

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***Pistacia lentiscus* L. TOHUMLARININ ÇİMLENDİRİLMESİ İLE ELDE EDİLEN AKSENİK
SÜRGÜNLERİN TIS BİYOREAKTÖR SİSTEMİ İLE MİKROÇOĞALTILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Zeynep EKİNGEN (121110103)

Anabilim Dalı: Biyoloji

Programı: Botanik

Danışman: Prof. Dr. Eyüp BAĞCI

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 09.02.2016

ŞUBAT-2016

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***P. lentiscus* L. TOHUMLARININ ÇİMLENDİRİLMESİ İLE ELDE EDİLEN
AKSENİK SÜRGÜNLERİN TİS BİYOREAKTÖR SİSTEMİ İLE
MİKROÇOĞALTILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Zeynep EKİNGEN (121110103)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih:09.02.2016

Tezin Savunulduğu Tarih:28.04.2016

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Eyüp BAĞCI

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. A. Harun EVREN (F.Ü)

Prof. Dr. Engin TİLKAT (B.Ü)

ŞUBAT-2016

ÖNSÖZ

Anacardiaceae familyasının önemli bir üyesi olan *Pistacia lentiscus* L. herdem yeşil ve kuraklığa dayanıklı bir bitkidir. *P. lentiscus* bitkisinin gövdesinden elde edilen reçine mastik sakızı adını alır ve ticari değeri oldukça yüksektir. Deniz seviyesinden 700 m yükseltilere kadar çıkabilen bu bitkiye ülkemizde İstanbul Burgaz Ada, İzmir, Ankara İncesu, Kayseri, Muğla, Marmaris, Kuşadası, Datça, Antalya Kemer, İçel, Tarsus, Ulaş, Seyhan ve Hatay yörelerinde rastlanmıştır (Davis, 1967). Sakız ağacının geleneksel çoğaltım yöntemi, kalın dallardan hazırlanan çeliklerin kış aylarında doğrudan plantasyon kurulacak araziye dikilmesine dayanmaktadır. Bu yöntemde hem köklenme uzun sürmekte hem de başarı oranı düşük olmaktadır.

Bu nedenle sakız bitkilerinin üretilmesinde klasik yöntemlere yardımcı biyoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Bu bağlamda sakız bitkisinin hızlı klonal çoğaltımına olanak verecek, yetiştirme süresini kısaltacak ve türe ait germplazmanın korunmasını sağlayacak olmasının yanısıra; çalışmamızda geliştirilen protokol diğer odunsu türlerin TIS yolu ile çoğaltılması için model olarak kullanılabilecektir.

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve tüm çalışmalar boyunca yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Eyüp BAĞCI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, bu çalışmaya maddi yönden kaynak sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne teşekkürü bir borç bilirim. Doku kültürü çalışmalarını gerçekleştirebilmem için Batman Üniversitesi Biyoloji Araştırma Laboratuvarının kapılarını ardına kadar açan ve çalışmaların her aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen kıymetli hocam Biyoloji Bölümü Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Engin TİLKA'T'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 esirgemeyen Dr.Yusuf ERSALI'ya ve tüm biyoloji araştırma laboratuvarı ekibine çok teşekkür ederim. Maddi ve manevi her zaman yanımda olan, desteğini esirgemeyen babam Tahir EKİNCİ'ye ve her zaman yanımda olan eşim Volkan EKİNGEN'e fedakarlığından dolayı çok teşekkür ederim.

Bu çalışma FÜBAP FF. 13.29 nolu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ	VI
TABLolar LİSTESİ	VII
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Bitki Doku Kültürü Yöntemleri Hakkında Genel Bilgi.....	1
1.2. Çalışmanın Amacı	3
1.3. <i>Pistacia lentiscus</i> (Sakız ağacı) Hakkında Genel Bilgi	3
1.3.1. <i>Pistacia lentiscus</i> ' un Dünyada ve Ülkemizde Yayılışı	3
1.3.2. Sakız Ağacının Morfolojik Özellikleri	5
1.3.3. Damla Sakızının Ticari Olarak Kullanımı.....	6
1.3.4. Sakız Ağacını Geleneksel ve Biyoteknolojik Yöntemlerle Çoğaltım	8
2. MATERYAL ve METOT	16
2.1. Materyal.....	16
2.1.1 Bitkisel Materyal	16
2.1.2. Besi Ortamları ve İçerikleri	16
2.2. Metot.....	18
2.2.1. Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu	18
2.2.2. Malzemelerin Sterilizasyonu	19
2.2.3. Stok Kültürlerin Eldesi	19
2.2.4. Geçici Daldırma Biyoreaktör Sisteminde (RITA®) Mikroçoğaltım Protokolünün Geliştirilmesi	20

3. BULGULAR	23
3.1. Geçici Daldırma Biyoreaktör Sisteminde (RITA®) Mikroçoğaltım Protokolünün Geliştirilmesi	23
3.1.1. Geçici Daldırma Biyoreaktör Sistemlerinin Başlatılmasında En İyi Daldırma Zamanı ve Sıklığının Belirlenmesi	23
3.1.2. Aksenik Gövde Ucu ve Nodal Tomurcukların Proliferasyonuna Farklı Besi Ortamlarının Etkisi	26
3.1.3. Geçici Daldırma Biyoreaktör Sistemlerinde Sürgün Ucu ve Nodal Tomurcukların Proliferasyonuna Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi	27
3.1.4. Mikroçoğaltıma Farklı Sitokinin Tiplerinin Etkisi.....	29
3.1.5. Mikroçoğaltıma BA' nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi	31
3.1.6 Köklendirme Çalışmaları.....	32
3.1.7. İklimlendirme Çalışmaları.....	35
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	37
KAYNAKLAR.....	44
ÖZGEÇMİŞ.....	54

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, önemli bir kültür bitkisi olan Sakız ağacının (*Pistacia lentiscus* L.) *in vitro* çoğaltımında kullanılabilecek alternatif bir yöntemin uygulandığı bir mikroçoğaltım protokolü geliştirmektir. Yarı katı sistemlerle karşılaştırıldığında geçici biyoreaktör sistemlerinin, sistemin bir otomasyon sistemi ile kontrol edilebilmesi, aynı anda daha fazla sayıda eksplantın kültüre alınabilmesi ve agar gibi organik bir katılaştırıcı ajana gereksinim duyulmaması gibi maliyet düşürücü birçok avantajları vardır. Bu nedenle çalışmamızda, aksenik sakız bitkisine ait juvenil gövde uçları ve nodal tomurcuklarının geçici daldırma biyoreaktör sisteminde mikroçoğaltım imkanları araştırılmış ve *P. lentiscus*' un sürgünlerinden itibaren kitlesel olarak çoğaltılabilmesi için bir metot geliştirmek amaçlanmıştır. Bunun için *P. lentiscus* tohumlarından *in vitro* çoğaltılmış aksenik rejenerantlara ait gövde ucu ve nodal tomurcuklar materyal olarak kullanılmıştır. Tohumların yüzey sterilizasyonu, Kılınç (2014)'e göre, yapılmıştır. Eksplantların geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde (TIS), belirli zaman aralıklarında besi ortamı ile muamele edilerek, proliferasyon oranları incelenmiştir. TIS sistemlerinde proliferasyon ortamı denemelerinde, 30 gL⁻¹ sukroz ile desteklenmiş 1 mgL⁻¹ BA ve 0,5 mgL⁻¹ GA₃ içeren MS (Murashige Skoog,1962) besi ortamı kullanılmıştır. Eksplantlar farklı daldırma sıklığı (4, 8, 16, 24 ve 32 saat) ve farklı daldırma zamanı periyotlarında (5, 10 ve 15 dak.) TIS sisteminde test edilmişlerdir. En yüksek gövde oluşturma kapasitesi ve minimum vitrifikasyon oranı, 32 saatte bir 10 dakikalık daldırma frekansı döngüsünde gövde ucu ve nodal eksplantlar için sırasıyla 2,76 ve % 5 ile 1,44 ve % 5'a ulaşmıştır. *P. lentiscus* tohumlarından elde edilen aksenik gövde ucu ve nodal tomurcukların TIS biyoreaktör sistemlerinde mikroçoğaltımına, sırasıyla farklı besi ortamlarının (MS, WPM ve SH) etkisi, farklı karbon kaynaklarının (Sukroz, Laktoz, Glukoz ve Fruktöz) etkisi, farklı sitokinin tiplerinin (BA, Kin, TDZ ve 2iP) ve bunların 0,5 mgL⁻¹ GA₃ ile olan kombinasyonlarının etkisi, *in vitro* da çoğaltılan sürgünlerin köklenmeleri için farklı oksin tiplerinin (IBA, IAA, NAA ve 2,4-D) ve bunların oranlarının (1.0, 2.0, 4.0 mgL⁻¹) etkisi, köklendirilmiş sakız rejenerantlarının doğal şartlara aktarılmasında torfun etkileri test edilmiştir. Çalışmamızda geliştirilen protokol ile, *P. lentiscus* bitkisine ait aksenik fidelerin, geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde mikroçoğaltım yoluyla hızlı çoğaltımı sağlanmış ve sakız bitkisinin *in vitro* kitlesel çoğaltım yollarından biri aydınlatılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Pistacia lentiscus*, *in vitro*, TIS, mikroçoğaltım, Sakız ağacı

SUMMARY

Micropropagation Of Axenic Shoots Derived From Germinated *Pistacia lentiscus* L. Seeds Using TIS Bioreactor System

The aim of this study is to develop a protocol as an alternative method that can be used *in vitro* micropropagation for an important crop plant mastic (*Pistacia lentiscus*). A temporary immersion bioreactor system (TIS), compared to semi-solid systems has many construction advantages such as, the system can be controlled by an automation system; a greater number of explants could be used at the same time and; there is no need to use an organic gelling agent. Therefore, in this study, we aimed to investigate micropropagation facilities for juvenile axenic shoots and nodal buds of mastic in the temporary immersion bioreactor system, and to develop a method suitable for mass propagation of *P. lentiscus* from their axenic shoots. Therefore, shoot tips and nodal segments of *in vitro* grown axenic regenerates derived from seedlings of *Pistacia lentiscus* were used as material. The seeds were surface sterilized according to the method described by Kılınc (2014). The proliferation rate of explants treated with medium at certain time intervals in temporary immersion bioreactor systems (TIS) were examined. The trials for determination of proliferation medium in TIS, MS medium contained 1 mgL^{-1} BA and 0.5 mgL^{-1} GA₃ and supplemented with 30 gL^{-1} sucrose were used. The explants in various immersion frequencies (4, 8, 16, 24 and 32 h) and immersion times (5, 10 or 15 min) were tested on the TIS system. The highest shoot forming capacity index (2.76 and 1.44) and the minimum hyperhydration rate (%5 and %5) were obtained in both shoot tips and nodal explant respectively with 10 min immersion frequency every 32 h. For micropropagation of axenic shoot tips and nodal buds obtained from the seeds of lentisk, the effects of different medium (MS, WPM and SH), the effects of different carbon sources (sucrose, lactose, glucose and fructose), the effects different cytokinin types (BA, Kin, TDZ, 2iP) and their combination with 0.5 mgL^{-1} GA₃, the effects of different auxin types (IAA, IBA, NAA, 2,4-D) and their different concentrations (1.0 , 2.0 , 4.0 mgL^{-1}) of the best one for rooting of *in vitro* propagated shoots; and the effects of peat for transferring the rooted lentisk regenerants to *in vivo*, were tested respectively. By the protocol presented here, rapid multiplication of axenic *Pistacia lentiscus* plantlets by micropropagation in temporary immersion bioreactor system was achieved, and one of the path way for *in vitro* mass propagation of lentisk were illuminated.

Keywords: *Pistacia lentiscus* , *in vitro*, TIS, micropropagation, Gum plant.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. <i>P. lentiscus</i> bitkisinin Türkiye’ de yayılışı (T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü Sakız Eylem Planı 2014-2019)	4
Şekil 1.2. A) RITA®, B) SETIS®	11
Şekil 2.1. (A).Çeşme ilçesinin Çiftlikköy civarında doğal olarak yetişen dişi <i>P. lentiscus</i> L. ağacı (B). Laboratuvara getirilip temizlenmiş ve muhafaza edilmeye hazır tohum içeren meyveler (C). Ekzokaplarından arındırılmış tohum içeren meyveler.	16
Şekil 3.2. RITA® sistemindeki 1 mgL ⁻¹ BA ve 0.5 mgL ⁻¹ GA ₃ içeren MS besisi ortamında (A). gövde ucu (B). nodal tomurcuklar	27
Şekil 3.3. RITA® sistemindeki 1 mgL ⁻¹ BA ve 0.5 mgL ⁻¹ GA ₃ içeren MS besisi ortamında en iyi sonuç veren şeker tipleri (A). Sukroz (B). Glukoz.....	28
Şekil 3.4. RITA® sistemindeki MS besisi ortamında en iyi sonuç veren sitokinin BA' nın sürgün ucu (A) ve (B)nod üzerine etkileri ve kallus oluşumu gözlenen tdz (C)	30
Şekil 3.5. BA' nın farklı konsantrasyonlarından en iyi sonucu veren 4 mgL ⁻¹ BAP ve 0.5 mgL ⁻¹ sürgün ucu (A) ve nod tomurcukları (B).....	32
Şekil 3.6. En iyi köklenme verilerinin elde edildiği 1 mgL ⁻¹ IBA (A) ve köklenme yüzdesi en az olan mgL ⁻¹ 2,4D (B)	33
Şekil 3.7. 2 mgL ⁻¹ IBA' nın köklenme üzerine etkisi (A) kökler filtre içindeyken (B) filtreden çıkarıldıktan sonra.....	34
Şekil 3.8. RITA® sisteminde köklendirilen köklenmiş bitkicikler seraya aktarılmasından 6 ay sonra.....	36

TABLolar LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1.1. Sakız ağacı ile yapılan önemli in vitro mikroçoğaltım çalışmaları	13
Tablo 2.1. MS-WPM ve SH besi ortamları içeriği (1L besi ortamı için).	17
Tablo 2.2. Besi ortamlarına ilave edilen BBD' ler içeriği.	17
Tablo 2.3. Besi ortamları hazırlanırken ve bitkilerin çoğaltımında kullanılacak diğer malzemeler.....	18
Tablo 3.1. <i>P. lentiscus</i> 'a ait gövde ucu parçalarının, geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde proliferasyonuna 1 mgL ⁻¹ BA ve 0.5 mgL ⁻¹ GA ₃ içeren MS besi ortamında farklı daldırma sıklıklarının etkisi	23
Tablo 3.2. <i>P. lentiscus</i> 'a ait nod parçalarının geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde proliferasyonuna 1 mgL ⁻¹ BA ve 0.5 mgL ⁻¹ GA ₃ içeren MS besi ortamında farklı daldırma sıklıklarının etkisi	23
Tablo 3.3. <i>P. lentiscus</i> 'a ait gövde ucu parçalarının geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde proliferasyonuna 1 mgL ⁻¹ BA ve 0.5 mgL ⁻¹ GA ₃ içeren MS besi ortamında farklı daldırma zamanlarının (5, 10, 15 dk) etkisi	24
Tablo 3.4. <i>P. lentiscus</i> 'a ait nod parçalarının geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde proliferasyonuna 1 mgL ⁻¹ BA ve 0.5 mgL ⁻¹ GA ₃ içeren MS besi ortamında farklı daldırma zamanlarının (5, 10, 15 dk) etkisi	24
Tablo 3.5. <i>P. lentiscus</i> 'a ait gövde ucu parçalarının, RITA® sisteminde proliferasyonuna 1 mgL ⁻¹ BA ve 0.5 mgL ⁻¹ GA ₃ içeren farklı besi ortam tipinin (MS, WPM, SH) etkisi....	26
Tablo 3.6. <i>P. lentiscus</i> 'a ait nod parçalarının, RITA® sisteminde proliferasyonuna 1 mgL ⁻¹ BA ve 0.5 mgL ⁻¹ GA ₃ içeren farklı besi ortam tipinin (MS, WPM, SH) etkisi.....	26

Tablo 3.7. <i>P. lentiscus</i> ' a ait gövde ucu parçalarının, RITA® sistemindeki 1 mgL ⁻¹ BA ve 0.5 mgL ⁻¹ GA ₃ içeren MS besi ortamında çoğaltılmasına farklı karbon kaynaklarının etkisi	28
Tablo 3.8. <i>P. lentiscus</i> ' a ait nod parçalarının, RITA® sistemindeki 1 mgL ⁻¹ BA ve 0.5 mgL ⁻¹ GA ₃ içeren MS besi ortamında çoğaltılmasına farklı karbon kaynaklarının etkisi. 28	
Tablo 3.9. <i>P. lentiscus</i> ' a ait gövde ucu parçalarının, RITA® sistemindeki 0.5 mgL ⁻¹ GA ₃ içeren MS besi ortamında çoğaltılmasına farklı sitokinin tiplerinin etkisi.....	29
Tablo 3.10. <i>P. lentiscus</i> ' a ait nod parçalarının, RITA® sistemindeki 0.5 mgL ⁻¹ GA ₃ içeren MS besi ortamında çoğaltılmasına farklı sitokinin tiplerinin etkisi.....	30
Tablo 3.11. <i>P. lentiscus</i> ' a ait gövde ucu parçalarının, 32 saat 10 dakika daldırma sıklığı ve zamanına ayarlı RITA® sistemindeki proliferasyonuna farklı BA ve GA ₃ kombinasyonlarının etkisi	31
Tablo 3.12. <i>P. lentiscus</i> ' a ait nod parçalarının, 32 saat 10 dakika daldırma sıklığı ve zamanına ayarlı RITA® sistemindeki proliferasyonuna farklı BA ve GA ₃ kombinasyonlarının etkisi	31
Tablo 3.13. Geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde <i>P. lentiscus</i> 'a ait sürgünlerin köklendirilmesine farklı oksin tiplerinin (IBA,IAA,NAA, 2,4-D) etkisi	33
Tablo 3.14. Geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde <i>P. lentiscus</i> 'a ait sürgünlerin köklendirilmesine IBA'nın farklı konsantrasyonlarının (1,2,4 mgL-1)etkisi	34
Tablo 3. 15. <i>Pistacia lentiscus</i> rejenerantlarının doğal şartlara aktarılmasında torfun etkisi.	36

1.GİRİŞ

1.1. Bitki Doku Kültürü Yöntemleri Hakkında Genel Bilgi

Bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi meydana getirme yeteneğine sahip bitki kısımlarından (kök, gövde, embriyo, sürgün) yapay besin ortamında ve aseptik koşullarda yeni bitkilerin elde edilmesine mikroçoğaltım denir. Bitkilerin *in vitro* üretimi, kullanılan explantın özelliğine göre (embriyo, meristem, kallus, hücre, protoplast kültürü) adlandırılır. Mikroçoğaltımın başarısı explantların alındığı anaç bitkilerin genotipi ,sağlık durumları ve yetiştirme koşulları (sıcaklık, nem, beslenme vb.) ile doğrudan ilişkilidir. Bitki doku kültürü veya mikroçoğaltım yöntemlerini beş kısımda incelemek mümkündür. Bunlar I. Embriyo Kültürü, II. Meristem Kültürü, III. Anter ve Ovül Kültürü, IV. Kallus ve Hücre Kültürü ve V.Protoplast Kültürü şeklinde sıralanabilir.Bitki doku kültürü veya mikroçoğaltım yöntemlerinin kendilerine has bazı özellikleri olmasına rağmen, hemen hemen hepsinde kullanılan ve gerekli olan genel teknik aynıdır.

I. Embriyo Kültürü: Yüksek bitkilerin tohumlarından ve tohum taslaklarından embriyoların izole edilerek belli ortamlarda kültüre alınmasına embriyo kültürü denir. Bu kültür oldukça kolaydır ve basit bir kültür ortamı ile başarılı sonuç alınmaktadır. Böylece embriyonik büyümeyi incelemek ve büyüme dönemlerini ortaya koymak, dormansi ve çimlenmenin metabolik ve biyokimyasal ayrıntılarını analiz etmek mümkün olmaktadır. Embriyo kültürü biyolojik temel çalışmalarda, tohumun çimlenmemesi durumunda, ıslah süresini kısaltmada yaşamayan embriyoların kurtarılmasında haploid bitkilerin üretilmesinde, tohum canlılıklarının hızlı test edilmesinde, ender bitkilerin çoğaltılmasında uygulanabilir.

II. Meristem Kültürü: Meristem, devamlı olarak bölünebilme yeteneğine sahip hücrelerin oluşturduğu dokulardır. Bu dokular sayesinde, bitkiler yeni hücre ve organlar kazanarak büyürler. Hayvanlarda embriyo oluşumuna hayatın erken devrelerinde rastlanmakla birlikte, bitkilerde kök ve gövde uçlarındaki büyüme bütün hayat boyunca devam etmektedir. Meristem kültürü tekniği, bitkilerin primer meristematik dokularının izole edilerek steril koşullarda ve yapay besin ortamları üzerinde yetiştirme ve bu yolla yeni bitkiler elde etme esasına dayanan bir vejetatif mikroçoğaltım yöntemidir. Ekonomik öneme sahip türlerin hızlı ve yoğun şekilde çoğaltılmasında kullanılır.

III. Anter ve Ovül Kültürü: Haploid bitki elde etmek amacıyla kullanılan ve özellikle bitki ıslahı yönünden önem taşıyan anter kültürü; bir bitkiden izole edilen anterlerin uygun bir gıda ortamına yerleştirilerek olgun olmayan polen danelerinden bitkilerin geliştirilmesi tekniğidir. Bu tekniğin diğer in vitro haploid bitki elde etme tekniklerine göre avantajı; bir anter içerisinde binlerce mikrosporun bulunması ve uygun bir in vitro kültür sistemi ortaya konabildiğinde bir anterden çok sayıda haploid bitki elde edilebilmesidir. Anter kültürünün temel prensibi; normal olarak erkek gameti oluşturacak olan polen hücresinin gelişmesini durdurmak ve somatik hücrelerde olduğu gibi polen hücresini direkt olarak bir bitki oluşturmaya zorlamaktır. Döllenmemiş yumurtalığın ya da yumurta hücrelerinin kültüre alınmasıyla haploid embriyo ve bitki oluşumuna ‘ovaryum’ veya ‘ovül kültürleri’ adı verilmektedir.

IV. Kallus ve Hücre Kültürü: Kallus, organize olmamış bitki hücre yığıdır. Bazı bitki türlerinde mekanik yaralama sonucu kallus dokusu oluşmaktadır. Kallus kültürü, bitkiden alınacak bir parçadan (explant) uygun bir gıda ortamında kallus dokusunun oluşturulması işlemidir. Kallus kültürüne bitkinin bölünebilme özelliğine sahip hücrelerin bulunduğu bitki kısımlarından başlanabilir. Genelde, gövde ve köklerin iletim alanlarının yakınındaki dokular daha iyi sonuç vermekle beraber; meyve, endosperm, polen veya embriyo (olgun ve olgun olmayan) da başlangıç materyalini oluşturmaktadır. Hücre kültürleri, uygun sıvı besi ortamlarında bireysel veya kümeler halindeki büyüyen hücrelerden oluşur. Bu kültürler kallus parçalarının sıvı besi ortamı içinde bir çalkalayıcı üzerinde hücreler süspanse haline gelinceye kadar çalkalanması ile elde edilir. Hücre kültürleri, steril fide veya embriyoların homojenize edilmesi ile de elde edilebilir.

V. Protoplast Kültürü: Hücre çeperleri yok edilmiş hücre zarı ile çevrili hücrelerin kültürüdür. Bir hücrenin duvarı uzaklaştırıldığında geriye kalan kısmına protoplast denir. Protoplastlar izotonik ortamlarda canlılığını sürdürüp, yeni duvar oluşturup, mitozla bölünebilir, yeni hücre grupları ve daha sonra da yeni bitkiler oluşturabilirler.

1.2. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren ticari öneme sahip *P. lentiscus*' un *in vitro* mikroçoğaltımında TIS sisteminde, farklı daldırma sıklığı (4, 8, 16, 24 ve 32 saat) ve sürelerinin (5, 10 ve 15 dakika) etkilerini test etmek suretiyle antepfıstığı anacı olarak kullanılan sakız için mevcut çoğaltım tekniklerine alternatif yada tamamlayıcı yeni bir çoğaltma metodu geliştirmektir. Çalışmamızda geliştirilecek protokol diğer odunsu türlerin TIS yolu ile çoğaltılması için model olarak kullanılabilecektir. Türün *in vitro* mikroçoğaltımında geçici daldırma biyoreaktör sistemleri gibi yeni yaklaşımların denenmesi çalışmamızı özgün kılmaktadır.

1.3. *Pistacia lentiscus* (Sakız ağacı) Hakkında Genel Bilgi

Anacardiaceae familyasının *Pistacia* cinsinin on üç üyesinden birisi olan Sakız ağacı (*P. lentiscus* L.) ülkemizde Ege ve Akdeniz bölgelerinde makilik alanlarda yaygın olarak bulunur. 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, mide ağrısı ile diyareye karşı antienflamatuar etkisi sağlık alanında kullanılırken katkı maddesi aroma artırıcı olarak gıda sanayinde de kullanılmaktadır (Onay ve ark., 2014). Ayrıca, sakız bitkisinden elde edilen reçine sakız üretiminde kullanılmakta ve bu da önemli bir ticari gelir oluşturmaktadır.

1.3.1. *Pistacia lentiscus*' un Dünyada ve Ülkemizde Yayılışı

Ege ve Akdeniz bölgelerinde doğal bir yayılış gösteren sakız ağacı herdem yeşil, kuraklığa dayanıklı, dioik ve çalı formunda odunsu bir bitki olup *Anacardiaceae* (Sumakgiller) familyasının *Pistacia* cinsine ait bir üyesidir (Stevens 2008). Sakız ağaçları Dünya'da Akdeniz ikliminin hâkim olduğu tüm kıyı kesimlerinde ve belli bir yüksekliğe kadar iç kesimlerde doğal olarak yetişmektedir (Ak ve Parlakcı, 2009). Dünya üzerinde, Güneybatı ve Güneydoğu Avrupa, Batı Asya, Kuzey Afrika, Avrupa ve Kuzey Afrika'ya yakın birçok ada ve adacıklara (Macaronesia) yayıldığı bildirilmiştir (Prada ve Arizpe, 2008). Akdeniz Bölgesi'nde, Portekiz, İspanya (Balear dahil), Fransa (Korsika dahil), İtalya (Sardinya ve Sicilya dahil), Hırvatistan, Bosna Hersek, Sırbistan, Arnavutluk, Yunanistan (Girit dahil), Kıbrıs, Türkiye, Suriye, Lübnan, Libya, Tunus, Cezayir ve Fas'ta bulunmaktadır. Deniz seviyesinden yaklaşık 700 m yükseltilere kadar çıkabilen bu bitkiye İstanbul Burgaz Ada, İzmir, Ankara İncesu, Kayseri, Muğla, Marmaris, Kuşadası, Datça,

Antalya Kemer, İçel, Tarsus, Ulaş, Seyhan ve Hatay yörelerinde rastlanmıştır (Şekil 1.2. *P. lentiscus* bitkisinin Türkiye’ de yayılışı).



Şekil 1.1. *P. lentiscus* bitkisinin Türkiye’ de yayılışı (T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü Sakız Eylem Planı 2014-2019)

P. lentiscus aynı familyanın diğer önemli üyeleri; *P. atlantica* (çitlenbik), *P. terebinthus* (menengiç) ve *P. vera* (antepfıstığı)’dır. *P. lentiscus* özellikle Akdeniz ve Ortadoğu bölgesinde *Pistacia* genusunda bulunan diğer türlerden (*P.atlantica*, *P. palaestina*, *P. terebinthus* ve *P. khinjuk*) herdem yeşil olması yönünden kolaylıkla ayırt edilebilir. Bitkinin önemli bitkisel özellikleri arasında kalkerli topraklara dayanıklı olması, herhangi bir yaralanmadan sonra kuvvetli olarak kök ve dip sürgünü verebilmesi ve toprağı erozyona karşı koruması sayılabilir. *P. lentiscus* bitkisinin gövdesinden elde edilen **mastik sakızının** ticari değeri oldukça yüksektir.

Bu ürünün 60 farklı kullanım alanı vardır. sakız bitkisinin gövdesinden elde edilen mastik sakızından aynı zamanda gıda ve ilaç sanayisinde hammadde olarak da yararlanılmaktadır. Ayrıca, bu bitkiden elde edilen mastik sakızı, sakız üretiminde kullanılmakta bu da önemli bir ticari gelir oluşturmaktadır. Milattan önceki yıllardan beri birçok ülkede sakız ağacı yapraklarından, reçine ve meyvelerinden ilaç ham maddesi olarak yararlanılmıştır. Sakız ağacı günümüzde de ilaç ve gıda sanayisinin önemli bir ham

maddesidir. Ayrıca kuraklığa karşı dayanıklı olması, sonra kendini çabuk yenileyebilme özelliğinden dolayı ekolojik değeri bulunmaktadır (Mascero ve ark., 2007) .

1.3.2. Sakız Ağacının Morfolojik Özellikleri

Sakız ağacı, genellikle çalı veya ağaçlık formunda gelişen 1-3 m'ye kadar boylanabilen hatta bazen 6 m yüksekliğinde olabilen bir bitkidir (Anonymous, 2005). Derin kök yapısıyla kuraklığa karşı dayanıklıdır. Sulanan koşullarda yetiştirildiği durumda gelişmesi hızlı olmaktadır. Ancak kök boğazında su birikiminin olmaması gerekir. Bu sebeple meyilli araziler yetişmesi için daha ideal olmaktadır. Tuzlu suya toleransı yüksektir ve deniz kenarında dahi gelişmesi iyidir. Derin kök yapısı ve sık yaprak dokusu ile rüzgar ve su erozyonuna karşı kullanılabilir ideal bir bitkidir (Prada ve Arizpe, 2008). *P. lentiscus* yangın gibi olumsuz koşullarda dahi kendini en hızlı yenileyen bitkilerdendir. Bu özelliği ile ölümsüz ağaç olarak da nitelenir.

1.3.2.1. Yaprak yapısı

Yapraklar genellikle 2-4, nadiren de 5-7 çift yaprakçıktan oluşur ve hiçbir zaman terminal yaprakçık taşımaz. Sakız ağacında, bileşik yaprak ekseninde bulunan kanatçıklar çok karakteristiktir. Yaprakları gövdeye bağlı dal üzerinde 2-12 adet dikdörtgen, mızraklı veya oval biçimindedir. Yaprakçıklar yumurtamsı, mızrak, eliptik, küt veya dikenimsi uçlu gibi formlar gösterir ve tüysüzdür. Yaprakçık uçları genelde keskin bir noktayla sonlanır (Davis, 1967). Aynı bitki vejetasyonun farklı dönemlerinde farklı yaprak şekli gösterebilmektedir. Hatta bir bitkinin alt yaprakları ile üstteki yaprakları dahi farklı olabilmektedir. Budanarak terbiye edilen bitkinin de yaprak şekli değişmektedir (Boztok ve Zeybek, 2004). Sakız ağacı, bulunduğu seksiyon içinde en kalın yaprakçılara (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).

1.3.2.2. Çiçekler

Dioik bir tür olan sakız ağacında, periant içermeyen çiçekler 1 yıllık sürgünlerin yaprak koltuklarında bulunur. Sakız ağacında çiçeklenme bahar aylarında gerçekleşmekte ve çok sayıda çiçek üretimi söz konusu olmaktadır. Çiçekleri küçük, kırmızımsı veya sarımsıdır ve çiçekler çiçek salkımı halinde kümelenmiştir. Erkek çiçekler 1-2.5 cm uzunlukta bileşik salkımlar, dişi çiçekler ise 1-3 cm uzunlukta seyrek dallanmış salkımlar halindedir. Diğer *Pistacia* türlerinin aksine, sakız ağacında bulunan çiçek salkımı ana eksen üzerinde

kısalma eğiliminde olduğu için sekonder salkım dalları yaprak eksenini üzerinde hemen hemen bir noktadan çıkarak, çiçekler küçük bir demet şeklini alır. Tozlanma anemofil olarak gerçekleşmektedir (Davis 1967).

1.3.3.3. Meyveler

4-7 mm çapında, yuvarlak-basık ve sivri uçlu, başlangıçta kırmızı, olgunlaştığında ise siyah renktedir. Drupa tipi olan meyveler, etli-sulu bir mezokarp ile kemiksi bir endokarpa sahiptir. Meyveler ekim sonu ile aralık ayı ortasına kadar olgunlaşmaktadır (Boztok ve Zeybek, 2004). Browicz (1987), Sakız Adası'ndaki kültür formlarının varyeteden ziyade, uzun yıllar verime göre selekte edilmiş bir çeşit olduğunu belirtmektedir. Bazı araştırmacılar, reçine elde edilebilen bitki olarak sadece Sakız Adası'ndaki "Chia" varyetesinden bahsetmektedir. Oysa Bailey (1963), varyete veya form farklılığının ötesinde *Anacardiaceae* familyasına dahil türlerin benzer nitelikte reçine verdiğini belirtmektedir. *P. lentiscus* bitkileri ağaç formuna döndükten sonra salgıladığı reçineden yararlanılabilir. (Palle ve Aronne, 2000).

1.3.3.4. Tohum

Kromozom sayısı $2n=24$ 'tür (Zohary, 1952). Tohumlar olgunlaşma döneminde yuvarlak ve düz yüzeylidirler. Tohumlar ekim-kasım ayları arasında toplanabilir (Prada ve Arizpe, 2008). Sakız ağacı, çok sayıda çiçek ve meyve üretmesine karşın yaşayan tohum içeren meyve sayısı çok az olmaktadır. Çiçeklerin büyük kısmı meyve oluşturmamakta ve oluşan meyvelerin önemli bir kısmında ise tohum bulunmamaktadır (Martinez-Palleand Aronne, 2000). Kırmızımsı veya beyaz meyvelerin toplanmasından kaçınılmalıdır. Çünkü bu meyvelerde embriyo ölü veya partenokarpiktir (Jordano, 1988; 1989). Bu nedenle, siyah meyvelerin içerdiği tohum oranı daha yüksek olduğu için hasat sırasında bunların tercih edilmesi gerekmektedir (Verduand Garcia-Fayos, 2002). Kabuğu soyulmuş tohumların 20 °C'da % 75-90 oranında çimlendiği rapor edilmiştir (Prada ve Arizpe, 2008). Mekanik yolla tohum kabuğu soymak çimlenme hızını arttırmakta ve homojen çimlenmeyi sağlamaktadır.

1.3.3. Damla Sakızının Ticari Olarak Kullanımı

Damla sakızı, sakız ağacının gövdesinde açılmış yaralardan damlacıklar halinde sızan sekonder bir bileşiktir. Özellikle bitki yaralanmalara karşı bu reçineyi salgılar. Bununla

birlikte, erkek bitkilerin sakız üretim yetisi dişi genotipine göre daha fazladır (Boztok, 1999). Maddenin toplanması sırasında trapezi veya masa denilen beyaz kil hasat zamanı yere düşen sakızı temiz ve şeffaf tutmak için ağacın altına serpilip, ağaç altındaki alan düzgün bir süpürge ile süpürölür, tüm biriken toplanır ve çuvalllanır. Toplama işlemleri Ağustos ve Eylül aylarında olmakla birlikte, eğer hasat süresi içerisinde süresince yağmur yağarsa sakız bozulabilir. Bu durum, sakızı aşındırabilir veya taze iken yağmur suyuyla karışıp siyaha dönüşür.

Hasat süresince toplanan damla sakızında belli kalite ölçütleri vardır. Bunlardan en önemlisi rengidir; Daha temiz, şeffaf ve beyaz renkli sakız daha kalitelidir. Sakız okside olunca sararır. Şeffaf cam boncuk gibi sakız en kaliteli olandır. Sakızın depolama süresi uzadıkça önce beyaza sonra sarıya döner. Sakıza A, B ve C dereceleri verilir. Bugün mastik sakızının onlarca kullanım alanı vardır: Bu kullanım alanlarını genel olarak dört gruba ayırabiliriz;

- (1) ilaç sanayisinde,
- (2) gıda sanayisinde,
- (3) kimya endüstrisinde ve
- (4) diğer kullanım alanları.

1.3.3.1. İlaç Sanayisinde

Merhem yapımında, ülser hastalığının tedavisinde, diş macununda mastik sakızı kullanılmaktadır. Ayrıca mastik sakızı deri hastalıklarında, yanıklarda, egzama (Palevitch ve Yaniv, 2000), kanser hastalığında (Loutrari ve ark., 2006) geniş ölçüde kullanılmaktadır.

1.3.3.2. Gıda Sanayisinde

Tatlandırıcı olarak, keklerde, dondurmalarda, sütlü tatlılarda, alkollü içkilerin üretiminde özellikle likör ve uzo üretiminde mastik geniş ölçüde kullanılmaktadır. Mastik sakızı aynı zamanda baharat ve değişik soslara kıvam vermek için de kullanılır. Mastik reçenesi ülkemizde pudinglerin ve dondurmaların ana bileşeni olup, bunların açık beyaz renkte olmasını sağlamaktadır (Sherman, 2005).

1.3.3.3. Kimya Endüstrisinde

Kozmetik ürünlerde, verniklemede, resim boyalarında mastik sakızı kullanılmaktadır (Calabro ve Curro, 1974). Mastiğin kimyasal analizi sonucu mastikte % 1-3 arasında

mastik yağı, % 4 oranında α ve β mastisinik asit, % 0.5 mastikhonik asit, %20 α -mastikonik asit, % 18 β -mastikonik asit, % 30 α -mastik rezinesi ve % 20 β -mastik rezinesi bulunmuştur (Sherman, 2005). Mastik yağının anti-bakteriyel (Lauk ve ark., 1996) ve antioksidan (Dedoussis ve ark., 2004) özellikte olduğu tespit edilmiştir.

1.3.3.4. Diğer Kullanım Alanları

Sakız ağacı Meksika'da süs bitkisi olarak kullanılmaktadır ve çok değerlidir. Özellikle şehir yerleşim alanlarında bulunmaktadır ve uygun iklim özelliklerinin olmadığı yaz aylarında bile yaşamını sürdürebilmektedir. Meyvelerinden yenilebilen yağ üretilmekte ve bu yağ doymamış yağ asitleri olan oleik ve linoleik asit bakımından zengin olması bakımından son zamanlarda dikkat çekmektedir (Ucciani ve ark., 1995).

1.3.4. Sakız Ağacını Geleneksel ve Biyoteknolojik Yöntemlerle Çoğaltım

1.3.4.1. Geleneksel Yollarla Çoğaltım ve Karşılaşılan Sorunlar

Sakız ağacının geleneksel çoğaltımı; (1) tohumların çimlendirilmesi, (2) çeliklerin köklendirilmesi ve (3) aşılama yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir.

Pistacia cinsine dahil tüm diğer türler gibi, sakız ağacında da tozlaşma rüzgarlarla olmaktadır (Whitehouse, 1957). Bu nedenle dişi bitkiler yabancı tozlaşma (çapraz tozlaşma) ile tozlanır. Dioik bir bitki olduğu için tohumdan gelişen her fidan genetik olarak değişkendir ve erkek ya da dişi olma olasılığı % 50'dir (Onay, 1996). Ayrıca tohumdan yetişen fidanlarda açılım söz konusudur. Aşılama görülebilecek olası uyumsuzlıklardan dolayı ara aşı yapılması da gerekebilmektedir. Bu tip bir gereklilik, ürün alımında zaman kaybına neden olabileceği gibi sakız ağacı yetiştiriciliğinin gelişmesini olumsuz yönde etkilemektedir. Bugün sakız kalitesinin düşüklüğü nedeniyle dişi bitkilerden üretim yapılmamaktadır. Bu nedenle fidan elde etmek amacıyla doğrudan tohumla üretim sakıncalıdır. Bu bağlamda, ekonomik öneme sahip çoğu odunsu türde olduğu gibi, bu bitkinin de bir yaşlı çeliklerinin sera koşullarında ısıtmalı köklendirme masalarında köklendirilmesi yoluyla hızlı ve ekonomik fidan üretimi ön plana çıkmaktadır. Her ne kadar son zamanlarda çelikle çoğaltılmasında bazı ümit verici bulgular elde edilmiş (İsfendiyaroğlu, 2003), ancak çeliklerde köklenmenin başarısız olduğu rapor edilmiştir (Hepcan, 1992; Mascarello ve ark. 2007). Türün vejetatif çoğaltımında karşılaşılan bu

zorluklar nedeniyle ve ticari kullanımının genişletilmesi ve kazançlı olması için, vejetatif yöntemlerin biyoteknolojik teknikler ile desteklenmesi gerekmektedir.

1.3.4.2.Biyoteknolojik Yöntemlerle Çoğaltım

1900'lü yılların başlarında Haberlant ile geliştirilmiş olan bitki doku kültürü yöntemi, aseptik şartlarda, yapay bir besi ortamında, hücre, doku veya organ gibi çeşitli bitki kısımlarından, kontrollü sıcaklık ve ışık şartlarında yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin eldesini amaçlamaktadır (Thorpe, 2007). Bitki doku kültürü tekniklerine ait alternatif metotlar, 1960' lı yılların başlarında rapor edilmiştir (Martinez-Gomez ve ark., 2005). Bitki doku kültürü teknikleri, geleneksel çoğaltımda (aşılama ve çelikleme) karşılaşılan zorlukların giderilmesi için kullanılmıştır (Cheong, 2012).

Bitki hücre ve doku kültürleri, Tilkat (2006)'a göre; I. Organ Kültürleri (kök, sürgün, anter ve polen), II. Doku Kültürleri (kallus), III. Hücre Kültürleri (Protoplast ve hücre süspansiyonları), IV. Somatik Embriyogenezis, V. Mikroaşılama şeklinde sınıflandırılabilir (Tilkat,2006). Bu biyoteknolojik üretim teknikleriyle ilgili şunları söyleyebiliriz:

I. Organ Kültürleri: Bir bitkiden izole edilen kök, sürgün anter gibi bitki kısımlarını uygun bir gıda ortamına yerleştirilerek yeni bitkiler elde etme esasına dayanan bir mikroçoğaltım yöntemidir.

II. Doku Kültürleri (kallus):Kallus organize olmamış bitki hücre topluluğudur. Bazı bitki türlerinde mekanik yaralanma sonucu kallus dokusu oluşmaktadır. Kallus kültürü, bitkiden alınacak bir parçadan (eksplant) uygun bir gıda ortamında kallus dokusunun oluşturulması, yani izole edilmiş hücre yığınlarının steril kültürüdür.

III. Hücre Kültürleri (Protoplast ve hücre süspansiyonları): Hücre kültürleri uygun sıvı besi ortamlarında bireysel veya kümeler halindeki büyüyen hücrelerden oluşur. Bu kültürler kallus parçalarının sıvı besi ortamı içinde bir çalkalayıcı üzerinde hücreler süspanse haline gelinceye kadar çalkalanması ile elde edilir. Protoplast kültürü ise hücre çeperleri yok edilmiş hücre zarı ile çevrili hücrelerin kültürüdür.

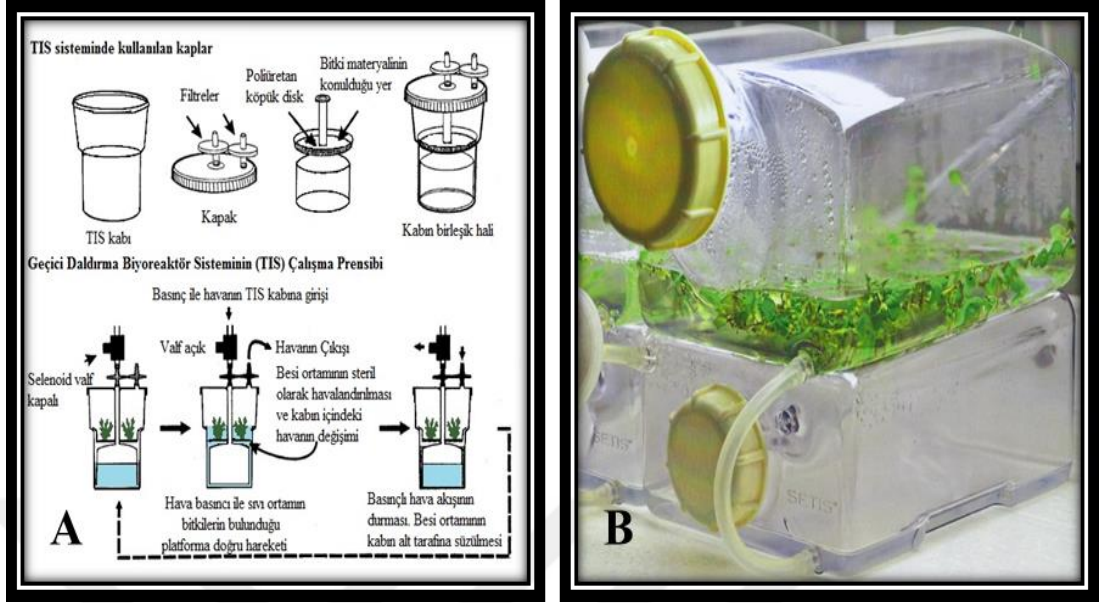
IV. Somatik Embriyogenezis: Somatik hücre veya dokulardan embriyo oluşumu somatik embriyogenezis olarak adlandırılır.

V. Mikroaşılama: *In vitro* mikro aşılama; bitki türlerine göre büyüklüğü. 0.1-0.8 mm arasında değişen sürgün ucu parçalarının, tohumdan ya da *in vitro* mikroçoğaltım yoluyla

elde edilen ve farklı biçimlerde kesit açılan anaçlar üzerine steril koşullarda yerleştirilmesi işlemidir.

Literatür irdelendiğinde, yukarıda verilen biyoteknolojik üretim tekniklerin uygulanmasıyla, sakız ağacının üyesi olduğu *Pistacia* cinsinin bazı türlerde *P. vera* L. (Barghchi ve Alderson, 1985; Onay ve ark., 1995; Tilkat ve Onay, 2009; Akdemir ve ark., 2014), *P. khinjuk* Stocks (Barghchi, 1986; Tilkat ve ark., 2005; Akdemir ve ark., 2014), *P. terebinthus* L. (Pontikis, 1984; Nachevaveark., 2010), *P. atlantica* Desf. (Çetiner ve ark., 1997; Onay, 1998; Akdemir ve ark., 2014), *P. mutica* (Barghchi 1982; 1986b; Ghoraishi, 2006), *P. integerrima* (Çetiner ve ark., 1997) ve *P. palaestina* Boiss (Barghchi 1982, 1986b) ait başarılı çalışmalara rastlanmaktadır. Bununla birlikte tez konusunu oluşturan *P. lentiscus*' a ait yapılan biyoteknolojik çalışmalarda son yıllarda literatürde yer almaktadır (Yıldırım, 2012; Onay ve ark., 2014; Kılınç ve ark., 2015). Rapor edilen çalışmalar irdelendiğinde, çalışmaların daha çok biyoteknolojik yöntemlerle geleneksel çoğaltım problemlerine çözüm aranması ve geliştirilen biyoteknolojik yöntemler yardımıyla elde edilen *in vitro* bitkicikler ile *in vivo* anaç bitkiler arasındaki varyasyon miktarlarının belirlenmesine yönelik olduğu görülmektedir. (Suzerer ve ark., 2013a;b; Kılınç ve ark., 2015; Onay ve ark., 2016).

Biyoteknolojik yöntemler, her ne kadar geleneksel yöntemlerde karşılaşılan sorunlara, çözüm yöntemi üreten bir yol olsa da, yöntemler maliyetlidir (Quiala, 2012). Maliyet arttırıcı etkenler içerisinde özellikle bitkilerin gerekli besin ve mineralleri barındıran sıvı besiyerinin katılaşmasını sağlayarak bitkiye topraktaki gibi tutunma zemini hazırlayan doğal jelleştirici ajanlar ilk sırada yer almaktadır (Quiala, 2012). Biyoteknolojik yöntemlerde jelleştirici ajanlar maliyet hesaplandığında üst sırada yer almaktadır. Ancak, biyoteknolojik yöntemlerin amacı sadece geleneksel çoğaltım yöntemlerine alternatif olmak değil hızlı ve çok miktarda bitki üretmek suretiyle maliyetide azaltmaktır. Bunun için son zamanlarda özellikle kitlesel üretimin yapılabilirdiği, jelleştirici ajanın kullanıldığı tekniklere göre birçok avantajı bulunan (havalandırma otomasyon sistemine ve daha geniş büyüme alanına sahip olması) geçici daldırma biyoreaktör sistemleri geliştirilmiştir. Bu alanda kullanılmak üzere birkaç çeşit geçici daldırma biyoreaktör sistem bulunmaktadır; (Özden-Çiftçi ve ark., 2015).



Şekil 1.2. A) RITA®, B) SETIS®

Son zamanlarda sıvı besiyerlerinin kullanıldığı yarı otomatik geçici daldırma sistemleri arasında RITA® sistemi (Vitropic, Fransa) ilgi çekmektedir. 1990'lı yıllarda geliştirilen cihaz (Alvard vd., 1993; Teisson ve Alvard, 1995) bitkilerin sıvı besiyerine periyodik olarak daldırılması temeline dayandığından mikroçoğaltıma tamamen yeni bir yaklaşım getirmektedir. Doku kültürü çalışmalarında sıvı besiyeri kullanımı, kültürlerin kalitesinin artırılması ve bitki üretim maliyetinin düşürülmesi için ideal çözüm olarak görülmektedir. Gerçekte yarı-katı besiyerlerinin kullanımı ile karşılaştırıldığında, sıvı kültür sistemleri eksplant dokusu ve besiyeri arasındaki teması arttırdığından, eksplantlar tarafından salgılanan toksik bileşenler seyreltildiğinden, besiyeri kabının değiştirilmesine gerek olmadan besiyeri kolaylıkla yenilenebildiğinden daha üniform kültür şartları sağlamaktadır. Sıvı kültür sistemleri geçici daldırma sistemlerinin kullanımına izin veren aletlerle birleştirildiğinde, kültür kaplarının havalandırılması ve eksplantların belli aralıklarda besiyeri ile temas etmesiyle sonuçlanan, daha iyi havalandırma ve daha düşük hiperhidrisite riski gibi pek çok ek üstünlük içermektedir.

Günümüze kadar yukarıda sıralanan üstünlüklere sahip RITA® sistemi, aksiller ve bazal gövde proliferasyonu kullanılarak çoğaltılan birçok bitki türünde denenmiş [muz (Alvard vd., 1993); bittim (Tilkat ve ark., 2014); antep fıstığı (Akdemir ve ark., 2014); vanilya (Ramos-Castella ve ark., 2014); Yam (Polzin ve ark., 2014); papaya (Garcia ve

ark., 2015) ve bu denemeler sıklıkla proliferasyon oranlarının ve kültür kalitesinin artması ile sonuçlanmıştır. Ancak günümüze değin *P. lentiscus* bitkisinin kullanıldığı herhangi bir geçici daldırma biyoreaktör sistemi çalışmasına rastlanılmamıştır. Tez konusunun amacı; ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren bu bitkinin ticari önemi de göz önüne alındığında, türün *in vitro* mikroçoğaltımında geçici daldırma biyoreaktör sistemleri gibi yeni yaklaşımların denenmesi çalışmamızı özgün kılmaktadır ve *P. lentiscus* bitkisine ait aksenik materyalden elde edilmiş gövde uçları ve nodal tomurcuklarının kullanımıyla, yarı katı ortamın kullanımına göre; daha etkili ve hızlı kitlesel çoğaltımın yapılabildiği bir çoğaltım metodu geliştirmektir.

1.3.4.3. Sakız ağacının *in vitro* mikroçoğaltım çalışmaları:

Aksiler veya adventitatif sürgün proliferasyonu ile bitki çoğaltımının gerçekleştiği mikroçoğaltım *in vitro* germplazm saklanması ilk olarak kullanılacak biyoteknolojik yöntemdir. Günümüze kadar, *Pistacia* genusunda yapılan mikroçoğaltım çalışmalarının çoğu ekonomik değeri nedeniyle *P. vera*'da yapılmış olsa da, *P. mutica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, *P. palaestina* ve *P. atlantica* türlerinde de *in vitro* kültürlerin başlatılmasına ve optimizasyonuna çalışılmıştır. Sakız ağacında ise Tablo 1.2' de görüleceği gibi *in vitro* çoğaltılmasıyla ilgili sadece birkaç ön çalışma yapılmıştır (Fascella ve ark., 2004; Taşkın ve İnal, 2005; Mascarello ve ark., 2007). Fascella ve arkadaşlarının (2004) yaptığı çalışmada sakız ağacının çoğaltımında McCown' un makro ve mikro elementlerinin (Lloyd ve McCown, 1980) kullanımının eksplantlarda oluşan kararmayı azalttığı, ancak sürgün proliferasyonunun MS (Murashige ve Skoog, 1962) besi ortamında daha iyi olduğu bildirilmiştir.

Tablo 1.1. Sakız ağacı ile yapılan önemli in vitro mikroçoğaltım çalışmaları

Tür	Eksplant Kaynağı	Sonuç	Kaynak
<i>P. lentiscus</i>	Su	Sürgün proliferasyonu kararma	Fascella ve ark., 2004
<i>P. lentiscus</i>	Su	Kararma nedeniyle sürgün proliferasyonu elde edilememiştir	Taşkın ve İnal, 2005
<i>P. lentiscus</i>	Su	Sürgün proliferasyonu	Yıldırım, 2012
<i>P. lentiscus</i>	Su,Nt,Kn	Sürgün proliferasyonu ve konzervasyon	Koç ve Çiftçi, 2012
<i>P. lentiscus</i>	<i>In vitro</i> Sürgün	Mikroaşılama	Çalar, 2013
<i>P. lentiscus</i>	Su	Optimum sürgün proliferasyon ortamının belirlenmesi	Kılınç vd., 2014a
<i>P. lentiscus</i>	Su	Sürgün proliferasyonu ve genetik kararlılık	Kılınç vd., 2014b
<i>P. lentiscus</i>	Su ve Nt	Rejenerasyon ve Konzervasyon	Koç vd., 2014a
<i>P. lentiscus</i>	<i>In vitro</i> Kültür	<i>In vitro</i> Kültür (Soğuk Stres)	Koç vd., 2014b
<i>P. lentiscus</i>	<i>In vitro</i> Sürgün	Mikroaşılama	Suzerer vd., 2014a
<i>P. lentiscus</i>	Su	Genetik Kararlılık	Suzerer vd., 2014b
<i>P. lentiscus</i>	Su Tohum	En iyi çimlendirme ortamı, sürgün proliferasyon ortamının belirlenmesi ve genetik kararlılık	Onay vd., 2014b
<i>P. lentiscus</i>	Su	Sürgün proliferasyonu ve genetik kararlılık	Onay vd., 2014a

* Su: Sürgün ucu; Nt: Nodal tomurcuk. Kn:Kotiledon nodu

Taşkın ve İnal (2005), *P. lentiscus* var. Chia'nun apikal sürgün uçlarını farklı hormon konsantrasyonlarını içeren MS ve DKW (Driver ve Kuniyuki, 1984) besi ortamlarında kültüre aldıkları çalışmada yaşlı ve genç sakız ağaçlarından alınan materyallerden besi ortamına salınan yoğun fenolik bileşiklerden dolayı eksplantlarda organogenezi gözlemleyememişlerdir. *Pistacia lentiscus*'ta yapılan bir diğer *in vitro* çalışmada ise, Mascarello ve arkadaşları (2007) tohum ve genç bitki eksplantlarını kullanmış ve tohumların çimlenme oranını arttırmak için çimlenmeyi artırıcı çeşitli uygulamalar yapmışlardır. Soğukta tutulan tohumların hidrojen klorür (HCl) ile aşındırılmasının ve gibberelik asit uygulamalarının tohumlarda çimlenme oranını arttırdığının bildirildiği çalışmada; aksenik sürgünlerin *in vitro* çoğaltımında ise 0.5 mgL⁻¹ BA'nın en iyi sürgün proliferasyonunu sağladığı ve eksplant başına 3.5 sürgün oluştuğu bildirilmiştir. Sürgünlerin köklendirilmesi için ise IBA ve NAA etkileri denenmiş ve 0.5 mgL⁻¹ NAA içeren besi ortamında çok sayıda uzun köklerin oluştuğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, *P. lentiscus* var. chia'dan alınan sürgün uçlarından kültür başlatma çalışmalarında, fenolik bileşik salınması ve aşırı kontaminasyondan dolayı *in vitro* aksenik kültürler başlatılamamıştır. Fascella ve ark. (2004) ise, yüzey sterilizasyonu ve çoğaltım aşamasında değişik kombinasyonlardaki besiyeri içerikleri, bekletme sürelerini çalıştığı araştırmasında aseptik bitki materyalleri % 70 etanol ve NaOCl (% 1.2 aktif klorin) çözeltisi uygulanarak elde etmiştir. Aynı çalışmada McCown besi ortamının sürgün nekrozunu azalttığı ve çoğaltım safhasında MS besiyerindeki tuzların yüksek sürgün oluşumunu sağladığı görülmüştür Yıldırım H. (2012) yaptığı *P. lentiscus*' un proliferasyon çalışmalarında farklı besi ortamı MS (Murashige ve Skoog, 1962), DKW (Driver ve Kuniyuki, 1984), QL (Quoirin ve Lepoivre, 1977), WPM (Lloyd ve McCown, 1980) parametrik çalışmasında en iyi sürgün sayısının 2.70 ortalamaıyla MS besi ortamında, en iyi sürgün uzunluğunun 10,6 mm olduğunu DKW destekli besi ortamında rapor etmiştir. Yine aynı çalışmada en iyi besi ortamı olan MS'in konsantrasyonlarını çalışarak sürgün sayısı bakımından en iyi sonucun 1/1 MS ortamında ortalama 2,80 sürgün uzunluğu bakımından ise 2/1 MS besi ortamında 12,2 mm olduğunu rapor etmiştir. Yapılan çalışmanın devamında BA'nın konsantrasyonlarını çalışarak sürgün sayısı ve uzunluğunda optimum proliferasyon 0,5 mgL⁻¹ olduğunu belirtmiştir (Yıldırım H, 2012). BA konsantrasyonuna 0,1 mgL⁻¹ IBA ve 0,1 mgL⁻¹ GA₃'lü besi ortamında sürgün uzunluğu ve sürgün sayısında azalma olduğunu bildirerek IBA ve GA₃ 'ün sürgün proliferasyonunda inhibe edici bir etki olduğunu

belirtmiştir *In vitro* köklendirme genellikle substrat olarak agarlı besi ortam kullanılarak yapılmıştır. (Yıldırım 2012)'nin yaptığı *P. lentiscus*' un köklenme çalışmalarında kullanılan oksin tiplerinden (IBA, NAA, IAA, 2,4-D her biri 1 mgL⁻¹) köklenme yüzdesi kök sayısı ve kök uzunluğunu bakımından en iyi sonucu 1 IBA mgL⁻¹ ile destekli MS besi ortamının verdiği rapor edilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, *P. lentiscus* için TIS sisteminde, farklı daldırma sıklığı (4, 8, 16, 24 veya 32 saat) ve sürelerinin (5, 10 ya da 15 dakika) etkilerini test etmek suretiyle kitlesel bir çoğaltım metodu geliştirmek ve antepfıstığı anacı olarakta kullanılan sakız için mevcut çoğaltım tekniklerine alternatif yada tamamlayıcı yeni bir çoğaltma metodu geliştirmektir. Çalışmamızda geliştirilecek protokol diğer odunsu türlerin TIS yolu ile çoğaltılması için model olarak kullanılabilecektir.

Ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren bu bitkinin ticari önemi de göz önüne alındığında, türün *in vitro* mikroçoğaltımında geçici daldırma biyoreaktör sistemleri gibi yeni yaklaşımların denenmesi çalışmamızı özgün kılmaktadır.

2. MATERİYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1 Bitkisel Materyal

Çalışmamızda İzmir ili Çeşme ilçesinin Çiftlikköy civarında bulunan dişi sakız ağaçlarından toplanan olgun tohumları içeren meyveler çalışma materyallerimizi oluşturmuştur (Şekil 2.1). Laboratuvara getirilen tohumlar cam kavonozlar içerisinde buzdolabında +4 °C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 2.1. (A).Çeşme ilçesinin Çiftlikköy civarında doğal olarak yetişen dişi *P. lentiscus* L. ağacı (B). Laboratuvara getirilip temizlenmiş ve muhafaza edilmeye hazır tohum içeren meyveler (C). Ekzokaplarından arındırılmış tohum içeren meyveler.

2.1.2. Besi Ortamları ve İçerikleri

Tez kapsamında kullanılan bitki materyallerinin doku kültüründe çoğaltımı sırasında kullanılan besi ortamlarına (MS-WPM-SH) ait bileşenler Tablo 2.1.’de, bitki büyüme düzenleyecileri (BBD) Tablo 2.2’ de ve diğer malzemeler Tablo 2.3’ de sunulmuştur.

Tablo 2.1. MS-WPM ve SH besi ortamları içeriği (1L besi ortamı için).

Kimyasallar	Firma	Katalog No	MS	WPM	SH
NH ₄ H ₂ PO ₄	Sigma	467782	-	-	300 mg
NH ₄ NO ₃	Sigma	A-3795	1650 mg	400 mg	-
KNO ₃	Sigma	P-8291	1900 mg	-	2500 mg
KH ₂ PO ₄ (Monobasic)	Sigma	P-8416	170 mg	168 mg	-
Ca(NO ₃) ₂	Sigma	C-2786	-	460 mg	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma	M-7899	370 mg	368 mg	400 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Sigma	C-2536	440 mg	72 mg	200 mg
K ₂ SO ₄	Sigma	P0772	-	988 mg	-
MnSO ₄ ·H ₂ O	Sigma	M-7899	16,9 mg	16,9 mg	10 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma	Z-1001	8,6 mg	8,6 mg	1 mg
Na ₂ MO ₄ ·2H ₂ O	Sigma	M-1651	0,25 mg	0,25 mg	0.1 mg
KI	Riedel-de Haen	03124	0,83 mg	0,83 mg	1 mg
H ₃ BO ₃	Sigma	B-9645	6,20 mg	6,20 mg	5 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	Sigma	C-2911	0,025 mg	0,025 mg	0.1 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	Sigma	C-8027	0,025 mg	0,025 mg	0,2 mg
Demir Kelatör					
FeSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma	F-8263	28 mg	28 mg	20 mg
Na ₂ EDTA	Sigma	4503	37 mg	37 mg	15 mg
Vitamin					
Glisin	Merck	1.04201.0100	2 mg	2 mg	0
Nikotinik Asit	Sigma	N-0765	0,5 mg	0,5 mg	5 mg
TiaminHCl	Sigma	T-3902	0,1 mg	0,1 mg	5 mg
PiridoksinHCl	Sigma	P-8666	0,5 mg	0,5 mg	0.5 mg
Karbon Kaynağı					
Sakkaroz	Sigma	S-0389			
Laktoz	Sigma	L-3625	30 gr	30 gr	30 gr
Fruktoz	Sigma	F-0127			
Glikoz	Sigma	G-8270			
Myo-Inositol	Sigma	I-3011	100 mg	100 mg	100 mg
Katılaştırıcı Ajan					
Agar	Merck	1.01614.1000	7 gr	7 gr	7 gr

Tablo 2.2. Besi ortamlarına ilave edilen BBD' ler içeriği.

Bitki Büyüme Düzenleyicisi	Firma	Katalog No
Sitokinler		
Benzil Amino Pürin (BAP)	Sigma	B-3408
Kinetin (Kin)	Sigma	K-0753
*Tidizaron (TDZ)	Sigma	P-6186
*2-Izo PentilAdenin (2-IP)	Sigma	D-7674
Oksinler		
IndolBütirik Asit (IBA)	Sigma	I-5386
Indol Asetik Asit (IAA)	Sigma	I-2886
Naftalen Asetik Asit (NAA)	Sigma	N-0640
2,4 DikloroFenoksi Asetik Asit (2,4-D)	Sigma	D-7299
Gibberelinler		
*Gibberellik Asit (GA ₃)	Sigma	G-7645

*Otoklavdan Sonra İlave Edilecek

Tablo 2.3. Besi ortamları hazırlanırken ve bitkilerin çoğaltımında kullanılacak diğer malzemeler.

Malzeme	Model	Firma
Etil Alkol (96)	CAS 64-17-5	Alkomed
Sodyum Hipoklorit		
Magenta	GA7	Magenta
Soğutucu (+4 °C)	5231NY	Arçelik
Manyetik Karıştırıcı	F20520162	Velp
Otoklav	HIG-50	Hirayama
Hassas Terazı	AX224	Sartorius
pH Metre	HI 221	Hanna
Etüv	HerathermOGS100	Thermo
TIS Sistemi [(Kap-Pompa-Manifold- Otomasyon Sistemi), (RITA®)]	RITA®	Vitropic
Saf Su Cihazı	Zeener Power 1	Human corporation
Laminar Akımlı Kabin	HeraGuard	Thermo
Bitki Büyütme Odası		Genpa müh.San. ve Tic. LTD. Şti.

2.2. Metot

2.2.1. Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Çalışmalarımızda besi ortamı olarak kullanılan MS (Murashige ve Skoog, 1962), SH (Shenk ve Hildebrandt, 1972) ve WPM (Lloyd ve McCown, 1980) stok çözeltilerin içerikleri Tablo 2.1'de verilmiştir.

Buna göre çalışmalarımızda kullanılan tüm sıvı besi ortamlarının hazırlanması için Tablo 2.1. ve Tablo 2.2' de verilen besi ortamlarını oluşturan her bileşen ilave edildikten, eğer gerekli ise BBD (jelleştirici ajan hariç) de eklendikten sonra balon joje yada erlenmayerler içerisinde dH₂O ile 1L'ye tamamlandı. Hazırlanan besi ortamlarının pH'ı, 1N NaOH veya 1N HCl kullanılarak pH 5.8'e ayarlandı ve 1,2 atmosfer basınç altında 121 °C' de 20 dakika boyunca otoklav edildi.

Katı besi ortamı kullanılan deneylerde jelleştirici ilave edilmiş besi ortamları soğutularak sıcaklık yaklaşık 60°C iken laminar akımlı kabin içerisinde kültür kaplarına aktarıldı ve soğuyana kadar ağzı açık bir şekilde bırakıldı. Sonrasında Magenta kapların ağızları kapatılarak kullanılmak üzere kaldırıldı. Jelleştirici ajan içermeyen (TIS sisteminde kullanılacak olan) besi ortamları kullanılıncaya kadar +4 °C' de buzdolabında saklandı.

2.2.2. Malzemelerin Sterilizasyonu

Besi ortamının hazırlanması ve dökülmesi, tohumların sterilizasyonu ve alt kültürleme işlemlerinde kullanılacak olan tek kullanımlık malzemeler dışındaki malzemelerin (cam, metal, polipropilen vb.) tamamı 1,2 atmosfer basınç altında 121 °C’ de 20 dakika boyunca otoklav edildi. Kültür işlemleri esnasında kullanılan pens ve bistüriler 2 kat alüminyum folyo ile uç kısımları açıkta kalmayacak şekilde sarılarak ve bitki parçalarının kesilmesi amacı ile kullanılan filtre kağıtları, iki kat yağlı pişirme kağıtlarına sarılarak, etüvde 180°C’de iki saat süre ile sterilize edildi.

2.2.3. Stok Kültürlerin Eldesi

2.2.3.1. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu

P. lentiscus olgun tohumlarının, yüzey sterilizasyonu Kılınç (2013), Kılınç (İspanya, 2013)'e göre yapıldı. Mezokaplarından ayrılan tohumlar, bir çekiç yardımıyla kırıldıktan sonra, steril cam kaplar içerisinde hazırlanmış % 20’ lik NaOCl’ te 20 dakika boyunca 150 rpm’de çalışan bir çalkalayıcıda çalkalandı ve sonrasında steril erlenler içerisinde besi ortamına ekilmeden önce 5’ er dakika olmak üzere 3 defa steril saf su ile yıkandı.

2.2.3.2. Çimlendirme Çalışmaları

Tohumların çimlendirilmesi, Onay ve ark, 2014 projesindeki protokole göre yapıldı. Yüzey sterilizasyonu tamamlanan tohumlar 1 mgL⁻¹ IBA içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) yarı katı MS besi ortamına ekildikten sonra 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ve 3000 lux aydınlatma gücüne sahip bitki büyütme odasında 28 gün boyunca inkübe edilerek, çimlendirildi.

2.2.3.3. Juvenil Sürgün Ucu ve Nodal Eksplantların Çoğaltılması Çalışmaları

Tohumların çimlenmesinden elde edilen bitkiciklerden alınan sürgün ucu ve nod parçacıkları Onay ve ark, 2014’ de tamamlanan projesinde, sürgün çoğaltımında kullanılan en iyi besi ortamı olan 1 mgL⁻¹ BA ve 0.5 mgL⁻¹ GA₃ içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) besi ortamında 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ve 3000 lux aydınlatma gücüne sahip bitki büyütme odasında 28 gün boyunca inkübe edilerek, çoğaltıldı. Her 28 günde bir altkültürü yapılarak stok kültür elde edildi.

2.2.4. Geçici Daldırma Biyoreaktör Sisteminde (RITA®) Mikroçoğaltım Protokolünün Geliştirilmesi

RITA® sisteminde yapılan denemelerde sıvı besi ortamı kullanıldı ve yaklaşık 4 hafta (28 gün) süreyle 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ve 3000 lux aydınlatma gücüne sahip bitki büyütme odasında inkübasyona bırakıldı.

2.2.4.1. Mikroçoğaltımda En İyi Daldırma Zamanı ve Sıklığının Belirlenmesi

Yarı katı besi ortamında en iyi sonucun elde edildiği 1 mgL^{-1} BA ve 0.5 mgL^{-1} GA₃ içeren MS besi ortamı jelleştirici ajan kullanılmadan sıvı besi ortamı olarak hazırlandı ilave edilen RITA® sistemindeki ilk denemeler, juvenil *P. lentiscus*'a ait gövde ucu ve nodal tomurcuklar kullanılarak farklı daldırma zamanı (5, 10, 15 dakika) ve farklı daldırma sıklığına (4, 8, 16, 24, 32 saat) ayarlanan RITA® sisteminde 28 gün süreyle proliferasyon gerçekleştirildi.

2.2.4.2. Mikroçoğaltıma Farklı Besi Ortamlarının Etkisi

En iyi daldırma zamanı ve sıklığının belirlenmesinin ardından, RITA® sisteminde mikroçoğaltıma 1 mgL^{-1} BA ve 0.5 mgL^{-1} GA₃ içeren MS-WPM ve SH besi ortamlarının etkisi belirlendi.

2.2.4.3. Mikroçoğaltıma Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi

En iyi daldırma zamanının, sıklığının ve besi ortamı tipinin belirlenmesinin ardından, RITA® sisteminde mikroçoğaltıma 1 mgL^{-1} BA ve 0.5 mgL^{-1} GA₃ içeren MS besi ortamına ilave edilen farklı karbon kaynaklarının; Sakkaroz-Laktoz-Fruktoz ve Glukozun (her biri 30 gL^{-1} konsantrasyonunda) etkisi belirlendi.

2.2.4.4. Mikroçoğaltıma Farklı Sitokinin Tiplerinin Etkisi

En iyi daldırma zamanının, sıklığının ve farklı karbon kaynağının belirlenmesinin ardından, RITA® sisteminde mikroçoğaltıma her biri 1 mgL^{-1} konsantrasyonunda farklı sitokinin tiplerinin (BA, Kin, TDZ ve 2iP) 0.5 mgL^{-1} GA₃ ile kombinasyonunun etkileri de ayrı bir deney ile test edildi.

2.2.4.5. Mikroçoğaltıma BAP' ın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Mikroçoğaltıma farklı sitokinin tiplerinin etkisinin test edilmesinin ardından, BA en iyi sitokinin olarak belirlendi ve bunun üzerine mikroçoğaltıma BA' nın farklı konsantrasyonlarının (1-2-4 mgL⁻¹) 0.5 mgL⁻¹ GA₃ ile kombinasyonunun etkisi bir başka deneyle test edildi.

2.2.4.6. Köklenmeye Farklı Oksin Tiplerinin Etkisi

Stok kültürlerden elde edilen yaklaşık 1-1,5 cm' lik sürgünler, RITA[®] sisteminde her biri 1 mgL⁻¹ olacak şekilde farklı oksin tiplerini (IBA, IAA, NAA ve 2,4-D) içeren MS besisi ortamına aktararak farklı oksin tiplerinin sürgünlerin köklenmesi üzerine etkisi belirlendi.

2.2.4.7. Köklenmeye IBA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

RITA[®] sisteminde, sürgünlerin köklenmesi üzerine farklı oksin tiplerinin etkisinin belirlenmesinin ardından en iyi sonuç veren IBA' nın farklı konsantrasyonları (1, 2, 4 mgL⁻¹)' nın sürgünlerin köklenmesi üzerine etkisi belirlendi.

2.2.4.8. İklimlendirme

RITA[®] sisteminde köklendirilen bitkicikler daha sonra besiyerinden çıkartılarak, musluk suyu altında yıkandıktan sonra steril toprak, torf ve perlit karışımı içeren küçük plastik saksılara konularak sera koşullarına aktarıldı. Aktarımı izleyen ilk 15 gün boyunca saksılar, dış ortamdaki düşük nem koşullarına adaptasyon amacıyla streç film ile kaplandı. Gün aşırı streç film üzerinde birer delik açılıp, düzenli aralıklarla bitkicikler sulandı. 15 günün ardından streç filmin tamamen kaldırılmasıyla bitkicikler sera koşullarında büyütüldü.

2.2.4.7. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

Gövde proliferasyonu için her uygulama en az iki kez, her bir uygulamada da en az 20-25 eksplant kullanılmıştır ve 4 haftalık kültür sonucu oluşan proliferasyon yüzdesi, eksplant başına oluşan gövde sayısı, ortalama gövde uzunlukları ve gövde oluşturma kapasitesi (GOK) hesaplanmıştır. $GOK = \text{Proliferasyon yüzdesi} \times \text{gövde sayısı} / 100$. Köklenme çalışmalarında uzunlukları ortalama 1-1,5 cm olan bitkicikler kullanılmıştır. Kök oluşumu için her uygulama en az iki kez, her bir uygulamada da en az 20 bitkicik kullanılmıştır. Gövdelerin kök oluşturma kapasiteleri ise şu şekilde hesaplanmıştır: Kök oluşturma kapasitesi = Köklenme yüzdesi x kök sayısı / 100.

Bütün çalışmalar tesadüf blokları deneme desenine göre yapılmıştır. Verilerdeki değişkenliği hızlı bir şekilde görmek için bütün çalışma sonuçlarının tanımlayıcı analizleri SPSS 22.0 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 $P \leq 0.05$ seviyesinde çoklu karşılaştırma testlerine (LSD veya Duncan) tabi tutulmuştur. Oransal verilere ise, Ki kare (χ^2) testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Oransal veriler durumunda Ki kare (χ^2) testi uygulanmıştır. Analizlerde aşağıdaki önemlilik seviyeleri kullanılmıştır:

$P > 0.05$ = önemli değil

$P < 0.05$ = önemli

$P < 0.01$ = çok önemli

$P < 0.001$ = oldukça çok önemli

3. BULGULAR

3.1. Geçici Daldırma Biyoreaktör Sisteminde (RITA®) Mikroçoğaltım Protokolünün Geliştirilmesi

3.1.1. Geçici Daldırma Biyoreaktör Sistemlerinin Başlatılmasında En İyi Daldırma Zamanı ve Sıklığının Belirlenmesi

Aksenik olarak çoğaltılan bitkiciklerden alınan, gövde ucu ve nodal tomurcuklar, daldırma sıklığı için Tablo 3.1 ve 3.2’ de ve daldırma zamanı için Tablo 3.3 ve 3.4’te ifade edildiği üzere 1 mgL⁻¹ BA ve 0.5 mgL⁻¹ GA₃ destekli MS sıvı besi ortamına alınarak, farklı daldırma sıklığı ve sonrasında daldırma zamanı denerek yaklaşık 4 hafta (28) gün boyunca inkübe edildi. Alınan veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

Tablo 3.1. *P. lentiscus* ’a ait gövde ucu parçalarının, geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde proliferasyonuna 1 mgL⁻¹ BA ve 0.5 mgL⁻¹ GA₃ içeren MS besi ortamında farklı daldırma sıklıklarının etkisi

Daldırma Sıklığı	Rejenerasyon (%)	Vitrifikasyon (%)	Gövde/Eksplant* (Ort±SE)	Gövde Uzunluğu (cm) (Ort±SE)	G.O.K.**
Kontrol	90 b	10 g	2.45±0.22b***	1.75±0.20 b	2.20
10 dak/4 s	80 c	100 a	2.41±0.35 b	2.05±0.25 b	1.93
10 dak/8 s	70 d	65 b	2.12±0.40 b	1.82±0.10 b	1.48
10 dak/16 s	70 d	40 c	2.10±0.20 b	1.94±0.20 b	1.47
10 dak/24 s	80 c	20 e	2.32±0.20 b	2.12±0.15 b	1.85
10 dak/32 s	95 a	5 f	2.91±0.25 a	2.42±0.20 a	2.76

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

** Gövde oluşturma kapasitesi indeksi.

***Ortalama ± Standart hata.

Tablo 3.2. *P. lentiscus* ’a ait nod parçalarının geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde proliferasyonuna 1 mgL⁻¹ BA ve 0.5 mgL⁻¹ GA₃ içeren MS besi ortamında farklı daldırma sıklıklarının etkisi

Daldırma Sıklığı	Rejenerasyon (%)	Vitrifikasyon (%)	Gövde/Eksplant* (Ort±SE)	Gövde Uzunluğu (cm) (Ort±SE)	G.O.K.**
Kontrol	90 b	10 g	1.70±0.20 a	2.10±0.23 a	1.53
10 dak/4 s	80 c	100 a	1.10±0.10 b	1.80±0.10 b	0.88
10 dak/8 s	70 d	60 b	0.71±0.05 c	1.90±0.17 b	0.77
10 dak/16 s	80 c	30 d	1.17±0.17 b	1.95±0.20 b	0.93
10 dak/24 s	80 c	15 f	1.19±0.20 b	2.10±0.30 a	0.95
10 dak/32 s	90 b	5 h	1.60±0.10 a	1.95±0.10 b	1.44

* 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.

Tablo 3.3. *P. lentiscus* 'a ait gövde ucu parçalarının geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde proliferasyonuna 1 mgL⁻¹ BA ve 0.5 mgL⁻¹ GA₃ içeren MS besisi ortamında farklı daldırma zamanlarının (5, 10, 15 dk) etkisi

Daldırma Zamanı	Rejenerasyon (%)	Vitrifikasyon (%)	Gövde/Eksplant* (Ort $\pm$ SE)	Gövde Uzunluğu (cm) (Ort $\pm$ SE)	G.O.K.**
Kontrol	90 b	10 b	2.45 $\pm$ 0.22 b***	1.75 $\pm$ 0.20 c	2.20
5 dak/32 s	90 b	15 a	2.50 $\pm$ 0.35 b	2.10 $\pm$ 0.15 b	2.25
10 dak/32 s	95 a	5 c	2.97 $\pm$ 0.25 a	2.42 $\pm$ 0.20 a	2.79
15 dak/32 s	90 b	0 d	2.15 $\pm$ 0.30 b	1.65 $\pm$ 0.14 c	1.93

* 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.

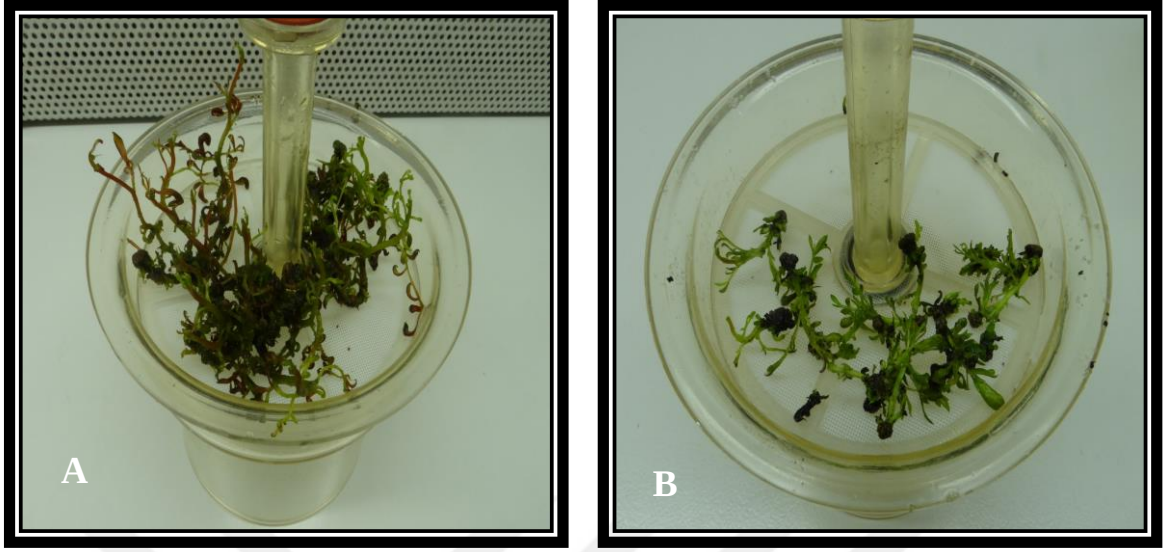
Tablo 3.4. *P. lentiscus* 'a ait nod parçalarının geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde proliferasyonuna 1 mgL⁻¹ BA ve 0.5 mgL⁻¹ GA₃ içeren MS besisi ortamında farklı daldırma zamanlarının (5, 10, 15 dk) etkisi

Daldırma Zamanı	Rejenerasyon (%)	Vitrifikasyon (%)	Gövde/Eksplant* (Ort $\pm$ SE)	Gövde Uzunluğu (cm) (Ort $\pm$ SE)	G.O.K.**
Kontrol	90 b	10 b	1.70 $\pm$ 0.20 a	2.10 $\pm$ 0.23 a	1.53
5 dak/32 s	85 c	15 a	1.20 $\pm$ 0.10 b	1.85 $\pm$ 0.10 b	1.02
10 dak/32 s	90 b	5 c	1.58 $\pm$ 0.10 a	1.95 $\pm$ 0.10 b	1.41
15 dak/32 s	90 b	5 c	1.55 $\pm$ 0.15 a	1.80 $\pm$ 0.21 b	1.39

* 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 3.1. RITA® sistemindeki 1 mgL^{-1} BA ve 0.5 mgL^{-1} GA₃ içeren MS besi ortamında (A). 4 saat 10 dakika (B). 32 saat 10 dakika daldırma sıklığı ve zamanı.

Genel olarak, sıvı besi ortamında gövde uçlarıyla yapılan denemede yarı katı besi ortamına göre gövde başına düşen eksplant sayısı (2.97), gövde uzunluğu (2.42 cm) ve gövde oluşturma kapasitesi (2.79) bakımından daha iyi sonuçlar elde edildi. Ancak aynı, başarı nod tomurcuklarının kullanıldığı denemede sağlanamadı.

Tablo 3.1 ve Tablo 3.2 irdelendiğinde, RITA® sisteminde kısa aralıklarla yapılan daldırma sıklığında (4 ve 8 saat) eksplantlarda % 100 oranında vitrifikasyon oranı elde edildi (Şekil 3.1 A). En yüksek vitrifikasyon yüzdesi % 100 oranında gövde ucu ve nod kullanılan kaplarda 4 saatte bir 10 dakika daldırma sıklığında tespit edildi. Daha uzun daldırma sıklığı denemelerinde (16, 24 ve 32 saat) vitrifikasyon oranı % 5' e kadar azaldı . En düşük vitrifikasyon yüzdesi % 5 oranında gövde ucu ve nod kullanılan kaplarda 32 saatte bir 10 dakika daldırma sıklığında tespit edildi (Şekil 3.1 B). 32 saatte bir 10 dakika daldırma sıklığında gövde ucu kullanılan kaplarda gövde başına düşen eksplant sayısı (2.91 ± 0.25) gövde uzunluğu (2.42 ± 0.20) cm ve gövde oluşturma kapasitesi (2.76) olarak tespit edildi.

Tablo 3.3 ve Tablo 3.4 irdelendiğinde, en uygun daldırma sıklığı denemelerinin ardından 32 saatte bir tekrarlanan daldırma periyoduna farklı daldırma zamanlarının etkisi belirlendi. Gövde ucu ve nod tomurcukları kullanılarak, 32 saatte bir 5, 10 ve 15 dakika olmak üzere farklı daldırma zamanları denendi. Yapılan deneme sonucunda 32 saatte bir

15 dakika yapılan daldırma periyodunda vitrifikasyon görülmez iken Daldırma sıklığı denemelerinde eksplant olarak kullanılan nod tomurcuklarına göre gövde ucu tomurcukları daha iyi gelişim göstermiştir. Her ne kadar, vitrifikasyon oranı düşürülmüş olsa da (32 saatte bir 15 dakika, % 0) gövde başına düşen eksplant sayısı (2.97 ± 0.25), gövde uzunluğu (2.42 ± 0.20) ve gövde oluşturma kapasitesi (2.79) en yüksek 32 saatte bir 10 dakikalık daldırma zamanında elde edildi.

3.1.2. Akselik Gövde Ucu ve Nodal Tomurcukların Proliferasyonuna Farklı Besi Ortamlarının Etkisi

RITA® sisteminde en iyi daldırma zamanı ve sıklığının 32 saatte bir 10 dakika olarak belirlenmesinin ardından farklı besi ortamlarının etkisi incelendi (Tablo 3.5 ve Tablo 3.6).

Tablo 3.5. *P. lentiscus*' a ait gövde ucu parçalarının, RITA® sisteminde proliferasyonuna 1 mgL^{-1} BA ve 0.5 mgL^{-1} GA₃ içeren farklı besi ortam tipinin (MS, WPM, SH) etkisi

Besi Ortamı	Rejenerasyon (%)	Vitrifikasyon (%)	Gövde/Eksplant* (Ort±SE)	Gövde Uzunluğu (cm) (Ort±SE)	G.O.K.**
MS	95 a	5 a	2.61 ± 0.25 a***	2.02 ± 0.20 a	2.48
WPM	95 a	5 a	1.75 ± 0.25 b	0.87 ± 0.06 b	1.66
SH	95 a	5 a	1.60 ± 0.25 b	0.80 ± 0.04 b	1.52

* 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.

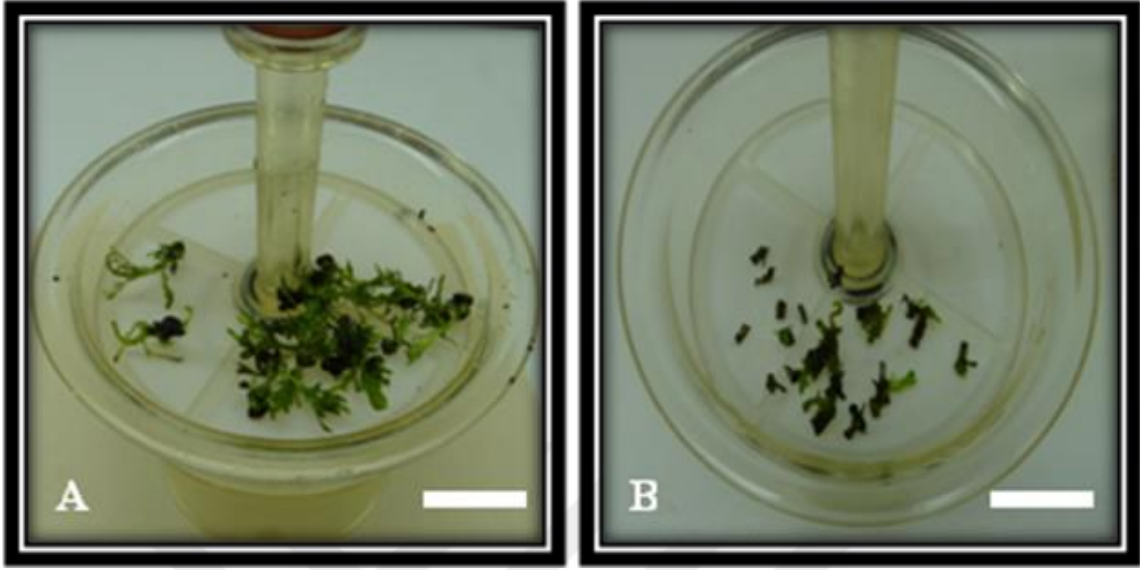
Tablo 3.6. *P. lentiscus*' a ait nod parçalarının, RITA® sisteminde proliferasyonuna 1 mgL^{-1} BA ve 0.5 mgL^{-1} GA₃ içeren farklı besi ortam tipinin (MS, WPM, SH) etkisi

Besi Ortamı	Rejenerasyon (%)	Vitrifikasyon (%)	Gövde/Eksplant* (Ort±SE)	Gövde Uzunluğu (cm) (Ort±SE)	G.O.K.**
MS	95 a	5 a	1.61 ± 0.25 a	1.42 ± 0.20 a	1.52
WPM	90 a	5 a	1.00 ± 0.00 b	1.37 ± 0.20 a	0.90
SH	60 b	10 b	0.55 ± 0.17 c	0.45 ± 0.05 c	0.33

* 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 3.2. RITA® sistemindeki 1 mgL^{-1} BA ve 0.5 mgL^{-1} GA₃ içeren MS besi ortamında (A). gövde ucu (B). nodal tomurcuklar

Tablo 3.5 ve Tablo 3.6 irdelendiğinde, 32 saatte bir 10 dakika daldırma periyodu uygulanan sistemde, 1 mgL^{-1} BA ve 0.5 mgL^{-1} GA₃ içeren MS, WPM ve SH besi ortamlarında gövde ucu ve nod tomurcuklarının gelişiminde, MS besi ortamı hem gövde ucu hem nod tomurcuklarında, gövde başına düşen eksplant sayısı (2.61 ± 0.25 ve 1.61 ± 0.25), ortalım gövde uzunluğu (2.02 ± 0.20 ve 1.42 ± 0.20) ve gövde oluşturma kapasitesi (2.48 ve 1.52) bakımından MS besi ortamından denenen diğer besi ortamlarına göre daha yüksek sonuçlar elde edildi.

3.1.3. Geçici Daldırma Biyoreaktör Sistemlerinde Sürgün Ucu ve Nodal Tomurcukların Proliferasyonuna Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi

RITA® sisteminde 32 saatte bir 10 dakika daldırma periyodunda en iyi besi ortamının belirlenmesinin ardından mikroçoğaltıma farklı karbon kaynaklarının etkisi incelendi.(Tablo 3.7 ve Tablo 3.8)

Tablo 3.7. *P. lentiscus*' a ait gövde ucu parçalarının, RITA® sistemindeki 1 mgL⁻¹ BA ve 0.5 mgL⁻¹ GA₃ içeren MS besisi ortamında çoğaltılmasına farklı karbon kaynaklarının etkisi

Karbon Kaynağı	Rejenerasyon (%)	Vitrifikasyon (%)	Gövde/Eksplant* (Ort±SE)	Gövde Uzunluğu (cm) (Ort±SE)	G.O.K.**
Sukroz	95 a	5b	3.01±0.25 a***	1.65±0.20 a	2.86
Fruktoz	92 a	5 a	2.30±0.40 c	0.62±0.08 c	2.11
Laktoz	90 a	5 a	1.60±0.48 d	0.44±0.05 d	1.44
Glukoz	90 a	5 a	2.85±0.48 b	0.90±0.16 b	2.56

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

** Gövde oluşturma kapasitesi indeksi.

***Ortalama ± Standart hata.

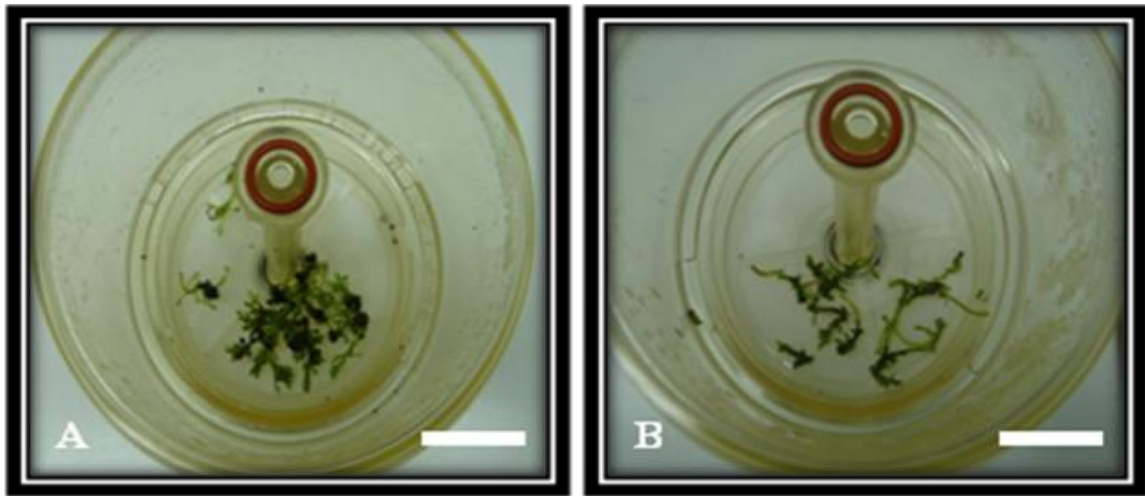
Tablo 3.8. *P. lentiscus*' a ait nod parçalarının, RITA® sistemindeki 1 mgL⁻¹ BA ve 0.5 mgL⁻¹ GA₃ içeren MS besisi ortamında çoğaltılmasına farklı karbon kaynaklarının etkisi

Karbon Kaynağı	Rejenerasyon (%)	Vitrifikasyon (%)	Gövde/Eksplant* (Ort±SE)	Gövde Uzunluğu (cm) (Ort±SE)	G.O.K.**
Sukroz	90 a	5 a	2.05±0.10 a	1.45±0.10 a	1.84
Fruktoz	90 a	5 a	1.65±0.40 b	0.50±0.18 b	1.49
Laktoz	90 a	5 a	0.55±0.17 c	0.24±0.03 c	0.50
Glukoz	90 a	5 a	1.85±0.40 d	0.51±0.10 b	1,67

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

** Gövde oluşturma kapasitesi indeksi.

***Ortalama ± Standart hata.



Şekil 3.3. RITA® sistemindeki 1 mgL⁻¹ BA ve 0.5 mgL⁻¹ GA₃ içeren MS besisi ortamında en iyi sonuç veren şeker tipleri (A). Sukroz (B). Glukoz

Tablo 3.7 ve Tablo 3.8 irdelendiğinde, denenen farklı karbon kaynakları arasında, besi ortamına ilave edilen sukrozun diğer karbon kaynaklarına göre hem gövde ucu hem de nod tomurcuklarında gövde başına düşen eksplant sayısı (3.01 ± 0.25 ve 2.05 ± 0.10), gövde uzunluğu (1.65 ± 0.20 ve 1.45 ± 0.10 cm) ve gövde oluşturma kapasitesi bakımından (2.86 ve 1.84) en yüksek sonuçları verdiği belirlendi. Bununla birlikte sukrozdan sonra gövde başına düşen eksplant sayısı (2.85 ± 0.48 ve 1.85 ± 0.40), gövde uzunluğu (0.90 ± 0.16 ve 0.51 ± 0.10 cm) ve gövde oluşturma kapasitesi bakımından (2.56 ve 1.67) en yüksek sonuçlar glikozda elde edildi.

3.1.4. Mikroçoğaltıma Farklı Sitokinin Tiplerinin Etkisi

Besi ortamı ve karbon kaynağı denemelerinin ardından farklı sitokininlerin gövde çoğaltımına olan etkisi incelendi.

Tablo 3.9. *P. lentiscus*' a ait gövde ucu parçalarının, RITA® sistemindeki 0.5 mgL^{-1} GA_3 içeren MS besi ortamında çoğaltılmasına farklı sitokinin tiplerinin etkisi

Sitokinin Tipi (1 mg/l)	Rejenerasyon (%)	Vitrifikasyon (%)	Gövde/Eksplant* (Ort±SE)	Gövde Uzunluğu (cm) (Ort±SE)	G.O.K.**
BA	95 a	5 a	2.31 ± 0.25 a***	1.72 ± 0.20 a	2.18
Kinetin	92 a	5 a	1.65 ± 0.24 b	0.57 ± 0.06 b	1.51
TDZ	85 b	7 a	1.00 ± 0.00 d	0.61 ± 0.04 b	0.85
2-IP	90 b	5 a	1.30 ± 0.21 c	0.65 ± 0.05 b	1.17

* 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.

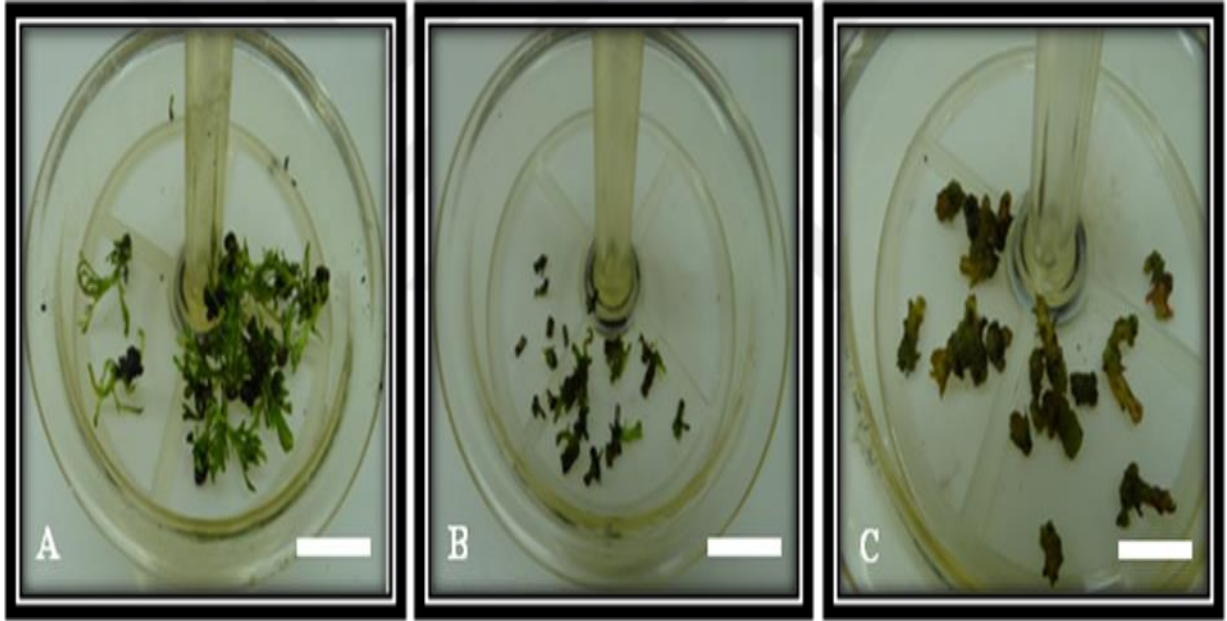
Tablo 3.10. *P. lentiscus*' a ait nod parçalarının, RITA® sistemindeki 0.5 mgL⁻¹ GA₃ içeren MS besisi ortamında çoğaltılmasına farklı sitokinin tiplerinin etkisi

Sitokinin Tipi (1 mg/l)	Rejenerasyon (%)	Vitrifikasyon (%)	Gövde/Eksplant* (Ort±SE)	Gövde Uzunluğu (cm) (Ort±SE)	G.O.K.**
BA	90 a	5 a	1.61±0.25 a	2.02±0.20 a	1.44
Kinetin	85 b	5 a	0.75±0.18 b	0.75±0.06 b	0.64
TDZ	80 b	10 b	0.35±0.17 b	0.38±0.09 b	0.28
2-IP	85 b	5 a	0.50±0.17 b	0.23±0.05 b	0.43

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

** Gövde oluşturma kapasitesi indeksi.

***Ortalama ± Standart hata.



Şekil 3.4 RITA® sistemindeki MS besisi ortamında en iyi sonuç veren sitokinin BA' nın sürgün ucu (A) ve (B)nod üzerine etkileri ve kallus oluşumu gözlenen tdz (C)

Tablo 3.9 ve Tablo 3.10 iredelendiğinde, RITA® sisteminde her 32 saatte bir 10 dakika daldırma zamanı ve sıklığının uygulandığı farklı sitokinin (BA, Kinetin, TDZ ve 2IP) denemelerinde, BA'nın diğer sitokininlere göre hem gövde ucu hem de nod tomurcuklarında gövde başına düşen eksplant sayısı (2.31 ve 1.61), gövde uzunluğu (1.72 ve 2.02) ve gövde oluşturma kapasitesi (2.18 ve 1.44) bakımından daha iyi sonuçlar verdiği belirlendi. Ayrıca Kinetin'in BA' dan sonra diğer iki sitokinin tipine göre hem gövde ucu

hem de nod tomurcuklarında gövde başına düşen eksplant sayısı (1.65 ± 0.24 ve 0.75 ± 0.18), gövde uzunluğu (0.57 ± 0.06 ve 0.75 ± 0.06) ve gövde oluşturma kapasitesi (0.64 ve 1.51) bakımından daha iyi sonuçlar verdiği tespit edildi.

3.1.5. Mikroçoğaltıma BA' nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Eksplantların (hem gövde ucu hem de nodal tomurcuklar) mikroçoğaltımında BA' nın en iyi sitokinin tipi olarak belirlenmesinin ardından BA' nın farklı konsantrasyonlarının (1, 2 ve 4) ve bu konsantrasyonların $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ GA₃ ile kombinasyonlarının mikroçoğaltıma etkisi incelendi.

Tablo 3.11. *P. lentiscus*' a ait gövde ucu parçalarının, 32 saat 10 dakika daldırma sıklığı ve zamanına ayarlı RITA® sistemindeki proliferasyonuna farklı BA ve GA₃ kombinasyonlarının etkisi

Sitokinin Tipi (mg/l)	Rejenerasyon (%)	Vitrifikasyon (%)	Gövde/Eksplant* (Ort±SE)	Gövde Uzunluğu (cm) (Ort±SE)	G.O.K.**
1 BA	90	5 a	1.50 ± 0.25 e	1.80 ± 0.14 f	1.35
1 BA+0,5 GA ₃	95	5 a	2.28 ± 0.15 c	1.89 ± 0.08 e	2.16
2 BA	90	5 a	2.50 ± 0.50 b	2.05 ± 0.05 d	2.25
2 BA+0,5 GA ₃	95	5 a	2.78 ± 0.33 b	2.45 ± 0.12 c	2.64
4 BA	85	10 a	2.05 ± 0.05 d	2.55 ± 0.20 b	1.74
4 BA+0,5 GA ₃	90	5 b	3.25 ± 0.15 a	3.05 ± 0.15 a	2.92

* 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.

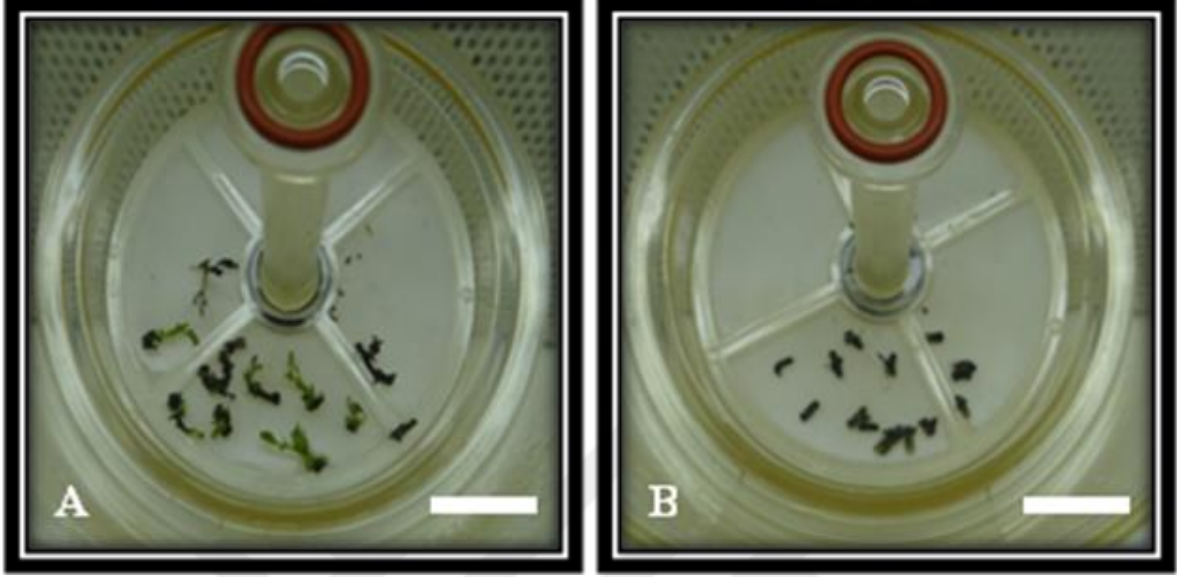
Tablo 3.12. *P. lentiscus*' a ait nod parçalarının, 32 saat 10 dakika daldırma sıklığı ve zamanına ayarlı RITA® sistemindeki proliferasyonuna farklı BA ve GA₃ kombinasyonlarının etkisi

Sitokinin Tipi (mg/l)	Rejenerasyon (%)	Vitrifikasyon (%)	Gövde/Eksplant* (Ort±SE)	Gövde Uzunluğu (cm) (Ort±SE)	G.O.K.**
1 BA	90	5 a	1.50 ± 0.25 b	1.80 ± 0.14 a	1.35
1 BA+0,5 GA ₃	95	5 a	1.28 ± 0.15 c	1.89 ± 0.08 a	1.21
2 BA	90	5 a	1.50 ± 0.50 b	1.05 ± 0.05 c	1.35
2 BA+0,5 GA ₃	95	5 a	1.78 ± 0.33 b	1.45 ± 0.12 b	1.65
4 BA	85	10 a	1.05 ± 0.05 e	1.55 ± 0.20 b	0.90
4 BA+0,5 GA ₃	90	5 b	2.25 ± 0.15 a	1.65 ± 0.15 b	2.02

* 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 3.5. BA' nın farklı konsantrasyonlarından en iyi sonucu veren 4 mgL^{-1} BAP ve 0.5 mgL^{-1} sürgün ucu (A) ve nod tomurcukları (B)

Tablo 3.11 ve Tablo 3.12 irdelendiğinde, artan BA konsantrasyonu gövde oluşumuna pozitif bir etki gösterse de yüksek orandaki BA konsantrasyonu çoğaltımı (rejenerasyon yüzdesi) geriletmiştir. Ancak ortama ilave edilen GA_3 bu negatif etkiyi kırarak gövde oluşumuna pozitif bir katkı sağlamıştır. Buna göre 4 mgL^{-1} BA ve 0.5 mgL^{-1} GA_3 içeren MS besisi ortamında hem gövde ucu hem de nodal tomurcukların çoğaltımında diğer BA ile BA ve GA_3 kombinasyonlarına göre gövde başına düşen eksplant sayısı (3.25 ± 0.15 ve 2.25 ± 0.15), gövde uzunluğu (3.05 ± 0.15 ve 1.65 ± 0.15) ve gövde oluşturma kapasitesi (2.92 ve 2.02) bakımından en yüksek değer elde edildi.

3.1.6 Köklendirme Çalışmaları

RITA® sisteminde çoğaltımı yapılan sürgünlerin, köklenmesi üzerine farklı oksinlerin ve en iyi oksin tipinin farklı konsantrasyonlarının etkisi incelendi.

3.1.6.1. Köklenmeye Farklı Oksin Tiplerinin Etkisi

Tablo 3.13. Geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde *P. lentiscus*'a ait sürgünlerin köklendirilmesine farklı oksin tiplerinin (IBA, IAA, NAA, 2,4-D) etkisi

Oksin Tipi (mg/l)	Köklenme (%)	Kök/Eksplant* (Ort±SE)	Kök Uzunluğu (cm) (Ort±SE)	K.O.K.**
Kontrol	0 e	0.00±0.00 d	0.00±0.00 e	0
IBA	40 a	1.40±0.30 a	1.20±0.10 a	0.56
IAA	30 b	0.90±0.20 b	0.70±0.05 b	0.27
NAA	15 c	0.80±0.10 b	0.50±0.05 c	0.12
2,4-D	10 d	0.40±0.05 c	0.40±0.05 d	0.04

* 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.

** Kök oluşturma kapasitesi indeksi.

***Ortalama ± Standart hata.



Şekil 3.6. En iyi köklenme verilerinin elde edildiği 1 mgL⁻¹ IBA (A) ve köklenme yüzdesi en az olan mgL⁻¹ 2,4D (B)

3.1.6.2. Köklenmeye IBA' nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Tablo 3.14. Geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde *P. lentiscus*'a ait sürgünlerin köklendirilmesine IBA'nın farklı konsantrasyonlarının (1,2,4 mgL⁻¹) etkisi

IBA Konsantrasyonu (mg/l)	Köklenme (%)	Kök/Eksplant* (Ort±SE)	Kök Uzunluğu (cm) (Ort±SE)	K.O.K.**
Kontrol	0 d	0.00±0.00 c	0.00±0.00 d	0
1	40 c	1.40±0.30 b	1.20±0.10 a	0.56
2	70 a	2.15±0.50 a	1.40±0.05 b	1.50
4	60 b	1.85±0.40 b	1.00±0.05 c	1.10

* 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.

** Kök oluşturma kapasitesi indeksi.

***Ortalama ± Standart hata.



Şekil 3.7. 2 mgL⁻¹ IBA' nın köklenme üzerine etkisi (A) kökler filtre içindeyken (B) filtreden çıkarıldıktan sonra

Tablo 3.13. irdelendiğinde, herhangi bir oksin ilave edilmemiş MS besisi ortamında herhangi bir kök oluşumu izlenmedi, denenen diğer oksin tipleri içerisinde ise IBA köklenme yüzdesi (40), eksplant başına düşen kök sayısı (1.40 ± 0.30 cm), kök uzunluğu (1.20 ± 0.10 cm) ve kök oluşturma kapasitesi (0.56 cm) bakımından diğer oksin tiplerine göre daha iyi sonuçlar verdiği tespit edildi. Bununla birlikte, denenen 4 farklı köklendirme besisi ortamında en sağlıklı gövdeler 1 mgL^{-1} IBA da gözlenmişken en sağlıklı gövdeler ise 1 mgL^{-1} TDZ'de gözlemlendi. TDZ diğer ortamlara göre daha sağlıklı bir gelişim göstermekle beraber bazı eksplantların gövdelerinin köke yakın olan kısımlarında kallus oluşumu gözlemlendi.

Tablo 3.14 irdelendiğinde, köklenme besisi ortamı olarak, en iyi sonuç veren IBA' nın farklı konsantrasyonlarının denenmesiyle, yüksek konsantrasyonda IBA' nın köklenmeyi artırdığı incelendi. En yüksek köklenme 2 mgL^{-1} IBA içeren MS besisi ortamında köklenme yüzdesi (70), eksplant başına düşen kök sayısı (2.15), kök uzunluğu (1.40 cm) ve kök oluşturma kapasitesi (1.50) olarak elde edildi.

RITA[®] sisteminde köklendirilen bitkilerin köklenmesi sürecinde, kök oluşumundaki gravite yüzünden aşağıya doğru uzanan kökler sistemin eksplant taşıyan file gövdesinden içeri doğru yayıldığından, köklenme sonrası eksplantların sistemden çıkartılması sırasında bazı kökler koptu (Şekil 3.7).

3.1.7. İklimlendirme Çalışmaları

RITA[®] sisteminde köklendirilen gövdeler başarılı bir şekilde sera koşullarına aktarılmışlardır. Bu amaçla, sistemden alınan gövdeler, musluk suyu altında yıkandı. Sistemde köklendirilen bitkicikler, steril kum, toprak ve perlit (1:1:1, v/v/v) içeren plastik saksılara konularak, streç filmle kaplandı ve bitkicikler 3 günde bir sulandı. İki günde bir streç filmde delikler açılarak, kademeli olarak nem azaltıldı. 3 hafta sonra streç tamamen kaldırılarak, bitkiler başarıyla sera koşullarına iklimlendirildi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. RITA® sisteminde köklendirilen köklenmiş bitkicikler seraya aktarılmasından 6 ay sonra.

Tablo 3. 15. *Pistacia lentiscus* rejenerantlarının doğal şartlara aktarılmasında torfun etkisi.

Torf Tipi	Yaşayan Rejenerant* (%)	Toprağa transferden sonra yaşayan rejenerant** (%)
Tam steril	70a***	90a
Yarı steril	50b	80b
Non steril	5c	80b

*Sonuçlar aklimatizasyonunun 21. gününde 30 rejenerantın yüzdesini gösterir

** Sonuçlar toprağa aktarımın 14. gününde yaşayabilen rejenerantın yüzdesini gösterir .Her bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, Kikare testine göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır.

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı, ülkemizde Ege ve Akdeniz bölgelerinde doğal olarak yetişen, sakız ağacının (*Pistacia lentiscus*), mikroçoğaltımı için, geleneksel mikroçoğaltım yöntemlerine alternatif günlük olarak kullanılabilecek bir metot geliştirmektir. Çalışmamızda sakızın (*Pistacia lentiscus*) olgun tohumları eksplant olarak kullanılarak TIS biyoreaktör sistemlerinde bir mikroçoğaltma metodu geliştirildi. Olgun sakız tohumlarında bulunan mantar ve bakteri kökenli kontaminantların arındırılmasının, *in vitro* çalışmalarda önemli problemlere neden olduğu birçok çalışmada (Barghchi, 1982; Bustamente Garcia, 1984; Abousalim, 1990 ve Onay, 1996) rapor edilmiştir. Çalışmamızda sakız bitkisinin olgun tohumlarından itibaren aksenik eksplantların üretilmesi için Kılınç (2013) tarafından geliştirilen yüzey sterilizasyon metodu başarılı bir şekilde uygulandı. Buna göre sakız tohumlarının yüzey sterilizasyonu % 20' lik NaOCl'de 20 dakika bekletilerek elde edildi. Benzer şekilde Barghchi ve Alderson % 20' lik domestos (ticari çamaşır suyu) kullanarak, sakız bitkisi ile aynı cinsten olan yabani antepfıstığı tohumlarının (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. khinjuk* Stocks, *P. mutica*, *P. palaestina*) yüzey sterilizasyonunun başarılı bir şekilde sağlandığını rapor etmişlerdir (Barghchi ve Alderson, 1982). Diğer bir *Pistacia* türü olan *P. atlantica*'nın olgun tohumlarının yüzey sterilizasyonunun ise üç aşamalı bir işlemle yapıldığı Onay (2000) tarafından rapor edilmiştir. Çalışmamızda kullanılacak aksenik eksplantları elde etmek için sterilize edilen olgun sakız tohumlarının *in-vitro* ortamda gelişimleri Kılınç (2013) tarafından geliştirilen kültür başlatma protokolü doğrultusunda, 1.0 mgL⁻¹ IBA ile destekli MS besi ortamında sağlanmıştır. TIS biyoreaktör sisteminde kullanılmak üzere eksplant kaynağı olarak, yine Kılınç (2013) tarafından rapor edilen, 1.0 mgL⁻¹ IBA ile destekli *in vitro* yarı katı MS besi ortamında çoğaltılan aksenik gövde ucu ve nodal tomurcuklar kullanılmıştır.

Bitki üretiminde geçici daldırma bioreaktör sistemi ile sıvı besi ortamının kullanılması, agar temelli geleneksel çoğaltımın engellerini ortadan kaldıran tamamlayıcı bir yöntemdir (Aitken-Christe, 1991; Peak ve ark., 2001, 2005, Etienne- Berthouly, 2002). Çünkü geçici daldırma bioreaktör sistemleri agarlı besi ortamıyla karşılaştırıldığında, genellikle otomasyona daha uygun oluşu, maliyet ve iş gücünün daha düşük olması ve daha yüksek verimle bitki üretiminin gerçekleşmesi nedenleriyle tercih edilmektedir. Bu

nedenle geçici daldırma bioreaktör sistemi bilim insanları ve ticari ölçekte üretim yapan üreticiler bakımından avantajlıdır (Preil, 2005).

Tezimizin konusunu oluşturan geçici daldırma bioreaktör sisteminde (RITA®) mikroçoğaltım protokolünün geliştirilme çalışmalarında, TIS bioreaktör sisteminde en iyi daldırma zamanı ve sıklığının belirlenmesi için daha önceden 1.0 mgL⁻¹ BA ve 0,5 mgL⁻¹ GA₃ içeren yarı katı MS besi ortamında aksenik olarak çoğaltılmış 28 günlük sakız ağacına ait gövde uçları ve nodal tomurcuklar (ortalama 1 cm) kullanılmıştır.

Bunun için öncelikle daha önce yarı katı besi ortamında çoğaltılan mikro sürgünlerin (gövde ucu ve nodal tomurcuklar) TIS sisteminde en iyi daldırma zamanı ve sıklığının belirlenmesi için yine 1 mgL⁻¹ BA ve 0.5 mgL⁻¹ GA₃ içeren MS besi ortamında farklı daldırma zamanı (5, 10, 15 dakika) ve farklı daldırma sıklığı (4, 8, 16, 24, 32 saat) denemelerine tabi tutulmuştur. *In vitro* sakız kültürlerinin geçici daldırma bioreaktör sisteminde başlatılması aşamasında, optimum daldırma sıklığı ve zamanı 32 saat 10 dk olarak belirlenmiştir (gövde ucu için Tablo 3.1 ve Tablo 3.3 , nodal tomurcuklar için Tablo 3.2 ve Tablo 3.4).

Bitki dokularının sürekli besi ortamıyla teması hiperhidrasyon (vitrikasyon) gibi fizyolojik sorunlara neden olsa da (Niemenak ve ark., 2008) RITA gibi geçici daldırma bioreaktör sistemleri bitki dokularını geçici bir süre ile sıvı besi ortamıyla temas ettirdiği için bitki dokularında hiperhidrasyonu azaltmaktadır. Bu sistemlerin her bitki türü için hatta bazen aynı türün farklı varyeteleri için bile optimizasyonuna ihtiyaç vardır.

P. lentiscus ile ilgili yarı katı agarlı besi ortamında mikroçoğaltım çalışmaları olmasına rağmen (Yıldırım, 2012; Kılınç ve ark., 2014). TIS geçici daldırma bioreaktör sistemi ile ilgili herhangi bir çalışma olmamıştır. Yarı katı besi ortamında sürgünler besi ortamıyla temas eden yerden besi ortamındaki bileşenleri alır ve suyun floem ve ksilemdeki hareketi ile taşınır (Guan ve De Klerk, 2000). Ancak sıvı besi ortamında besi ortamındaki bileşenler yapraklarda stoma ve su geçiren porlarla (Schönherr, 2006) daha kısa mesafelerle büyüme bölgelerine taşınır (De Klerk ve Ter Brugge 2011). TIS sisteminde besi ortamında bulunan maddeler bitkinin tüm yüzeyi ile alındığından bitkide büyüme ve gelişmeyi artırabilir (Preil, 2005; Quiala ve ark., 2006).

TIS geçici daldırma bioreaktör sisteminde bitkilerde vitrikasyon en büyük engeldir. Bitki büyüme düzenleyicileri ile birlikte besi ortamı bileşenleri, NH₄⁺ ve Cl⁻ iyonları kültür kaplarındaki kısmi nem gibi çeşitli faktörlerin birlikte etkisi vitrikasyona

sebebe olabilir (Ziv, 1991; Debergh ve ark. 1992; Ivanova ve Van Staden, 2011). Sitokininler ve onların yüksek konsantrasyonları bir çok türde vitrifikasyona neden olabilir çünkü sitokininlerin birçok fizyolojik ve gelişim etkileri vardır (Ivanova ve Van Staden 2011).

TIS geçici daldırma bioreaktör sisteminde daldırma zamanı ve sıklığının belirlenmesi en önemli aşamadır çünkü besin alımı ve hiperhidrasyonu doğrudan etkilemektedir. Geçici daldırma bioreaktör sistemlerinde daldırma zamanı ve sıklığı bitkinin türüne göre oldukça değişkenlik gösteren bir parametredir (Etienne ve Berthouly, 2002). Krauger ve ark (1991) kaya armudunda yaptıkları bir çalışmada, Tis sisteminde daldırma zamanı ve sıklığı, 30 dakikada bir 5 dakika olarak ayarlandığında hiperhidrasyon gözlemlendiğini ancak daldırma zamanı ve sıklığının 60 dakikada bir 5 dakika olarak değiştirilmesinin hiperhidrasyonun ortadan kalkmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Yine kahve bitkisinde 6 saatlik periyotlarla 15 dakikalık uygulama ile başarılı sonuçların elde edildiği rapor edilmiştir (Berthouly ve ark., 1995). Buna ek olarak yine embriyo kültürlerinde kısa süreli daldırma zamanlarının hiperhidrasyonu azalttığı da rapor edilmiştir (Albaran ve ark.,2005)

TIS sistemde daldırma zamanı ve sıklığının sürgün çoğaltımında önemli bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Ziv, 1991). TIS bioreaktör sistemi ile sürgünleri çoğaltılan bazı *Pistacia* türlerinde sürgün proliferasyonunun yarı katı besi ortamından daha yüksek değerlerde olduğu ortaya çıkmış ve buna ek olarak daldırma sıklığının 8 saatten 16 saate kadar değişmesi sürgünlerde vitrifikasyon azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir (Akdemir ve ark., 2014). Aynı şekilde Tilkat ve ark, (2014) tarafından, *P. khinjuk* Stocks bitkisi üzerine yapılan TIS denemelerinde daldırma sıklığının ve zamanı değişmesi ile %100 olan vitrifikasyon oranının % 8'e kadar düştüğü rapor edilmiştir. Yaptığımız çalışmada ise daldırma sıklılığının 32 saat daldırma zamanının 10 dakika olması durumunda daha verimli bir sürgün çoğaltımının elde edileceği, vitrifikasyon oranının ise % 5'e kadar düşürülebileceği tespit edilmiştir.

TIS sisteminde mikroçoğaltıma farklı besi ortamlarının (MS,WPM,SH) etkisi de ayrıca test edilmiştir. Mikrosürgünlerin proliferasyonuna farklı besi ortam tiplerinin etkilerini test ettiğimiz deneyde MS (Muirashige ve Skoog, 1962) besi ortamı en iyi sonucu vermiştir (Tablo 3.5 ve Tablo 3.6)

Şekerler besi ortamının en önemli bileşenleri arasındadır. Kültüre alınan bitki hücre ve dokuları yeterli miktarda karbonhidrat sentezi yapamadıklarından enerji kaynağı olarak çeşitli şekerler kullanılmalıdır. Besi ortamında sıklıkla kullanılan şekerler glikoz, maltoz, fruktoz, sukroz ve rafinoz olup bunlar arasında en fazla kullanılan sukrozdur (George 1993). *P. vera* (Onay 2000, Benmahiou ve ark. 2012), *P. atlantica* (Safari ve ark. 2013), *P. terebinthus* (Garcia ve ark. 1998) *P. khinjuk* (Tilkat 2005) ve *P. lentiscus* (Yıldırım 2012) türlerinde yapılan *in vitro* sürgün proliferasyonunda besi ortamının sukroz ile desteklenmesi başarılı sonuçlar vermiştir. Çalışmamızda da sukrozun daha etkili sonuçlar verdiği ortaya çıkmıştır.

TIS biyoreaktör sistemlerinde mikroçoğaltım için farklı karbon kaynaklarının (Sukroz, Laktoz, Fruktoz ve Glukoz)'un etkisinin değerlendirildiği deneyde ise 1 mgL⁻¹ BA ve 0.5 mgL⁻¹ GA₃ içeren MS besi ortamına 30 gL⁻¹ Sakkaroz uygulamasının aksenik sakız mikrosürgünlerinin mikroçoğaltımı için en uygun karbonhidrat kaynağı olduğu belirlenmiştir (Tablo 3.7 ve Tablo 3.8).

Geçici biyoreaktör sistemlerinde mikroçoğaltım konusunda günümüze değin *Pistacia* genusuna ait sadece iki türde (*Pistacia khinjuk* Stocks ve *Pistacia vera* L.) yapılan iki ayrı yayında da şeker tipinin sürgün proliferasyonu üzerine etkisi konusunda herhangi bir çalışma rapor edilmemiştir (Tilkat ve ark., 2014; Akdemir et al., 2015). Ancak antepfıstığı eksplantları kullanılarak yarı katı besi ortamında gerçekleştirilen organogenezis ve somatik embriyogenezis çalışmalarında çalışmamız ile paralel bir şekilde en iyi şeker tipinin sakkaroz olduğu rapor edilmiştir (Onay, 1996, Tilkat, 2006, Tilkat ve Onay 2009; Tilkat ve ark, 2009).

Yarı katı besi ortamında sürgünlerin hızlı çoğalmalarının nedeni sürgün çoğaltım ortamında bulunan bitki büyüme düzenleyicileri olan sitokininlerdir (Smith, 1992). BBD çeşitlerinin sürgün proliferasyonunda etkileri çeşitli bitki türlerinde farklı sonuçlar göstermesine rağmen sürgün proliferasyonunda genellikle BA'nın daha başarılı sonuçlar verdiği ortaya çıkmaktadır. TIS biyoreaktör sistemlerinde aksenik sakız mikrosürgünlerinin mikroçoğaltımları için farklı sitokinin tiplerinin (her biri 1 mgL⁻¹ konsantrasyonunda; BA, Kin, TDZ ve 2iP) 0,5 mgL⁻¹ GA₃ ile kombinasyonunun etkileri de ayrı bir deney ile test edildiğinde, BA'nın sürgünlerin proliferasyonu için en iyi sitokinin tip olduğu belirlenmiştir (Tablo 3.9 ve Tablo 3.10).

Sonuç olarak 28 günlük kültür gelişimi sonucu, hem gövde ucu hem de nodal tomurcuklar için ayrı ayrı olmak üzere rejenerasyon yüzdesi (% 95 ve % 90), vitrifikasyon yüzdesi her ikisi içinde (% 5), gövde başına düşen eksplant sayısı (2.31 ± 0.25 ve 1.61 ± 0.25), gövde uzunluğu (1.72 ± 0.20 ve 2.02 ± 0.20) ve gövde oluşturma kapasitesi (2.18 ve 1.44) bakımından 1 mgL^{-1} BA'nın 0.5 mgL^{-1} GA₃ ile kombinasyonunun en iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Öte yandan TDZ ile desteklenen besi ortamlarında gelişen sürgünlerin cılız, zayıf ve sayıca daha az olduğu, vitrifikasyon oranının fazla görüldüğü, bunun yanısıra gövde altlarında diğer sitokinin tiplerinde gözlenmeyen kallus oluşumları tespit edilmiştir. Her ne kadar yarı katı besi ortamında yapıldıysa da bizim çalışma sonuçlarımızı destekler bir şekilde Barghchi ve Alderson (1982) farklı Antep fıstığı türlerinin tohumlarının *in vitro* çoğaltımı konusunda yaptıkları ön çalışmada BA'nın en iyi sonucu verdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca doğal koşullar altında yetiştirilen fidelerden alınan sürgün uçlarını kullanarak meristem kültürü yoluyla bir ön çalışma yapan Çetiner ve ark. (1990), 4 mgL^{-1} BA'nın en iyi sonuç verdiğini rapor etmişlerdir. Yine *P. lentiscus* ile aynı genusta bulunan *Pistacia khinjuk* stocks ve *Pistacia vera* L. üzerinde yapılan farklı çalışmalarda da test edilen farklı sitokinin tipleri arasından BA'nın sürgün proliferasyonu bakımından daha iyi sonuçlar verdiği rapor edilmiştir (Tilkat ve ark, 2005, Tilkat 2006, Onay 2000, Tilkat ve ark, 2008; Tilkat ve Onay 2009, Tilkat ve ark, 2009).

Ananas bitkisinde 2.1 mgL^{-1} BA + 0.3 mgL^{-1} NAA içeren MS besi ortamında yapılan sürgün çağaltım çalışmalarında TIS bioreaktör sisteminde yarı katı besi ortamından daha yüksek oranda sürgün çoğaltım oranının elde edildiği rapor edilmiştir (Escalona ve ark., 1999). Benzer şekilde yine kahve bitkisinde yarı katı besi ortamı ile karşılaştırıldığında TIS sisteminde daha başarılı sonuçların elde edildiği ortaya konulmuştur (Söndhal ve ark., 1984).

TIS bioreaktör sistemi kullanılarak sürgünleri çoğaltılan bazı *Pistacia* türlerinde BA ve GA₃ kombinasyonunun daha etkili olduğu ortaya çıkmıştır (Akdemir ve ark., 2014). Yaptığımız çalışmada 4 mgL^{-1} BA + 0.5 mgL^{-1} GA₃ olduğu ortaya çıkmıştır (Tablo 3.11 ve Tablo 3.12).

Çalışmamızda sürgünlerin proliferasyonu için en iyi sitokinin tipinin belirlenmesinin ardından yine sürgünlerin proliferasyonları üzerine BA'nın farklı konsantrasyonlarının ($1-2-4 \text{ mgL}^{-1}$ BA) ve bunların 0.5 mgL^{-1} GA₃ ile kombinasyonlarının etkisi de ayrı bir deney ile test edilmiştir (Tablo 3.11 ve Tablo 3.12). Hem gövde ucu hem de nodal tomurcukların

rejenerasyon yüzdesi bakımından (% 95) 2 mgL⁻¹ BA ve 0,5 GA₃ mgL⁻¹ uygulamasının daha iyi sonuç vermesine rağmen hem gövde ucu hem de nodal tomurcukların sırasıyla gövde/eksplant sayısı (3.25±0.15 ve 2.25±0.15), gövde uzunluğu (3.05±0.15 ve 1.65±0.15) ve gövde oluşturma kapasitesi (2.92 ve 2.02) bakımından her iki eksplant tipi için de en iyi sonuçlar 4 mgL⁻¹ BA ve 0,5 mgL⁻¹ GA₃ uygulamasından elde edilmiştir.

Sürgünlerden bitkicik elde edebilmek için sağlıklı sürgün ve kök sistemine sahip eksplantlar elde etmek gerekir. *P. lentiscus* türünde 1 mgL⁻¹ IBA ile desteklenmiş yarı katı MS ortamı kullanılarak % 88 oranında köklenme elde edildiği bildirilmiştir (Yıldırım 2012). Benzer şekilde Kılınç ve ark. (2014) tarafından yapılan *P. lentiscus* köklendirme çalışmalarında yarı katı MS besi ortamında köklenme oranı % 94 olarak tespit edilmiştir. TIS bioreaktör sistemi kullanılarak *P. vera* “ Siirt” türünde yapılan köklendirme çalışmalarında köklenme oranında IBA’nın diğer oksinlerden daha verimli olduğu tespit edilmiştir (Akdemir ve ark., 2014). TIS bioreaktör sisteminde hızla çoğalan aksenik sakız sürgünlerinin köklenme çalışmalarında ise farklı oksin tiplerinin (her biri için 1 mgL⁻¹ olacak şekilde; IBA, IAA, NAA ve 2,4-D) etkilerinin çalışıldığı deneyde, 1 mgL⁻¹ IBA’nın diğer oksinler ile karşılaştırıldığında sürgünlerin köklenmeleri bakımından daha iyi sonuç verdiği (% 40) tespit edilmiştir (Tablo 3.13). Ancak yarı katı ortamda yapılan çalışmalara (Yıldırım, 2012; Kılınç, 2014) nispetle daha düşük (% 40) bir köklenme oranının olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.13). Ayrıca kök uçlarının TIS sisteminde eksplantları taşıyan tabla görevi gören süzgeç porları büyük sorunlara neden olmuştur. Zira kökler süzgeç porlarında sıkışarak büyük hasarlara uğramaktadır.

Sakız’ın da aralarında bulunduğu *Pistacia* cinsine ait türlerin *in vitro* köklenmesinde IBA’nın etkili bir oksin olduğu daha önce birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Barghchi, 1982; Bustamente Garcia, 1984; Abousalim, 1990 ve Onay, 1996, Tilkat 2005, Tilkat ve Onay 2009, Tilkat et al, 2009, Kılınç et al, 2013).

TIS sisteminde aksenik sürgünlerin köklenmesine IBA’nın farklı konsantrasyonlarının (1, 2, 4 mgL⁻¹) etkisinin değerlendirildiği deneyde ise 28 günlük inkübasyon süresi sonunda oluşan ortalama köklenen eksplant yüzdesi (% 70), kök uzunluğu (1,40±0.05cm), eksplant başına düşen kök sayısı (2,15±0.50) ve kök oluşturma kapasitesi (1,50) bakımından en iyi sonucun 2.0 mgL⁻¹ IBA ile destekli MS besi ortamından alındığı tespit edilmiştir (Tablo 3.14).

RITA® sisteminde köklendirilen bitkicikler, daha sonra besiyerinden çıkartılarak, musluk suyu altında yıkanmış ve steril toprak, torf ve perlit karışımı içeren küçük plastik saksılara konularak sera koşullarına % 70 yaşama oranı ile aktarılmıştır (Tablo 3.15). *In vitro* köklenmiş yeni fidelerin doğal şartlara alıştırılması iki aşamalı bir safhada yapılmıştır. İlk aşamada tam steril torf içerisinde 2-3 hafta kademeli olarak nemlilik oranı azaltılan fideler 2-3 haftanın sonunda steril 1:1:1 torf : kum : toprak karışımına transfer edilerek doğal şartlara alıştırma işleminde % 90 başarı elde edilmiştir.

TIS bioreaktör sistemi ile çoğaltılan bitkilerin tarla performansları ile ilgili kısıtlı bilgi vardır. Mikroçoğaltımın aklimatizasyon aşamasında görülen bitki kayıpları mikroçoğaltımın en büyük problemelerinden biridir. TIS bioreaktör sisteminde aklimatizasyon aşaması yarı katı sistemler ile karşılaştırıldığında genellikle daha başarılı sonuçlar vermiştir. Ananas sürgünlerinin köklendirilmesi ve aklimatizasyonu aşamasında, köklendirmede kullanılan sürgünlerin uzunluğu ile orantılı olarak daha yüksek aklimatizasyon oranlarının (% 80-90) elde edildiği rapor edilmiştir (Escalona ve ark., 1999). TIS bioreaktör sistemi ile köklendirilen kahve bitkisi sürgünlerinde doğrudan saksılara aktararak aklimatize edildikleri bildirilmiştir (Berthouly ve ark., 1995).

Sonuç olarak, bu çalışmada, sakızın TIS sisteminde *in vitro* mikroçoğaltılması için geleneksel yarı katı *in vitro* çoğaltım yöntemlerine alternatif bir metod geliştirilmiştir. Ayrıca yapılacak ileri çalışmalarla elde edilecek sonuçlar anaç olarak kullanılan diğer *Pistacia* türlerine uygulanabileceği gibi, aksenik sakız tohumlarından organogenezis ile başarılı sürgün rejenerasyonu çalışmaları protoplast kültürü için uygun bir materyal olması bakımından da bu sonuçların faydalı olabileceği gözardı edilmemelidir.

Bu çalışmada geliştirilen *in vitro* çoğaltma metodunun *Pistacia* türlerinin ticari olarak çoğaltılması çalışmalarına az da olsa bir katkı yapacağını umut ediyoruz.

KAYNAKLAR

Abousalim A., Micropropagation and Micrografting Of Pistachio (*P. vera* L. and *P. atlantica* Desf.), Doktora Tezi, University of London, (1990).

Ahmet Onay, Engin Tilkat, Veysel Süzerer, Özge Karakaş Metin, Yelda Özden Çiftçi, Fatih Mehmet Kılınç, İbrahim Koç, Muhammet Şakiroğlu, Hakan Yıldırım, Ahu Altınkut Uncuoğlu, Nazan Çalar, Ömer Faruk Akdemir. 2016. Rejuvenation of Mature Lentisk by Micro grafting and Evaluation of Genetic Stability. Turkish Journal of Biology. DOI: 10.3906/biy-1510-25

Aitken-Christie J., Kozai T., Smith MAL. 1995. Glossary, In: : Aitken-Christie J., Kozai T., Smith MAL. (eds). Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture, Kluwer, Dordrecht pp: ix-xii.

Ak, B.E ve Parlakcı H. (2009) Pistacia lentiscus in the Mediterranean Region İn Turkey. In: Proc. 1st IS on pomegranate. Ed. A.I. özgüven. Acta Hort. 818, ISHS 2009, pp:77-82
Akdemir H, Süzerer V, Onay A, Tilkat E, Ersali Y, Çiftçi YO (2014) Micropropagation of the pistachio and its root stocks by temporary immersionsystem. Plant Cell Tissue Organ Cult 117:65–76

Albarran J, Bertrand B, Lartaud M, Etienne H (2005) Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. Plant Cell Tissue Organ Cult 81: 27–36.

Alvard D., Cote F., Teisson C. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micro-propagation: Effects of temporary immersion of explants., *Plant Cell Tiss Org Cult* 32, 55-60.

Anonymous, (1998). The Wealth of India, A Dictionary of Indian Raw Materials and Industrial Products, vol. VIIIPublication and Information Directorate, CSIR, New Delhi. p. 120

Anonymous.(2005). Turkish Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Directorate of Samsun, Agricultural Products Planning Statistics

Bailey L.H., (1963).The Standard Cyclopedia Of Horticulture.

Barghchi M. (1982) *In vitro* propagation of *Pistacia* species. Ph.D. Thesis, Nottingham University, UK.

Barghchi, M. and Alderson, P.G. (1985) *In-vitro* propagation of *P. vera* L. and commercial varieties of Ohadi and Kellegchochi. Journal of Horticultural Science 60. 423-440.

Barghchi M., *In Vitro* Micropropagation of *Pistacia* Rootstocks, Proceeding of The International Plant Prop. (1986a), 35. 334-337.

Berthouly M, Dufour M, Alvard D, Carasco C, Alemanno L, Teisson C (1995) Coffee micropropagation in a liquid medium using the temporary immersion technique. In: ASIC Publishers (eds) Proceedings of the 16th international scientific Colloquim on Coffee, Kyoto, Japan. Vevey, Switzerland, pp 514-519

Berthouly M., Etienne H. 2005. Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation, In. Hvoslef-Eide AK., Preil W. (eds.) Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation, Springer, Dordrecht, The Neitherland, Pp:165-195

Boztok, Ş. (1999), Sakız Yetiştiriciliği Ege Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi, Çeşme Doğa ve Hayvan Severler ve Koruyanlar Derneği Yerel Gündem 21 İzmir, 15 s.

Boztok Ş. Ulvi Zeybek, (2004). *Pistacia* Cinsine Dahil Bazı Doğal Bitkilerin Sakız Reçinesi Kalitesi Açısından İrdelenmesi, Gıda ve İlaç Sanayinde Değerlendirilmesi Üzerine Arş.

Browicz, F.A. 1987. *Pistacia lentiscus* L. var. chia (Anacardiaceae) on Chios island, Pl.Sys.Evol., 155:189-195.

Bustamente-Garcia M.A., Micropropagation and Rejuvenation of *Pistacia* Species and The Mechanism By Which Light Influences Root Initiation, Doktora Tezi, University Of California, Davis Us, (1984).

Calabro G., Curro P., (1974). Costituenti degli olii essenziali. Nota IV essenza di lentisco, Estratto da Essenze Derivati Agrumari 44:82-92 (*in Italian*)

Cetiner, S., H.Yucel, Y.Aka-Kacar and Y.Yalcın-Mendi, (1997). Clonal Propagation of *Pistacia* Root stocks by Meristem and Shoot Culture, Proceedings of the Fifth International Symp. on Temperate Zone Fruits in the Tropics and Subtropics. Acta Horticulturae, ISHS, 441, 333-335.

Cheong E.J. 2012. Biotechnological approaches for improvement and conservation of *Prunus* species. Plant Biotechnol Rep 6:17-28. Plant Biotechnology Reports, 6:17-28.

Davis PH. 1967 *Linum* L. In: Davis PH. (ed.) Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Edinburgh 2: 425-450

Debergh P., Aitken-Christie J., Cohen D., Grout B., Von Arnold S., Zimmerman R., Ziv M., Reconsideration of The Term ‘Vitrification’ As Used In Micropropagation, Plant Cell Tiss. Org. Cult., (1992), 30:135-140.

Dedoussis GVZ, Kaliora AC, Psarras S, Chiou A, Mylona A, Papadopoulos NG, Andrikopoulos NK. 2004 Antiatherogenic effect of *Pistacia lentiscus* via GSH restoration and down regulation of CD36 mRNA expression. *Atherosclerosis* 174:293–303

De Klerk G.J., Ter Brugge J., Micropropagation Of Dahlia In Static Liquid Medium Using Slow-Release Tools of Medium Ingredients, *Sci Hortic.*, **(2011)**, 127:542–547.

Driver JA, Kuniyuki AH (1984). *In vitro* propagation of Paradox walnut *Juglans hindsii* x *Juglans regia* rootstock. *HortScience*, 19: 507-509.

Etienne H., Lartoud M., Michaux-Ferriere N., Carron MP., Berthouly M., Teisson C. 1997. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) using the temporary immersion technique, *In vitro Cell Dev Biol Plant* 33, 81-87

Etienne H & Berthouly M (2002) Temporary immersion in plant micropropagation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69: 215–231.

Escalona M., Lorenzo JC., Gonzalez B., Daquinta M., Gonzalez JL., Desjardins Y., Barroto CG. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems, *Plant Cell Rep* 18, 743-748

Fascella G, Airo M, Zizzo GV, Ruffoni B. 2004 Prime osservazioni sulla coltivazione in vitro di Lentisco (*Pistacia lentiscus* L.). *Italus Hortus* 11(4):141-143 (in Italian).

F.M.Kilinc, Sakız ağacı (*Pistacia lentiscus* L.)’nın in vitro klonal çoğaltılması, Yüksek lisans tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Haziran 2013, Diyarbakır, 6-7 s.

F. M. Kilinc, V. Suzerer, Y. Ozden Ciftci, I. Koc, H. Akdemir, H. Yildirim, E. Tilkat and A. Onay, 2013. Improved shoot multiplication of lentisk (*Pistacia lentiscus* L.) in vitro using different carbohydrates and medium strengths, VI. International Symposium on Almonds and Pistachios, Abstract Book pp.115, 27-31 May, Murcia SPAIN.

Fatih Mehmet Kılınç, Veysel Süzerer, Ahmet Onay, Yelda Özden Çiftçi, Engin Tilkat, Ahu Altınkut Uncuoğlu, İbrahim Koç, Ömer Faruk Akdemir, Yusuf Ersalı, Nazan Çalar. 2014. Sakız Ağacı (*Pistacia lentiscus* L.)’nın In vitro Mikroçoğaltımında Klonal Etkinin Önemi. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, s 800, Eskişehir, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir.

Fatih Mehmet Kılınç, Veysel Süzerer, Yelda Özden Çiftçi, Ahmet Onay, Hakan Yıldırım, Ahu Altınkut Uncuoğlu, Engin Tilkat, İbrahim Koç, Ömer Faruk Akdemir and Özge Karakaş Metin. 2015. Clonal Micropropagation of *Pistacia lentiscus* L. and Assessment of Genetic Stability Using IRAP Markers. *Plant Growth Regulation*, 75:75–88.

Garcia-Fayos P., Verdu M. 1998. “Soil seed bank, factors controlling germination and establishment of a Mediterranean shrub: *Pistacia lentiscus* L.”, *Acta Oecologica*, 19(4), 357-366.

García V., Ariadne, Sandra, Yanet, González, Ohitza, Díaz, Andy, Albarran, José Gerardo, Schmidt, Alexandra, Salazar, Efraín, Mujica, Yris, Casado, Raúl, Fernández, José, & Marín R, Carlos. Micropropagation of papaya plants in temporary immersion recipients from axillary shoots. *Rev. colomb. biotecnol* [online]. 2015, vol.17, n.1, pp. 70-78.

George E.F., Part 1. The Technology, Eds: George E.F., Sherrington P.D., *Plant Propagation By Tissue Culture*, Basingstoke, UK, (1993).

Guan H., De Klerk G.J., Stem Segments of Apple Microcuttings Take Up Auxin Predominantly Via The Cut Surface And Not Via The Epidermal Surface, *Sci. Hortic.*, (2000), 86:23–32.

Ghoraishi SR. 2006. Micropropagation of *P. mutica*. *Acta Horticulturae*. 726: 183-192

Hepcan Ş. 1992. İzmir çevresinde kıyı şeridi bitki örtüsü içinde yer alan bazı bitkilerin çeliklerinin köklenmesi üzerine araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, E.Ü. Ziraat Fakültesi, Peyzaj Mimarlığı Bölümü, Bornova, 57s

Ibrahim Koç, Hulya Akdemir, Ahmet Onay, Yelda Özden Ciftci. 2014a. Cold-Induced genetic instability in micropropagated *Pistacia lentiscus* L. Plantlets. *Acta Physiol. Plant.* 36:2373–2384.

Ibrahim Koç, Ahmet Onay, Yelda Özden Ciftci. 2014b. In vitro regeneration and conservation of the lentisk (*Pistacia lentiscus* L.). *Turkish J. Biology* 38: 653-663.

Ivanova M., Van Staden J., Influence of Gelling Agent And Cytokinins On The Control Of Hyperhydricity In *Aloe Olyphylla*, *Plant Cell Tiss Org. Cult.*, (2011), 104:13–21.

İsfendiyaroğlu, M., 2003, Effects of Some Physical and Biochemical Factors On The Rooting Of Mastic Tree (*Pistacia lentiscus* var. Chia Duham.) Cuttings., *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 40(1):25-32

Jordano P (1988) Polinizacion y variabilidad de la produccion de semillas en *Pistacia lentiscus* (L) (*Anacardiaceae*). *Analestel Jardin Botanico de Madrid* 45:213-231

Jordano P. 1989. “Pre-dispersal biology of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae): cumulative effects on seed removal by birds”, *Oikos* ,55: 375-386.

Kiliç, F.M., Süzer, V., Özden Çiftçi, Y., Koç, I., Akdemir, H., Yildirim, H., Tilkat, E. and Onay, A. 2014. Improved shoot multiplication of lentisk (*Pistacia lentiscus* L.) using different carbohydrates and media. *Acta Hort. (ISHS)* 1028:153-160

Lauk L, Ragusa S, Rapisada A, Franco S. 1996 *In vivo* antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. extracts: preliminary report, *Journal of Chemotherapy* **8**:207–209.

Loutrari H, Magkouta S, Pyriochou A, Koika V, Kolisis F N, Papapetropoulos A, Roussos C. 2006 Mastic oil from *Pistacia lentiscus* var. chia inhibits growth and survival of human K562 leukemia cells and attenuates angiogenesis. *Nutr. Cancer* 55(1):86–93.

Lloyd G, McCown B. 1980 Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* **30**:421–427

Mascarello C, Fascella G, Zizzo GV, Mantovani E, Ruffoni B. 2007 *In Vivo* and *In Vitro* Propagation of *Pistacia lentiscus* L. *Acta Horticulturae* 764: 299-305

Martinez- Palie E, Aronne G (2000) Reproductive cycle of *Pistacia lentiscus* (*Anacardiaceae*) in Southern Italy. *Plant Biosystems* 134:365-371

Martinez-Gomez, P., R. Sanchez-Perez, M. Rubiio, F. Dicenta, T. M. Gradziel and G.O. Sozzi, 2005. Application of Recent Biotechnologies to Prunus Tree Crop Genetic Improvement. *Clen. Inv. Agr.*, 32(2): 73 - 96.

Martin C., González-Benito M.E., Survival And Genetic Stability of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev Shoot Apices After Cryopreservation By Vitrification and Encapsulation–Dehydration, *Cryobiology*, (2005), 51:281–289.

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15(3): 473-497

Nacheva L., Gercheva P., Zhivondov A., 2010. Micropropagation of Rare Transsexual Forms of *Pistacia* (*Pistacia terebinthus* L.) Found in Bulgaria.

Nazan Çalar. “Sakız ağacı (*Pistacia lentiscus* L.)’nin *Pistacia* anaçları (*Pistacia vera* L., *Pistacia khinjuk* Stocks, *Pistacia atlantica* Desf., *Pistacia terebinthus* L.) üzerine *in vitro* mikoroşılması” Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Haziran, 2013.

Niemenak N, Saare-Surminski K, Rohsius C, Ndoumou DO, Lieberei R. 2008. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. *Plant Cell Reports* 27: 667– 676.

Onay, A, Jeffree, C.E. and Yeoman, M.M. (1995) Somatic embryogenesis in cultured immature kernels of Pistachio, *Pistacia vera* L.. *Plant Cell Reports* **15**: 192-195.

Onay A. 1996, *In vitro* organogenesis and embryogenesis of Pistachio, *Pistacia vera* L. PhD Thesis, University of Edinburgh, UK, pp:198.

Onay A., Somatic Embryogenesis From Mature Seed Cultures of *Pistacia atlantica*. Turk J Agric For 24 (1998) 465–473 © TÜBİTAK.

Onay A., Namlı, S., Antepfıstığının (*Pistacia vera* L.) Yapraklarında Somatik Embriyogenesis, XIV. Ulusal Biyoloji Kongresi, Samsun, 7-10 Eylül 1998, Cilt II, Bitki Fizyolojisi-Bitki Anatomisi ve Hidrobiyoloji Seksiyonları, (1998), 44-53,

Onay A., Jeffree C.E. 2000. Somatic Embryogenesis in Pistachio. In: Somatic embryogenesis in woody plants. Edited by S. Mohan Jain, Pramod K. Gupta, Ronald J. Newton (Forestry Sciences)

Onay, A., Özden-Çiftçi Y., Yıldırım H., Tilkat E. 2014. “Sakız Ağacının (*Pistacialentiscus* L.) Juvenil ve Olgun Eksplantlarının Mikroçoğaltımı, Kriyoprezervasyonu ve Genetik Kararlılığının Belirlenmesi” Proje Sonuç Raporu (Proje No: 110T941).

Özden Çiftçi Yelda, Hülya Akdemir, Veysel Süzerer. 2015. Mass Propagation of Plants via Bioreactors. September 2015, International Workshop on Green Biotechnology, p 35, Bayramoğlu-Darıca, Kocaeli, Turkey.

Palevitch D., Yaniv Z., (2000). Medicinal Plants of the Holy Land. Modan Publishing House, Tel Aviv, Israel. In Ljubuncic et al. (eds) The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacialentiscus* in experimental liver disease. J.Ethnopharmacol, pp.198–204.

Pignatti G, Crobeddu S (2005) Effects of rejuvenation on cutting propagation of Mediterranean shrub species. Foresta 2:290-295 (online URL: <http://www.sisef.it/>)

Polzin F., Sylvestre I., Dechamp E., Ilbert P., Etienne H., Engelmann F., 2014. Effect of activated charcoal on multiplication of Africanyam (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) nodal segments using a temporary immersion bioreactor (RITA (R)). In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 50 (2) : 210-216.

Pontikis CA. 1984. ”In vitro propagation of *Pistacia terebinthus* L.”, Plant Propagator 30, 3, 14-15.

Prada, M. A., Arizpe, D., 2008. *Pistacia lentiscus* L. In: Riparian tree and shrub propagation handbook. Page 90-93

Preil W., General Introduction: A Personal Reflection On The Use of Liquid Media For *In Vitro* Culture, Eds: Hvorslev-Eide A.K., Preil W., Liquid Culture Systems For *In Vitro* Plant Propagation Springer, Berlin, (2005), Pp:1–18.

Ramos-Castella A, Iglesias-Andreu LG, Bello-Bello J, Lee-Espinosa H (2014) Improve dpropagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *In vitro Cell Dev BiolPlant*50:576–581.

Sherman DR. 2005 The Magic Tree - Marvelous Masticha", *Epikouria Magazine*, Fall/Winter, Issue 1.

Schenk RU, Hildebrandt A (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50:199–204

Schönherr J., Characterization of Aqueous Pores In Plant Cuticles and Permeation of Ionic Solutes, *J. Exp. Bot.*, (2006), 57:2471–2491.

Süzerer, V. (2013). Mikroaşılanan ve mikroçoğaltılan ticari öneme sahip badem (*Prunus dulcis* (Mill) D.A.) çeşitlerine ait klonların genetik kararlılıklarının moleküler belirteçler ile incelenmesi. Yüksek Lisans, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Gebze/Kocaeli, 174 s.

Stevens P.F. 2008. Angiosperm Phylogeny Website, Version 9.

Taşkın T, İnal A. 2005 Sakız Ağacı (*Pistacia lentiscus* var. *chia* Duhamel)’nın *in vitro* mikroçoğaltımı üzerine araştırmalar. *Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi* 15 (1): 1-14.

Teisson C., Alvard D. 1995. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: Temporary immersion. In: Terzi M., Cella R., Falavigna A. (eds), *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*, Kluwer Acad Publ, Dordrecht, Pp: 105-110.

Thorpe T.A. 2007. History of plant tissue culture. *Mol Biotechnol.* 2007 Oct;37(2):169-80.

Tilkat E., Işıksalan Ç., Onay A., In Vitro Propagation of Khinjuk Pistachio (*Pistacia khinjuk* Stocks) Through Seedling Apical Shoot Tip Culture, Propagation of Ornamental Plants, (2005) 5(3):1-5.

Tilkat, E., 2006. “Erkek Antepfıstığı (*Pistacia vera* L. cv. ‘*Atl*’) Ağaçlarının *in vitro* Mikroçoğaltılması., Doktora Tezi, Dicle üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 144 pp. Eylül 2006.

Tilkat E., Onay A., Yildirim H. and Ayaz E. 2009a. Direct plant regeneration from mature leaf explants of pistachio, *Pistacia vera* L. *Scientia Horticulturae*, 121(3): 361-365, DOI: 10.1016/j.scienta.2009.02.007

Tilkat E., Ozden-Tokatlı Y., Akdemir H., Onay A., Ayaz E. 2009b. Novel Methods in Micropropagation of Pistachio In: *Handbook of Plant Biology*. Edited by Dr. Aqeel Ahmad

Tilkat E., Y. Özden-Tokatlı, H. Akdemir, A. Onay ve E. Ayaz Tilkat (2012), *Novel Methods in Micropropagation of Pistachio*, Crop Production for Agricultural Improvement (CPAI), Ashraf, M.; Öztürk, M.; Ahmad, M.S.A.; Aksoy, A. (Eds.), Part 2, pp. 379-393, Print ISBN 978-94-007-4115-7, DOI: 10.1007/978-94-007-4116-4_14.

Tilkat E, Süzerer V, Ersali Y, Hoşer A, Gül C, Kiliç MF, Ayaz Tilkat E, Akdemir H, Özden Çiftçi Y, Onay A. (2013). Micropropagation of *Pistacia khinjuk* juvenile shoots using temporaryimmersion bioreactor system (TIS). VI International Symposium on Almonds and Pistachios, May 2013, Murcia, Spain.

Tilkat E, Süzerer V, Ersali Y, Hoşer A, Gül C, Kiliç MF, Ayaz Tilkat E, Akdemir H, Özden Çiftçi Y, Onay A. (2013). Micropropagation of *Pistacia khinjuk* juvenile shoots using temporaryimmersion bioreactor system (TIS). VI International Symposium on Almonds and Pistachios, May 2013, Murcia, Spain.

Tilkat E.,Ersali Y., Suzerer V., Hoşer A., Gül C., Kiliç F.M., Ayaz Tilkat E. Akdemir H., Ozden Çiftçi Y., Onay A. 2014. Mass Shoot Proliferation of *Pistacia khinjuk* Stocks Using Temporary Immersion Bioreactor Systems (TIS). (ActaHorticulturae VI. ISHS International Symposium on Pistachios and Almonds. May,2013, Murcia, Spain). ActaHortic. 1028:145-151.

Ucciani E 1995 Nouveau dictionnaire des Huiles Ve'ge'tales—composition en acides gras. Technique et Documentation—Lavoisier, Paris (*in French*)

Vegas García, Ariadne, Sandrea, Yanet, González, Ohitza, Díaz, Andy, Albarran, José Gerardo, Schmidt, Alexandra, Salazar, Efraín, Mujica, Yris, Casado, Raúl, Fernández, José, &Marín R, Carlos. Micropropagation of papaya plants in temporary immersion recipients from axillary shoots. Rev. colomb. biotecnol [online]. **2015**, vol.17, n.1, pp. 70-78.

Verdu M., Garcia –Fayos P., (2002). Ecologia reproductiva de *Pistacia lentiscus* L. (*Anacardiaceae*): anacronismo evolutivo en el matorral mediterranes.Rev. Chil. Hist. Nat.,Vol.75, No.1, pp.57-65

Veysel Süzerer, Ahmet Onay, Özge Karakaş Metin, Hakan Yıldırım, Yelda Özden Çiftçi, Engin Tilkat, Fatih Mehmet Kılınç, Ahu Altınkut Uncuoğlu, Nazan Çalar İbrahim Koç. 2013a. Micropropagation of Mature Male and Female lentisk (*Pistacia lentiscus*) and Evaluation of Their Genetic Stability Using Fluorescent Based AFLP markers. September 2013, Acta Horticulture, ISHS 3. International Symposium on Molecular Markers in Horticulture, p 47-48, Riva del Garda, Trento, Italy.

Veysel Süzerer, Fatih Mehmet Kılınç, Ahmet Onay, Ahu Altınkut Uncuoğlu, Hakan Yıldırım, Yelda Özden Çiftçi, Engin Tilkat, Özge Karakaş Metin, İbrahim Koç, Nazan Çalar. 2013b. In-Vitro Clonal Micropropagation of Lentisk (*Pistacia lentiscus*) and Evaluation of Genetic Stability Via Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP). September 2013, Acta Horticulture, ISHS 3. International Symposium on Molecular Markers in Horticulture, pp 96-97, Riva del Garda, Trento, Italy.

Veysel Süzerer, Ahmet Onay, Fatih Mehmet Kılınç, Yelda Özden Çiftçi, Ahu Altınkut Uncuoğlu, Ömer Faruk Akdemir, Engin Tilkat, Nazan Çalar and Hülya Akdemir. 2014a. InVitro Micrografting of MasticTree, *Pistacia lentiscus* L. June 2014, In vitro Biology Meeting of the SIVB, p 63, Savannah, Georgia, USA.

Veysel Süzerer, Özge Karakaş Metin, İbrahim Koç, Ahmet Onay, Fatih Mehmet Kılınç, Yelda Özden Çiftçi, Ahu Altınkut Uncuoğlu, Ömer Faruk Akdemir, Engin Tilkat, Nazan Çalar and Hülya Akdemir. 2014b. Assessment of Clonal Fidelity Between Selected Lentisk Genotypes (*Pistacia lentiscus* L.) by IRAP and Florescent Based AFLP. June 2014, In vitro Biology Meeting of the SIVB, pp 63-64, Savannah, Georgia, USA.

Yıldırım H., (2012),Micropropagation of *Pistacia lentiscus*L. from axenic seedlingderived explants. *Scientia Horticulturae* 137 29–35

Ziv M., Vitrification: Morphological And Physiological Disorders of *In Vitro* Plants, Eds:Debergh P.C., Zimmerman R.H., Micropropagation: Technology And Application, Kluwer, Dordrecht, (1991), Pp:45–69.

Zohary, M. 1952. A monographical study of the genus *Pistacia*. *Palestinian Journal of Botany* (Jerusalem) 5. 187- 228.

Whitehouse W.E. 1957. “The pistachio nut-a new crop for the western United States”, *Econ.Bot.*, 11, 4, 281-321.

Quiala E., Barbón R., Jiménez E., De Feria M., Chávez M, Capote A., Pérez N.,Biomass Production Of *Cymbopogon citratus* (Dc) Stapf., A Medicinal Plant, In Temporary Immersion Systems, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, (2006), 42(3):298-300.

Quiala E., Canal M.J., Meijon M., Rodriguez R., Chavez M., Valledor L., Feria M., Barbon R., Morphological and Physiological Responses Of Proliferating Shoots of Teak To Temporary Immersion and Ba Treatments. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, (2012), 109:223–234.

Quoirin, M. and Lepoivre, P., (1977). Étude des milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. Acta Hortic. 78: 437–442 (*in French*).



ÖZGEÇMİŞ	
Adı Soyadı	Zeynep EKİNGEN
Doğum Tarihi	27.03.1990
Doğum Yeri	Batman
Yabancı Dili	İngilizce
Lise	Batman Lisesi (2004-2007)
Lisans	Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2008-2012)
Tezsiz Yüksek Lisans	Dicle Üniversitesi Eğitim Fakültesi (2014-2015)
Tezli Yüksek Lisans	Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı (2012-2016)