerinde bazı morfolojik ve fizyolojik etkilerinin araştırılması, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 45sayfa.
- 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.
- Dimas, K., Hatziantoniou, S., Wyche, J.H. and Pantazis, P., 2009, A mastic gum extract induces supression of growth of human colorectal tumor xenografts in immunodeficient mice. *In Vivo*. 23 (1), 63-68.
- Davis, P.H., 1967, *Linum* L. In: Davis PH. (ed.) Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Edinburgh 2, 425-450.
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdorran, F. and Xie, Y., 2015, Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Sci. World J.*, 756120. doi: 10.1155/2015/756120.
- Ekmekçi, E., Apan, M. ve Kara, T., 2005, Tuzluluğun bitki gelişimine etkisi. *OMÜ, Zir. Fak. Der.*, 20 (3), 118-125.
- Erkoyuncu, M.T., ve Yorgancılar, M., 2015, Bitki doku kültürü yöntemleri ile sekonder metabolitlerin üretimi, *Selçuk Tar Bil Der*, 2 (1), 66-76.
- Fatima, S., Mujib, A. and Dipti, T., 2015, NaCl amendment improves vinblastine and vincristine synthesis in *Catharanthus roseus*: a case of stress signalling as evidenced by antioxidant enzymes activities, *Plant Cell Tissue and Organ Culture.*, 121, 445–458.
- Güven, A., Gürsul, I., 2014, Bitki Doku Kültürlerinde Sekonder Metabolit Sentezi, *Gıda*, 39 (5), 299-306.

- Hemm, M.R., Rider, S.D., Ogas, J., Murry, D.J. and Chapple, C., 2004, Light induces phenyl propanoid metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant J.*, 38, 765-778.
- Jochum, G.M., Mudge, K.W. and Thomas, R.B., 2007, Elevated temperatures increase leaf senescence and root secondary metabolite concentration in the understory herb *Panax quinquefolius* (Araliaceae), *American Journal of Botany*, 94, 819-826. PMID: 21636451.
- Kaliora, A.C., Stathopoulou, M.G., Triantafyllidis, 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.
- Khatami, F. and Ghanati, F., 2011, Effect of UV irradiation on cellviability, anthocyanin, and flavonoid contents of callus-cultured *Malva neglecta* cells. *International Conference on life Scienceand Technology*, IPCBEE 3, Singapore.
- Karakır, N. ve İsfendiyaroğlu, M., 1993, Sakız ağacı yetiştirme tekniği. TYUAP Ege Marmara Dilimi Bahçe Bitkileri Grubu ABAV Toplantısı, 9-11 Kasım, Menemen, İzmir.
- Karimi, H.R. and Sadeghi-Seresht, E., 2018, Effects of salinity stress on growth indices, physiological parameters and element concentration in Banebaghi (*Pistacia* sp.) as rootstock for pistachio, *Journal of Plant Nutrition*, 41 (9), 1094-1103.
- Kilinç, F.M., Süzerer, V., Özden Çiftçi, Y., Koç, I., Akdemir, H., Yıldırım, H., Tilkat, E. and Onay, A. 2014, Improved shoot multiplication of lentisk (*Pistacia lentiscus* L.) using different carbohydrates and media, *Acta Hort.*, 1028, 153-160
- Kilinç, F.M., Süzerer V., Ozden Çiftçi Y., Onay A., Yıldırım H., Uncuoğlu Altinkut A. and Tilkat E., Koc I., Akdemir Ö.F., Metin Karakaş Ö., 2015, Clonal micropropagation of *Pistacia lentiscus* L. and assessment of genetic stability using IRAP markers. *Plant Growth Regulation* 75:75. doi:10.1007/s10725-014-9933-9
- Lambardi, M., Sharma, K.K. and Thorpe, T.A., 1993, Optimization of in vitro bud induction and plantlet formation from mature embryos of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.), *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 29, 189-199.
- Liu, C.Z., Guo, C., Wang, Y.C. and Quyang, F., 2002, Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisin biosynthesis of *Artemisia annua* L. *Process Biochem.*, 38, 581-585.
- Ljubuncic, P., Song, H., Cogan, U., Azaizeh, H. and Bomzon, A., 2005, The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease, *Journal of Ethnopharmacology*, 100 (2005), 198-204.



- Marone P., Bono L., Leone E., Bona S., Carretto E., Perversi L. 2001. "Bactericidal activity of *Pistacia lentiscus* mastic gum against *Helicobacter pylori*", *J. Chemother.*, 13, 6, 611-614.
- Munish, S., Ashok, A., Rajinder, G. and Sharada, M., 2015, Enhanced bacoside production in shoot cultures of *Bacopa monnieri* under the influence of abiotic elicitors, *Natural Product Research.*, 29 (8), 745-749.
- Murthy, H.N, Lee, E.J. and Paek, K.Y., 2014, Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation, *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 118, 1-16
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15(3), 473-497.
- Namlı, S., Isıkalan, Ç., Akbaş, F. and Ayaz-Tilkat, E. 2014, Effects of UV-B radiation on total phenolic, flavonoid and hypericin contents in *Hypericum retusum* Aucher grown under in vitro conditions, *Natural Product Research*, 28 (24), 2286-2292.
- Nicotra, A.B., Chazdon, R.L. and Montgomery, R.A., 2003, Sexes show contrasting patterns of leaf and crown carbon gain in a dioecious rainforest shrub. *Am. J. Bot.*, 90 (3), 347-355.
- 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 (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.
- Palli, E. M. and Aronne, G., 2000, Reproductive cycle in Southern Italy of *Pistacia lentiscus* (*Anacardiaceae*). *Plant Biosyst.*, 134, 365-371.
- Rivero, R.M., Ruiz, J.M., García, P.C., López-Lefebvre, L.R., Sánchez, E. and Romero, L. 2001, Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compound in tomato and watermelon plants. *Plant Sci.*, 160, 315-321.
- Schreiner, M., Martínez-Abaigar, J., Glaab, J. and Jansen M., 2014, UV-B Induced Secondary Plant Metabolites, *Potential benefits for plant and human health*, 9 (2), 34-37.
- Simões, C., Bizarri, C.H.B., Cordeiro, L.S., Castro, T.C., Coutada, L.C.M., Silva, A.J.R., Albarello, N., Mansur, E., 2009. Anthocyanin production in callus culture *Cleome rosea* : Modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS. *Plant Physiology and Biochemistry*, (47) 895-903.

- Sirhindi, G., Mushtaq, R., Mir, M.A., Alyemeni, M.N., Alam, P. and Ahmad, P. 2017, Characterization of jasmonic acid-induced phenols in *Vigna radiata* under salt stress. *Pak J Bot.* 49 (5), 1647-1654.
- Stevens P.F. 2008. Angiosperm Phylogeny Website, Version 9.
- Valifard, M., Mohsenzadeh, S., Kholdebarin, B. and Rowshan, V. 2014, Effects of salt stress on volatile compounds, total phenolic content and antioxidant activities of *Salvia mirzayanii*, *South African Journal of Botany*, 93, 92-97.
- Xu, A, Zhan, J.C. and Huang, W.D., 2015, Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic acid, alone or in combination, on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon, *Plant Cell Tissue and Organ Culture.*, 122, 197–211.
- Yılmaz, E., Tuna, A.L. ve Bürün, B., 2011, Bitkilerin tuz stresi etkilerine karşı geliştirdikleri tolerans stratejileri, *C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 7 (1), 47-66.
- Yu, K.W., Murthy, H.N., Hahn, E.J. and Peak, K.Y., 2005, Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng* influence of temperature and light quality. *Biochem Eng J.*, 23, 53-56.
- Zohary, M., 1952, A monographical study of the genus *Pistacia*. *Palestinian Journal of Botany* (Jerusalem) 5, 187- 228.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Yüstra SİĞİNÇ ÇETİN  
**Uyruğu** : T.C.  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : Batman-17/07/1982  
**Telefon** : 0545 848 21 81  
**Faks** : -  
**e-mail** : yusrasiginc@hotmail.com

### EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Batman Lisesi Merkez, Batman	2001
Üniversite	: İnönü Üniversitesi, Merkez/Malatya	2008
Tezsiz Yük. Lisans	: Dicle Üniversitesi, Merkez/Diyarbakır	2009
Doktora	: -	

### İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2009-2010	Batman Kültür Dersanesi	Öğretmen
2010-2015	Özel Batman Doğa Koleji	Öğretmen
2015-.....	MEB	Öğretmen

### UZMANLIK ALANI

### YABANCI DİLLER

İngilizce

### BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

### YAYINLAR

Yüstra Sığınç Çetin, Mustafa Abdullah Yılmaz, Abdulselam Ertaş, Veysel Süzerer, Engin Tilkat, Emine Ayaz Tilkat, Hayri Batıbay, Ahmet Onay 2018, Bazi Abiyotik Stres Elisitasyonu Uygulamaları Yoluyla In Vitro Ortamda Çoğaltılmış Juvenil Sakız Ağacı (Pistacia lentiscus L.) Eksplantlarında Triterpenoit Miktarlarının Arttırılması, III. Uluslararası Katılımlı Bitki Fizyolojisi Sempozyumu, Çanakkale On Sekiz Mart Üniversitesi, 26-29 Eylül (Sözlü Sunum).