

T.C.  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SAKIZ AĞACI (*Pistacia lentiscus* L.)'NİN *İN VİTRO* KLONAL  
MİKROÇOĞALTILMASI**

**Fatih Mehmet KILINÇ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DIYARBAKIR**

**HAZİRAN 2013**

**T.C.**  
**DİCLE ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SAKIZ AĞACI ( *Pistacia lentiscus* L.)'NİN *İN VİTRO* KLONAL  
MİKROÇOĞALTILMASI**

**Fatih Mehmet KILINÇ**

**YÜKSEKLİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN: Prof. Dr. Ahmet ONAY**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DİYARBAKIR**

**HAZİRAN 2013**

T.C  
DİCLE UNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ  
DİYARBAKIR

Fatih Mehmet KILINÇ tarafından yapılan “Sakız Ağacı (*Pistacia lentiscus* L.)’nın *in vitro* Klonal Mikroçoğaltılması” konulu bu çalışma , jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı                      Adı Soyadı

Başkan: Prof. Dr. A. Selçuk ERTEKİN

Üye Prof. Dr. Ahmet ONAY(Danışman)

Üye : Prof. Dr.Hasan Ç. ÖZEN

Üye : Doç Dr. Engin TILKAT

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hakan YILDIRIM(İkinci Danışman)

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 28/06/2013

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../20

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

( MÜHÜR )

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Ahmet ONAY'ın danışmanlığında yürütülmüştür

Akademik hayatımda, analitik düşünce ve pratik yaklaşımlarıyla öğrencilerine her zaman yol gösteren, beni hergün bir adım daha ileriye taşıyan, ve bu çalışmada desteğini her zaman hissettiğim saygıdeğer hocam, Prof. Dr Ahmet ONAY'a

Biyoteknoloji laboratuvarının kapılarını açarak çalışmalarımın her bir aşamasını kolaylaştıran, ikinci danışmanım muhterem hocam, Yrd. Doç. Dr. Hakan YILDIRIM'a

Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bölüm Başkanı çalışmamıza yaptığı katkıdan ve göstermiş oldukları alakalarından dolayı Prof. Dr. A. Selçuk ERTEKİN'e

Biyoloji Bölüm'ünde bulunan saygıdeğer hocalarıma

Çalışmanın moleküler ayağının gerçekleştiği GYTE-MBG-Bitki Biyoteknolojisinde çalışan Doç. Dr. Yelda Özden Çiftçi'ye, ve ekibine

Tanıdığım günden beri çalışma prensibi ve akademik duruşuyla adından söz ettiren Doç. Dr. Engin TILKAT'a

Bu süreçte yaptığım araştırma ve çalışmalarında aynı laboratuvarı paylaşmaktan keyif aldığım dönem arkadaşlarım olan Ömer Faruk AKDEMİR, Mahir BİNİCİ ve Nazan ÇALAR'a

Kardeşimden ayırt etmediğim, bilgi birikimine her zaman başvurduğum ender insan, Veysel SÜZERER'e

Bu çalışmaya başladığım dönemde karşıma çıktıktan sonra sevgisini, duruşu, kararları ve fedakarlığı ile hissettiren eşim, kıymetlim Gülay KILINÇ'a

Beni bu hayata hazırlayan, bu seviyeye gelmemde önemli etkenlerden biri olan fedakarlıklarıyla sevgisini ifade eden 2012 Kasım'ında bizlere veda ederek aramızdan ayrılan, derin üzüntülerimi gizleyemediğim, yokluğunu her zaman hissedeceğim merhum, sevgili babacığım Bekir KILINÇ'a, ve canım anneciğim Remziye KILINÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışma, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından (DÜBAP) 12-FF-103 numaralı proje ile desteklenmiştir.

**Fatih Mehmet KILINÇ**

**Bu tezi canım babacığım Bekir KILINÇ'a ithaf ediyorum.**

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
ÇİZELGE LİSTESİ.....	X
ŞEKİL LİSTESİ.....	XII
KISALTIMA VE SİMGELER.....	XIV
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Neden Klonal Mikroçoğaltım.....	2
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	5
2.1. Sakız Ağacının ( <i>P. lentiscus</i> L.) Kökeni ve Sistematiikteki Yeri.....	5
2.2. <i>P. lentiscus</i> L'nın Dünya'da ve Ülkemizde Yayılışı ve Ekolojik İstekleri.....	7
2.2.1. Damla Sakızının Kullanım Alanları.....	10
2.2.1.1. İlaç Sanayisinde.....	11
2.2.1.2. Gıda Sanayisinde.....	13
2.2.1.3. Kimya Endüstrisinde.....	13
2.2.1.4. Diğer Kullanım Alanları.....	13
2.3. Sakız Ağacının Morfolojik Özellikleri.....	14
2.3.1. Kök Yapısı.....	14
2.3.2. Gövde Yapısı.....	14
2.3.3. Çiçek Yapısı.....	14
2.3.4. Meyve Yapısı.....	14
2.3.5. Yaprak Yapısı.....	15
2.3.5.1. Erkek Ağacın Yaprak Yapısı.....	17
2.3.5.2. Dişi Ağacın Yaprak Yapısı.....	17
2.3.6. <i>Tohum</i> .....	17
2.4. <i>P. lentiscus</i> L'nın Çoğaltılması.....	18
2.4.1. <i>P. lentiscus</i> L'nın Geleneksel Yollarla Çoğaltılması.....	18
2.4.2. <i>P. lentiscus</i> L'nın Biyoteknolojik Yöntemlerle Çoğaltılması.....	19

2.5.	Somaklonal Varyasyon Çalışmaları .....	22
2.5.1.	Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi .....	23
2.5.2.	Bazı Türlerde Somaklonal Varyasyon Çalışmaları .....	23
2.5.3.	<i>P. lentiscus</i> L. Bitkisine Ait Somaklonal Varyasyon Çalışmaları.....	24
<b>3.</b>	<b>MATERYAL ve METOT</b> .....	<b>25</b>
3.1.	Materyal.....	25
3.2.	Besi Ortamının Hazırlanması, Yüzey Sterilizasyonunda Kullanılan Kimyasallar ve Kullanılan Cihazlar.....	25
3.3.	METOT.....	30
3.3.1.	BBD'lerin ve Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu.....	30
3.3.2.	Diğer Malzemelerin Sterilizasyonu .....	30
3.3.3.	Tohumların Yüzey Sterilizasyonu İçin Uygun NaOCl Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	31
3.3.4.	Tohumların Yüzey Sterilizasyonu için %20'lik NaOCl'de Çalkalama Süresinin Belirlenmesi.....	31
3.3.5.	Stok Kültürlerin Eldesi.....	32
3.3.6.	Sürgün Proliferasyonu.....	32
3.3.6.1.	Sürgün Çoğaltımına Farklı Besi Ortamlarının Etkisi.....	32
3.3.6.2.	Sürgün Çoğaltımına MS Besi Ortamının Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi.....	33
3.3.6.3.	Sürgün Çoğaltımına Farklı Sitokinlerin Etkisi.....	33
3.3.6.4.	Sürgün Çoğaltımına BA'ın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi.....	33
3.3.6.5.	Sürgün Çoğaltımına Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	33
3.3.6.6.	Sürgün Çoğaltımına Farklı Sakkaroz Konsantrasyonlarının Etkisi.....	33
3.3.7.	Sürgün Köklendirilmesi.....	33
3.3.7.1.	Köklenmeye Farklı Oksin Tiplerinin Etkisi.....	33
3.3.7.2.	Köklenmeye Farklı IBA Konsantrasyonlarının Etkisi.....	34
3.3.8.	Adaptasyon.....	34
3.3.9.	Kültür Odası Koşulları.....	34
3.3.10.	İstatistiksel Analiz (Verilerin Değerlendirilmesi).....	34
3.4.	<i>P. lentiscus</i> L. Klonlarının Genetik Analizleri.....	35
3.4.1.	Genomik DNA (gDNA) İzolasyonu .....	35
3.4.2.	IRAP (İnter-Retrotransposon Ampified Polimorphism) Analizleri.....	36

3.4.3.	IRAP PZR Ürünlerinin Değerlendirilmesi, Benzerlik Oranlarının Hesaplanması ve Dendogramların Oluşturulması .....	37
<b>4.</b>	<b>BULGULAR VE TARTIŞMA</b> .....	<b>39</b>
4.1.	<i>In vitro</i> Kültürlerin Başlatılması, Tohumların Dekontaminasyonu ve Aksenik Klonal Hatların Üretimi.....	39
4.1.1.	Tohumların Yüzey Sterilizasyonu Üzerine NaOCl'nin Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi.....	39
4.1.2.	Tohumların Yüzey Sterilizasyonu Üzerine NaOCl'nin Uygulama Süresinin Etkisi.....	40
4.2.	Sürgünlerin Proliferasyonu.....	41
4.2.1.	Sürgün Çoğaltımına Besi Ortamı Tiplerinin Etkisi.....	42
4.2.2.	Sürgün Proliferasyonuna MS Besi Ortamı Kuvvetinin Belirlenmesi.....	44
4.2.3.	Sürgün Çoğaltımına Sitokin Tiplerinin Etkisi.....	47
4.2.4.	Sürgün Çoğaltımına BA Konsantrasyonlarının Etkisi.....	48
4.2.5.	Sürgün Çoğaltımına Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	50
4.2.6.	Sürgün Çoğaltımına Sakkaroz Konsantrasyonlarının Etkisi.....	51
4.3.	Sürgünlerin <i>in vitro</i> Köklendirilmesi.....	52
4.3.1.	Köklenmeye Farklı Oksin Tiplerinin Etkisi.....	53
4.3.2.	Köklenmeye Farklı IBA Konsantrasyonlarının Etkisi.....	54
4.4.	Köklenen Bitkiciklerin Adaptasyonunda Steril Kompostun Etkisi .....	58
4.5.	İzole Edilen gDNA Miktarlarının Belirlenmesi.....	59
4.6.	IRAP-PCR Analizleri.....	60
<b>5.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>67</b>
<b>6.</b>	<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>69</b>
<b>7.</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>79</b>



## ÖZET

SAKIZ AĞACI (*Pistacia lentiscus* L.)'NİN *İN VİTRO* KLONAL MİKROÇOĞALTILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatih Mehmet KILINÇ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2013

Sakız ağacının (*P. lentiscus* L.) klonlanmış dört genç genotipinin sürgün uçları kullanılarak bir mikroçoğaltma protokolü geliştirildi. Olgun tohumlardan aksenik explantların üretimi için etkili bir yüzey sterilizasyonu metodu geliştirildi. Olgun tohumların yüzey sterilizasyonu üzerine çalkalama süresi ve sodyum hipokloritin farklı konsantrasyonlarının etkisi ve aksenik sürgün uçlarından klonal sürgün çoğaltılması, köklenmesi ve köklenmiş fideliklerin *in vivo* koşullara alıştırılması gibi faktörler araştırıldı. Aşağıdaki yüzey sterilizasyonu, sürgün çoğaltılması, köklenme ve alıştırma parametreleri rapor edildi: enfekte olan ve enfekte olmayan tohum oranı, ortalama sürgün sayısı, ortalama sürgün uzunluğu, köklenme yüzdesi, adventif kök sayısı, kök uzunluğu ve 5 ve 8 hafta alıştırmadan sonra yaşayan renerant oranları. Anaç kontrol grubu ile birlikte 6., 9. ve 12. altkültürdeki bitkilerden alınan yapraklardan DNA'lar izole edildi ve Retrotranpozon Arası Çoğaltılmış Bölge Polimorfizmi (IRAP) primeri kullanılarak bir PCR aracılığıyla analiz edildi. Sakız tohumlarının çimlenmesi için %20'lik NaOCl ile 20 dakikalık çalkalama optimum kombinasyon olarak bulunmuş olup bu kombinasyonda tohumlar aşırı steril olmadan ve bozulmadan çimlenme oranı %88.30 gerçekleşti. Sakız ağacı sürgünlerinin çoğaltılması safhasında dört farklı besi ortamının etkilerine göre, MS besi ortamı eksplant başına en yüksek oranda (3.44) sürgün ile birlikte maksimum sürgün proliferasyonu (%100) ile en iyi sonuçları verdi. Kültüre alındıktan 28 gün sonra, en çok sürgün sayısı ( $3.60 \pm 0.13$ ) ve sağlıklı sürgün uzunluğu ( $16.80 \pm 0.20$ )  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA içeren  $\frac{1}{2}$  ve  $\frac{1}{4}$  kuvvetindeki MS besi ortamında kültürlenmiş Klon-II'de elde edilirken, en düşük oranda sürgün sayısı ise, Klon-I'de QL'li ve Klon-II'de WPM besi ortamında elde edildi. Çalışılan sitokinler arasında sürgün sayısı ve uzunluğu bakımından sürgünlerin morfojenezi BA destekli ortamda optimum olarak belirlenirken,  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA ve  $2iP$ 'li besi ortamında en uzun sürgünler elde edilmiştir. Klon-II'de sitokin tipine bağlı olmaksızın rizogenez gözlemlendi. Klon-II regenerantları ile test edilen farklı BA konsantrasyonları arasında  $2 \text{ mg l}^{-1}$  BA'lı ortamda en fazla sürgün ( $2.92 \pm 0.36$ ) gelişti. Özellikle Klon-II regenerantları %3'lük fruktozlu ortamda sakkaroz, laktoz ve glikozdan daha fazla ve daha uzun sürgün oluşturdu. Klon-II'de eksplant başına maksimum sürgün sayısı ( $3.62$ )  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA ve  $30 \text{ g/l}$  fruktoz içeren MS besi ortamında rapor edildi. Fakat sürgünlerin genel büyüme ve görünüşleri sakkarozlu besi ortamında fruktoz, glikoz ve laktozlu ortama göre daha iyi olduğu gözlemlendi. IBA'nın çalışılan en yüksek konsantrasyonunda güçlü köklenme teşvik edildi ve bu orandaki IBA'lı ortamda Klon-II'ye ait mikrosürgünler %94 oranında köklendi. Klon-II'de test edilen bütün kontrol grubu çalışmalarında olduğu gibi %25'i köklendi. Bu bağlamda Klon-II'nin diğer klon hatlarına göre daha iyi olduğu görüldü. Köklenen sürgünlerin aklimitezasyonu için tanımlanan bu protokol başarılıdır. Çünkü büyüme odasında yaşayan bitki oranı aklimitezasyondan iki ay sonra %95 olarak rapor edildi. Elde edilen verilere göre oluşturulan dendrogram incelendiğinde çekici varyasyonun Klon-II'de olduğu gözlemlendi. I., II. ve IV. klonlara ait ana bitki ve 6., 9. ve 12. altkültürlerde ise varyasyonun Klon-II'ye kıyasla daha düşük düzeyde olup, klonların genetik olarak nispeten biraraya toplandıkları belirlendi. Ana bitkiye genetik olarak en yakın klonların Klon I ve III'ün 6. alt kültürüne (I-6, III-6) ait olduğu tespit edildi. Ayrıca, Klon-I'de ana bitki ile en uzak altkültürün 12. altkültür (I-12) olduğu belirlendi. Tez kapsamında sakız ağacında ilk defa IRAP belirteci kullanılarak yapılan moleküler analizde %80 oranında benzerlik bulunmuştur. Ortalama 0.331 olan PIC değeri klon spesifik ve altkültür sayısı ilgili olsa da, klonlar arasında düşük seviyede de olsa polimorfizm gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca, bu çalışma IRAP'ın sakız ağacının farklı klonları arasında ve içinde bu tip polimorfizmin belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir. Geliştirilen protokol olgun ve seçkin sakız ağaçlarının *in vitro* klonlanması için iyi bir model olduğu düşünülmektedir. Ancak, klonlama için organogenezin

geliştirilmesi *in vitro* şartlarda seçkin ağaçlarda rejuvenasyon veya rejenerasyon protokollerinin geliştirilmesi gereklidir. Organogezis üzerine yapılacak olan daha ileri çalışmalar tamamlanmadan bu potansiyeli açığa çıkarmak mümkün olmayacaktır.

**Anahtar kelimler:** *P.lentiscus* L., Sakız ağacı, Mikroçoğaltım, *Klon*, IRAP

## ABSTRACT

*IN VITRO* CLONAL MICROPROPAGATION OF LENTISK (*Pistacia lentiscus* L.)

M.Sc. Thesis

Fatih Mehmet KILINÇ

DEPARTMENT OF BIOLOGY  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
UNIVERSITY OF DICLE

2013

A method was developed for micropropagation of lentisk, *Pistacia lentiscus* L., and using shoot tips from seedlings of four cloned genotypes. An effective surface sterilization method for the production of sterile explants from mature seeds of lentisk was achieved. The factors controlling the effect of immersion time, the effect of NaOCl concentrations on surface sterilization, the clonal shoot proliferation, rooting and acclimatization of plantlets derived from mature fruit explants were investigated. The following surface sterilization, multiplication, rooting and acclimatization parameters were monitored: Contaminated and decontaminated seeds, mean shoot number, mean shoot length, % of rooting, adventive root number, root length, % of viable regenerants after five and 8 weeks. DNAs from leaves of regenerated plants along with parental controls were isolated and analyzed through PCR using 5 Interretrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP) Primers. A 20% NaOCl x 20 min treatment was the optimum combination in NaOCl to sterilize lentisk seeds because there were 88.30% germination success and no oversterilized or malformed seeds. Analysis of the effect of all 4 medium types on multiplication phase of lentisk infers that MS gives the best results with the maximum shoot proliferation (100%) together with the highest number of shoots (3.44) per explant. After 28 days of explanting, the best response in terms of number ( $3.60 \pm 0.13$ ) and length of ( $16.80 \pm 0.20$ ) healthy shoots in Clone-II was obtained with 1/2x MS and 1/4x MS together with  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA, and the poorest responses with the QL medium in Clone-I, and the WPM with Clone-II. BA was found to be optimum for shoot morphogenesis in terms of the number and length of shoots among the cytokinins tested, while the highest shoot length was also yielded by BAP and 2iP each at  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$ . Regardless of cytokinins applied, Clone-II induced rhizogenesis to some extent. BA produced the greatest number of plantlets ( $2.92 \pm 0.36$ ) with optimal multiplication at approximately at  $2 \text{ mg l}^{-1}$  among the different concentrations tested with Clone-II. Shoot tips grown on 3% fructose medium produced more and longer shoots than those on sucrose, lactose or glucose again for Clone-II. The maximum number of shoots per explant (3.62) for Clone-II was recorded on MS medium containing  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA and 30 g/l fructose but the general appearance and growth habit of shoots were better on medium with sucrose than fructose, lactose and glucose. IBA induced strong rooting at the highest concentration ( $4 \text{ mg l}^{-1}$ ) and it produced the greatest percentages of rooting (94%) with Clone-II, and 25% of explants cultured also rooted in the control treatment. In this context, the result of Clone-II was superior to those of the rest of the clones tested. The method developed for plant acclimatization was satisfactory because a high percentage of plant survival (95%) in the growth room was obtained and the regenerated plantlets resumed growth after 2 months. It was observed that Clone-II has interesting variation when the dendograms were constructed. Index of genetic variation for Clones I, II and III was lower in the mother plants and the regenerants of 6, 9 and 12 times subcultured cultures. The six times subcultured regenerants of the clones I and 6 (I-6, III-6) was the most closest to the mother plants whereas the regenerants of the clone I was the furthest from the mother plant when they were subcultured 12 times. The correlation coefficient between similarity matrices based on IRAP was 80% and this was found by using the IRAP which is dominant, multiplex marker system that examine variation in retrotransposon insertion sites. Our study, the mean value of PIC, 0.331 indicates that tissue culture generates a low level of variation, which is related with incubation time and is clone specific. Moreover, IRAP can successfully be used to explore such polymorphism within and among different clones of lentisk. Reported results undoubtedly suggest that the cytokinins, auxins, media and carbohydrate type and concentration suitable for micropropagation of lentisks are genotype-dependent. The protocol developed holds also good model system for *in vitro* cloning of mature elite lentisk trees.

However, the exploitation of organogenesis for cloning requires developing protocols to regenerate and/or rejuvenate mature elite-trees under *in vitro* conditions. It will not be possible to realize the potential without further extensive research on organogenesis.

**Keywords:** *P.lentiscus* L., Mastic Tree, Clone, Micropropagation, IRAP

## ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1.	<i>Pistacia</i> Cinsinin Sınıflandırılması .....	6
Çizelge 2.2.	<i>P. lentiscus</i> L'nin Sistematikteki Yeri.....	6
Çizelge 2.3.	<i>P. lentiscus</i> L. 'nin erkek ve dişi yaprak morfolojileri .....	16
Çizelge 2.4.	<i>Pistacia</i> Cinsine Ait Türlerde Yapılan Önemli <i>in vitro</i> Mikroçoğaltım Çalışmaları.....	20
Çizelge 3.1.	Besi Ortamlarının Hazırlanmasında, Yüzey Sterilizasyonunda ve Somaklonal Varyasyon Belirlenmesinde Kullanılan Kimyasallar.....	26
Çizelge 3.2.	Çalışmalarda Kullanılan Besi Ortam İçerikleri.....	27
Çizelge 3.3.	Çalışmalarda Kullanılan Besi Ortamlarına İlave Edilen BBD'ler.....	28
Çizelge 3.4.	Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar.....	28
Çizelge 3.5.	gDNA İzolasyonu ve Miktar Tayininde Kullanılan Kimyasallar.....	29
Çizelge 3.5.	PZR Reaksiyonu İçin Kullanılan Kimyasallar.....	29
Çizelge 4.1.	<i>P. lentiscus</i> L. Tohumların Aksenik Çimlenmesi Üzerine Farklı NaOCl Konsantrasyonlarının Etkisi.....	39
Çizelge 4.2.	<i>P. lentiscus</i> L. Tohumların Aksenik Çimlenmesi Üzerine %20'lik NaOCl'in Farklı Uygulama Sürelerinin Etkisi.....	40
Çizelge 4.3.	Sürgün Çoğaltımına Besi Ortamı Tiplerinin Etkisi.....	42
Çizelge 4.4.	Sürgün Çoğaltımına MS Besi Ortamı Kuvvetinin Etkisi.....	45
Çizelge 4.5.	Sürgün Çoğaltımına Sitokin Tiplerinin Etkisi.....	47
Çizelge 4.6.	Sürgün Çoğaltımına BA Konsantrasyonlarının Etkisi.....	49
Çizelge 4.7.	Sürgün Çoğaltımına Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	51
Çizelge 4.8.	Sürgün Çoğaltımına Sakkaroz Konsantrasyonlarının Etkisi.....	52
Çizelge 4.9.	Köklenmeye Oksin Tiplerinin Etkisi.....	54
Çizelge 4.10.	Köklenmeye IBA Konsantrasyonlarının Etkisi.....	56
Çizelge 4.11.	Köklenen Bitkiciklerin Adaptasyonunda Steril Kompostun Etkisi.....	57
Çizelge 4.12.	<i>P. lentiscus</i> L. anaç ve klonlarına ait gDNA miktarları.....	59

<b>Çizelge 4.13.</b> <i>P. lentiscus</i> L. Klonlarının Genetik Kararlılığının Belirlenmesinde Kullanılan LTR Primer Dizileri ve Bu Primerlerden Elde Edilen Değerlendirilebilir Bant ve Polimorfik Bant Sayısı ve Yüzdesi.....	62
<b>Çizelge 4.14.</b> <i>P. lentiscus</i> L. Klonları Arasındaki IRAP Analizi İle Elde Edilen Benzerlik Matrisi.....	63

## ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1.	20 Yıllık Dişi <i>P. lentiscus</i> L.'nin Görünüşü, Resim: Çeşme Çiftlikköy Civarında Doğal Olarak Yetiştirilmiştir.....	6
Şekil 2.2.	Ülkemizde ve Ege Denizi'nde Bulunan Yunan Adalarında <i>P. lentiscus</i> L. Yetiştirdiği Tespit Edilen Bölgeler.....	8
Şekil 2.3.	A) Çeşme Yarımadasında İyi Sakız Verdiği Bilinen Ağaçlardan Toplanan Damla Sakızı ve B) Okside Olunca Sararan Damla Sakızı.....	10
Şekil 2.4.	Dişi (solda) ve Erkek (sağda) Sakız Ağacı Yapraklarının Genel Görünüşü:A) Alt Yaprak Ayası B) Üst Yaprak Ayasının Görünüşü.....	17
Şekil 3.1.	Sakız Ağacının Olgunlaşmamış Meyvelerinin ve Tohumlarının Görünüşü (A) Olgunlaşmamış Meyveler (B) Mezokarplı ve (C) Endokarplı Tohumlar...	25
Şekil 3.2.	1 mg <sup>l</sup> -1 BA, 100 mg <sup>l</sup> -1 Valin İçeren MS Besi Ortamında 4 Haftalık Kültür Süresi Sonucu Çoğaltılmış Klon-II'ye Ait Kültürlerin Görünüşü.....	32
Şekil 4.1.	<i>P. lentiscus</i> L. Tohumlarının Aksinik Çimlendirilmesi: (A) Kültüre Alındıktan Hemen Sonra, (B) 1 Hafta Sonra ve (C) Kültüre Alındıktan 4 Hafta Sonra Çimlenmiş Tohumlar.....	40
Şekil 4.2.	4 Haftalık Kültür Sonrası Çoğalmış Klon-II'ye Ait Sürgünler, A) MS Besi Ortamında ve B) QL Besi Ortamındaki Sürgünler.....	44
Şekil 4.3.	A) Kültüre Alındıktan 4 Hafta Sonra 1 mg <sup>l</sup> -1 BA İçeren MS Besi Ortamında Gelişen Klon-II'ye Ait Sürgünler B) Besi Ortamına Temas Eden Yaprakların Kararması.....	46
Şekil 4.4.	TDZ İlaveli <i>in vitro</i> Ortamda Gelişen Sürgünlerin Basal Kısımlarından Beyazımsı Kallus Gelişimi.....	48
Şekil 4.5.	<i>In vitro</i> Ortamda Kültüre Alındıktan 4 Hafta Sonra Gelişen Klonal Rejenerantlar. A) Klon-I, C) Klon-II B) Klon-III, ve D) Klon-IV'ü Göstermektedir.....	50
Şekil 4.6.	Farklı Oksinlerin Kök Gelişimine Etkisi: A) Klon-IV'e Ait 1 mg <sup>l</sup> -1 IAA'li ve B) Klon-IV'e Ait 1 mg <sup>l</sup> -1 NAA İçerikli <i>in vitro</i> Ortamda Kültüre Alındıktan 20 Gün Sonra Gelişen Kökün Görünüşü.....	55
Şekil 4.7.	Klon-II'ye ait 4 mg <sup>l</sup> -1 IBA destekli bes ortamında köklenmiş sürgünler.....	57
Şekil 4.8.	1:1 Oranında Torf : Kum Karışımı İçeren Saksılarda Alıştırılan Bitkiler A) Bir Büyüme Odasında 5 Haftalık Bir Süre Sonunda Gelişerek Yeni Sürgünler Oluşturdular ve B) 4 Ay Sonra Gelişen Fideler.....	59
Şekil 4.9.	LTR2 Primerleri İle Elde Edilen Bant Profilleri. M: 100 bp+1 kb Ladder DNA, A, B, C, D: <i>P. lentiscus</i> L. Anaç Klonlar; A6, B6, C6, D6 : A, B, C ve D Klonlarının 6 Ay Alt kültürlenmiş Bitkileri; A9, B9, C9, D9: 9 Ay Alt kültürlenmiş Klonlar; A12, B12, C12, D12: 12 Ay Alt kültürlenmiş Klonlar; Oklar Polimorfik Bantları Göstermektedir.....	60

- Şekil 4.10.** LTR3 Primerleri İle Elde Edilen Bant Profilleri. M: 100 bç + 1 kb Ladder DNA; A, B, C, D: *P. lentiscus* L. Anaç Klonlar Bitkiler; A6, B6, C6, D6 : A, B, C ve D Klonlarının 6 Ay Alt kültürlenmiş Bitkileri; A9, B9, C9, D9: 9 Ay Alt kültürlenmiş Klonlar; A12, B12, C12, D12: 12 Ay Alt kültürlenmiş Klonlar; Oklar Polimorfik Bantları Göstermektedir..... 61
- Şekil 4.11.** LTR5, LTR6 ve LTR10 Primerleri İle Elde Edilen Bant Profilleri. M: 100 bç + 1 kb Ladder DNA, A, B, C, D: *P. lentiscus* L. Anaç Klonlar; A6, B6, C6, D6 : A, B, C ve D Klonlarının 6 Ay Alt kültürlenmiş Bitkileri; A9, B9, C9, D9: 9 Ay Alt kültürlenmiş Klonlar; A12, B12, C12, D12: 12 Ay Alt kültürlenmiş Klonlar; Oklar Polimorfik Bantları Göstermektedir..... 61
- Şekil 4.12.** *P. lentiscus* L. Klonlarının, 5 IRAP Primeri İle Elde Edilen 109 Banttan UPGMA Analizi İle Oluşturulan Dendogram..... 64



## KISALTMA VE SİMGELER

AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
BA	: 6-Benzil Adenin
BBD	: Bitki Büyüme Düzenleyicileri
CaOCl	: Kalsiyum Hipoklorit
cm	: Santimetre
dNTP	: Deoksinükleotid Trifosfat
dH <sub>2</sub> O	: Distile Su
DKW	: Driver ve Kuniyuki
GA <sub>3</sub>	: Gibberellik Asit
gDNA	: Genomik Deoksiribonükleik Asit
g	: Gram
g l <sup>-1</sup> / g/l	: Gram / Litre
HCl	: Hidrojen Klorür
IAA	: Indol Asetik Asit
IBA	: Indol Bütirik Asit
ISSR	: Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizmi
Kin	: Kinetin
TDZ	: Thidiazuron
MAS	: Marker Assisted Selection
MS	: Murashige ve Skoog
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
mg l <sup>-1</sup> / mg/l	: Miligram/Litre
NAA	: Naftalen Asetik Asit
NaOCl	: Sodyum Hipoklorit
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	: Random Amplification of Polymorphic DNA
REMAP	: Retrotranspozon ve Mikrosatellit Çoğaltılmış Bölge Polimorfizmi
SA	: Sitrik Asit
SSR	: Simple Sequence Repeat Markers

SCAR	: Sequence-Characterized Amplified Regions
SH	: Schenk and Hildebrand Medium
IRAP	: Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism
RT-PCR	: Real Time Polymerase Chain Reaction
WPM	: Woody Plant Medium
QL	: Quoirin ve Lepoivre Medium
2-IP	: 2-İndol Propyonic Asit

## 1. GİRİŞ

*Anacardiaceae* familyasının bir üyesi olan *Pistacia lentiscus* L. (*P. lentiscus* L.) dioik ve herdem yeşil, odunsu, çalı formunda bir bitkidir. Daha çok Ege ve Akdeniz bölgelerinde hakim olan iklime uyumluluk göstermektedir. Türün ekonomik olarak değerli olmasını sağlayan sakız hammaddesi, dişi ağaçlara göre erkek ağaçlardan daha fazla elde edilmektedir. Elde edilen bu sakız reçinesi ilaç sanayi, gıda sanayi, kimya endüstrisi ve diğer birçok alanda kullanılmaktadır.

Sakız ağacı ülkemizde en çok batı Ege kıyılarında özellikle İzmir'in ilçelerinde (Çeşme, Alaçatı, Urla, Seferihisar, Foça ve Çiğli) yoğun olarak bulunmaktadır. Her ne kadar ülkemizde gerek ulusal basın ve yayın kuruluşları gerek lokal basın kuruluşları, sakız üretimi için yeni bahçe plantasyonları yapıldığına dair çok sayıda haberler yapmalarına rağmen, ülkemizdeki sakız ağaçlarının tamamına yakını yabani ırk formundadır ve seçkin klon ve çeşitler henüz tespit edilmemiştir. Ayrıca sakız ağacının biyolojik ve genetik özelliklerinden dolayı çalimsi formda olması bu ağaçların terbiyelenerek ağaçsı forma dönüştürülmesi gerekir. Bu bağlamda, bugün İzmir'in Çeşme ilçesinin sakız ağacı potansiyeli, Sakız Adası'ndan daha fazladır. Ancak, bu ilçelerde ağaçlar ya üretim yapılamayan ya da terbiye edilmeyen çalı formundaki ağaçlardır. Bu nedenle 2008 yılında, Falım sakızları (Cadbury) ve TEMA Vakfı İzmir Gülbahçe'de, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü araştırma sahasında "**Bozuk Sakız Ağacı Rehabilitasyonu Projesi**" ile sakız ağaçlarının aşılınması yoluyla, damla sakızı üretiminin gerçekleştirilmesi ve ülkemize ekonomik girdi sağlanması hedeflendi. Projede, sahada mevcut 17.867 adet bozuk sakız ağacının rehabilitasyonun ve aşılınmasının yapılması ve yaklaşık 6.000 adet aşılı sakız fidanı dikiminin gerçekleştirilmesi planlandı. Projenin son durumu hakkında TEMA Vakfı/İstanbul temsilciliği Orman ve Kırsal Kalkınma Bölüm Başkanı ve proje yürütücüsü Hikmet ÖZTÜRK ile görüşüldü ve, 80-90 yaşındaki sakız ağaçlardan alınan materyalleri (aşı kalemi) sakız ağaçlarına aşılacak suretiyle ve çelikle çoğaltımda % 0 başarı oranının elde edildiğini, Daha sonra sakız ağaçlarının tehlike altında olmasından ve seçkin klonları tespit için Urla'da 'Klon Park' Projesi oluşturduğunu bildirdi.

Klon Park projesi kapsamında; toplamda 52 klondan 340 adet rametin dikiminin gerçekleştirildiği, klonlar arası aşı başarısında ise farklılıklar görüldüğü, çalışma yapılan %10'luk klon sayısında ise, %50 ve üzerinde aşı başarısı sağlandığını rapor etti.

Sakız ağaçlarının doğal yaşam ortamlarında büyümesi sırasında ağaçsı formu alması için sürekli bir şekilde bakımı yapılması gerekir. Türün dioik oluşu, dişi bireyin tozlaşması sonucu oluşan tohumlarda genetik açılım söz konusu olmaktadır. Bununla birlikte, sakız bitkileri tohumla çoğaltılmakta ancak, tohumların alındığı ağaçta genetik açılım yaşandığından tohumun alındığı ağaç gibi ürün verimi elde edilememektedir. Bunun yanında çelikle çoğaltımda ise, köklenme sorunu ile karşılaşıldığından, bu yöntemle de yeni plantasyonlar için bitkilerin çoğaltımı çok yavaş olmaktadır. Çünkü çelikle çoğaltımla yapılan rapor edilmiş sonuçlara göre yılın çok kısa bir döneminde alınan çeliklerden elde edilen köklenme oranlarının çok düşük olması ve yılın çoğu döneminde hiç köklenme olmaması vegetatif yöntemle çoğaltılmada karşılaşılan en önemli sorunlardır. Bu sorunların aşılabilmesi için sakız ağacının vegetatif olarak çoğaltılmasında karşılaşılan sorunların aşılması için biyoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesi gereklidir.

*P. lentiscus*'un, hatta türün içinde bulunduğu *Pistacia* cinse ait diğer türlerin odunsu oluşu ve bazı sekonder kimyasallar ürettiyor olması *in vitro* olarak yapılan çalışmaların başlatılmasında zorluk çıkarmakta ve bu nedenle de literatürde *P. lentiscus* L. ile ilgili çok az sayıda çalışmaya rastlanmaktadır. Bunun yanı sıra *in vitro* çoğaltım aşamasında olası somaklonal varyasyonların belirlenmesi ile ilgili bir çalışmaya da rastlanılmadı.

Bu çalışmada iyi nitelikte sakız reçinesi veren sakız ağacından elde edilen tohumların *in vitro* ortamda çimlendirilmiş tohumlarından gelişen fidelerin sürgün uçları kullanılarak yaklaşık bir yıl 4 farklı klonal stok kültürler üretildi. 4 farklı klonal hat kullanılarak mikroçoğaltmanın tüm aşamalarının kültür besi ortamı içeriği optimize edildi. *İn vitro* çalışmalarda karşılaşılabilecek olası somaklonal varyasyonları belirlemek için 6., 9. ve 12. altkültürlerden alınan örneklerde polimorfizm oranları karşılaştırıldı.

### **1.1. Neden Klonal Mikroçoğaltım**

Klonlama bir anaç bitkiden birbirinin kopyası birçok bitki üretilmesidir. Sakız ağacı çalimsı formda bir bitkidir ve terbiyelenerek ağaç formuna dönüştürülmesi

gerekir. Oysa ağaç formunda gelişme gösteren bir sakız genotipinden klonlanan bitkiler verimli, tipik toprak tipine uygun, nematodlara ve kök patojenlerine karşı dirençli ve tuza tolerans gibi istenilen özellikler gösterebilir. Sakız ağacı yetiştiriciliği açısından klonlamanın anlamı her klonlanmış ağaç en iyi gelişen sakız ağacı gibi büyür ve fazla sakız üretir. Klonlanmış bitkilerin özellikleri istenilen verimi verecek özelliklerin en iyi kombinasyonunu gösterir. Böylece bir sakız bahçesinden en iyi ağacı seçerek bundan çoğaltılacak yeni bitkilerle bütün sakız bahçesini aynı duruma getirilmesi gibidir.



## ▪ 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Sakız Ağacının (*P. lentiscus* L.) Kökeni ve Sistematikteki Yeri

*Pistacia* genusu, *Sapindales/Rutales* takımı içerisinde yaklaşık 70 cins ve 600 üzerinde türden oluşan (Mitchell ve Mori, 1987) ve kozmopolit bir familya olan *Anacardiaceae* (Sumakgiller) bağlıdır. (Wannan ve Quinn, 1991; Stevens, 2008). Aromatik yaprak özelliğine sahip, birçok Akdeniz ikliminde yetişen sık çalılık formunda bir bitkidir (Chryssavgi ve ark., 2008). *Pistacia* cinsinin 11 türü bulunmaktadır (Zohary, 1952). *Pistacia* cinsinin kökeninin Orta Asya olduğuna inanılır (Parfitt ve Badenes, 1997; AL-Saghir, 2010). *Pistacia*'nın iki çeşitlilik merkezi tanımlanmıştır: Birincisi; Ortadoğu, Kuzey Afrika ve Güney Avrupa' nın Akdeniz bölgelerini kapsar. İkincisi ise, Batı ve Orta Asya' yı içerir (AL-Saghir, 2009; Kafkas ve ark., 2002). Cinsin türleri Kuzey Afrika' dan Filipinler ile Teksas'tan Nikaragua'ya kadar doğal olarak meydana gelir (AL-Saghir, 2012). *Pistacia lentiscus* L. (Şekil 2.1) için az sayıda sistematik çalışma yapılmıştır. Tournefort 1700'de *P. terebinthus* ve *P. vera*'yı *Terebinthus* cinsinin altında sınıflandırmasına rağmen, *P. lentiscus*'u *Lentiscus* adıyla farklı bir cins olarak düşünmüştür. *Species Plantarum*da Linnaeus 1753'de *Pistacia*'nın altı türünü tanımlamıştır: *P. lentiscus* L., *P. narbonensis*, *P. simaruba*, *P. terebinthus*, *P. trifolia* ve *P. vera*. *Pistacia narbonensis* ve *P. trifolia* *P. vera*'nın sinonimleridir. Zohary (1952)'de *Pistacia* cinsini morfolojik belirteçlere dayanarak yaptığı sınıflandırmada cinsi 4 bölüm ve toplam 11 türe ayırmıştır (Çizelge 2.1.) (Zohary, 1952; Parlak ve Akbin, 2008). Diğer bir çalışma ise, Parfitt ve Badenes (1997)'de *Pistacia* cinsini 2 bölüm ve 10 tür olarak sınıflandırmıştır (Çizelge 2.1.).

## 2.Kaynak Özetleri

**Çizelge 2.1.** *Pistacia* cinsinin sınıflandırılması (<sup>a</sup>Zohary, 1952; <sup>b</sup>Parfitt ve Badenes, 1997)

<sup>a</sup> Bölüm	<sup>a</sup> Türler	<sup>b</sup> Bölüm	<sup>b</sup> Türler
<i>Lentiscella</i>	<i>P. mexicana</i> <i>P. texana</i>	Lentiscus	<i>P. mexicana</i> <i>P. texana</i> <i>P. weinmannifolia</i> <i>P. lentiscus</i> L.
<i>Eu- Lentiscus</i>	<i>P. lentiscus</i> L. <i>P. weinmannifolia</i> <i>P. saportae</i>		
<i>Eu-Terebinthus</i>	<i>P. vera</i> L. <i>P. khinjuk</i> Stocks <i>P. terebinthus</i> L. <i>P. palaestine</i> Boiss <i>P. chinensis</i>	<i>Terebinthus</i>	<i>P. vera</i> L. <i>P. khinjuk</i> Stocks <i>P. terebinthus</i> L. <i>P. palaestine</i> Boiss <i>P. chinensis</i> <i>P. atlantica</i> Desf.
<i>Butmela</i>	<i>P. atlantica</i> Desf.		



**Şekil 2.1.** Çeşme Çiftlikköy civarında yetişen 20 yıllık dişi *P. lentiscus* L. ağacının görünüşü. Bar : 66 cm

Çalışmada materyal olarak kullanılacak olan *P. lentiscus* L'nin sistematikteki yeri aşağıda belirtildiği gibidir (Çizelge 2.2.).

**Çizelge 2.2.** *P. lentiscus* L. 'n m sistematikteki yeri

Bölüm	Spermatophyta
Altbölüm	Angiospermae
Sınıf	Magnoliopsida (Dicotyledoneae)
Alt Sınıf	Rosidae
Takım	Sapindales
Familya	Anacardiaceae
Cins	<i>Pistacia</i>
Tür	<i>Pistacia lentiscus</i>



Morfolojik sınıflandırmadan farklı olarak, *Pistacia* genusunun kloroplast DNA'sının RFLP tekniği kullanılarak yapılan moleküler analizleri, *P. lentiscus*, *P. weinmannifolia*, *P. mexicana* ve *P. texana*'yı içeren *Lentiscus* grubu ve geri kalan türlerin (*P. saportae* çalışmaya eklenmemiştir) yer aldığı *Terebinthus* grubu olmak üzere, 2 monofilogenetik grup ortaya çıkartmıştır (Parfitt ve Badenes, 1997). Daha sonraları Yunanistan'da ve Akdeniz'de bulunan *Pistacia* türlerinin RAPD ve AFLP teknikleri ile yapılan moleküler analizleri, kloroplast DNA'sı ile yapılan RFLP sonuçlarını desteklemiş ve *P. lentiscus*'u yine diğer *Pistacia* türlerinden ayrı bir gruba yerleştirmiştir (Katsiotis ve ark., 2003; Golan-Goldhirsh ve ark., 2004).

AL-Saghir M. G. ve Porter D. M. (2012), yaptıkları çalışmada bu cinsin taksonomisini detaylı bir şekilde revize etmişlerdir. Bu cinsin şu taksonları içerdiğini bildirmişlerdir; *Pistacia atlantica* Desf., *P. chinensis* Bunge subsp. *chinensis*, *P. chinensis* subsp. *falcata* (Bess. ex Martinelli) Rech. f., *P. chinensis* subsp. *integerrima* (J.L. Stew. Ex Brandis) Rech. f., *P. eurycarpa* Yalt., *P. khinjuk* Stocks, *P. lentiscus* L. subsp. *lentiscus*, *P. lentiscus* subsp. *emarginata* (Engl.) AL-Saghir, *P. mexicana* Humb., Bonpl., & Kunth, *P. X saportae* Burnat, *P. terebinthus* L., *P. vera* L., ve *P. weinmannifolia* Poiss. ex Franch. *Pistacia* cinsi *Pistacia* ve *lentiscella* olarak iki seksiyona ayrılmakta olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmalarında 14 taksona ait tür teşhis anahtarı tanımlamışlardır. *P. lentiscus* subsp. *emarginata* (Engl.) AL-Saghir kombinasyonu yapılmış ve *P. chinensis* subsp. *integerrima* (J.L. Stew. Ex Brandis) Rech. f., *P. terebinthus* L. ve *P. vera* L. türlerinin isimleri tektipleştirilmiştir.

## 2.2. *P. lentiscus* L'nın Dünya'da ve Ülkemizde Yayılışı ve Ekolojik İstekleri

Sakız ağacı Dünya'da Akdeniz ikliminin hâkim olduğu tüm kıyı kesimlerinde hatta belli bir yüksekliğe kadar iç kesimlerde doğal olarak yetişmektedir (Ak ve Parlakç1, 2009). Dünya üzerinde, Güneybatı ve Güneydoğu Avrupa, Batı Asya, Kuzey Afrika, Avrupa ve Kuzey Afrika'ya yakın birçok ada ve adacıklara 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 700 m yükseltilerde de yaşayan bu bitkiye İstanbul Burgaz Ada, İzmir, Ankara İncesu,

## 2.Kaynak Özetleri

Kayseri, Muğla, Marmaris, Kuşadası, Datça, Antalya Kemer, İçel, Tarsus, Ulaş, Seyhan ve Hatay yörelerinde rastlanmıştır (Şekil 2.2. Davis, 1967).



Şekil 2.2. Ülkemizde ve Ege Denizi'nde bulunan Yunan adalarında *P. lentiscus* L. yetiştiği tespit edilen bölgeler (Davis, 1967)

*P. lentiscus* L gibi aynı familyanın diğer önemli üyeleri; çitlenbik, (*P. atlantica*) melengiç (*P. terebinthus*) ve antepfıstığı (*P. vera*)'dır. Fakat sakız ağacı (*P. lentiscus*) özellikle Akdeniz ve Ortadoğu bölgesinde *Pistacia* genusunda bulunan diğer türlerden (*P. atlantica*, *P. palaestina*, *P. terebinthus* ve *P. khinjuk*) herdem yeşil olması ile kolaylıkla ayırt edilebilir. Ayrıca, *P. lentiscus* L. Ege ve Akdeniz bölgesinin doğal bitki örtüsüdür.

*P. lentiscus* L. herdem yeşil, kuraklığa dayanıklı, dioik, çalı formunda ve odunsu bir bitkidir (Şekil 2.1.). Bitkinin önemli özellikleri arasında kalkerli topraklarda da gelişim, herhangi bir yaralanmadan sonra kuvvetli olarak kök ve dip sürgünü verebilme yeteneği ve toprağı erozyona karşı koruma sayılabilir.

*P. lentiscus* L. bitkisinin gövdesinden elde edilen ürüne **reçine** veya **mastik sakızı** adı verilmektedir ve ticari değeri de oldukça yüksektir. Bu ürünün çok sayıda kullanım alanı vardır. Sakız ağacından elde edilen mastik sakızından aynı zamanda gıda ve ilaç sanayisinde hammadde olarak da yararlanılmaktadır. Ayrıca, bitkiden elde edilen bu reçine sakız üretiminde kullanılmakta ve bu da önemli bir ticari gelir oluşturmaktadır. Sakız üretimi için öncelikle sakız ağaççıklarının ağaç formuna

dönüştürülmesi ve sakız veren çeşitle aşılması gereklidir. Çalı görünümündeki bu ağaççıkların ağaç formuna gelmeleri uzun yıllar almaktadır. Bugün, ülkemizde özellikle Çeşme’de özellikle Çeşme’de Osmanlı imparatorluğu döneminden kalan sakız ağaçları, yok olma tehlikesi ile karşı karşıyadır. Çünkü bu bölgede öncelik olarak turizm sektörü (sıcak para akışından dolayı) tercih edilmiştir. Bu nedenle ülkemizde Osmanlı döneminde sakız reçinesi üretiminin yapıldığı sakızlıklar tamamen yok olmuştur. Bugün Dünya’da sadece Yunanistan’ın Sakız Adası’nda ticari damla sakızı üretimi gerçekleştirilmekte, üretilen sakız ya ham olarak ya da işlenerek değişik ürünlerde katkı maddesi olarak kullanılmak üzere ihraç edilerek milyonlarca gelir, ülke ekonomisine katkı sağlamaktadır. Bu yüksek gelir nedeniyle Sakız Adası’ndan her türlü bitkisel materyalin ada dışına çıkarılması kesinlikle yasaklanmıştır. Yetiştiricilik, üretim ve pazarlama etkinlikleri Sakız Adası’ndaki üreticiler birliğinin kontrolü altındadır. Avrupa Birliği’nin ilgili kurumları tarafından Sakız Adası’nın bir kısmı koruma altına alınmış ve sakız üretiminin devamlılığı ve artırılması için sınırsız maddi destek sağlanmaktadır.

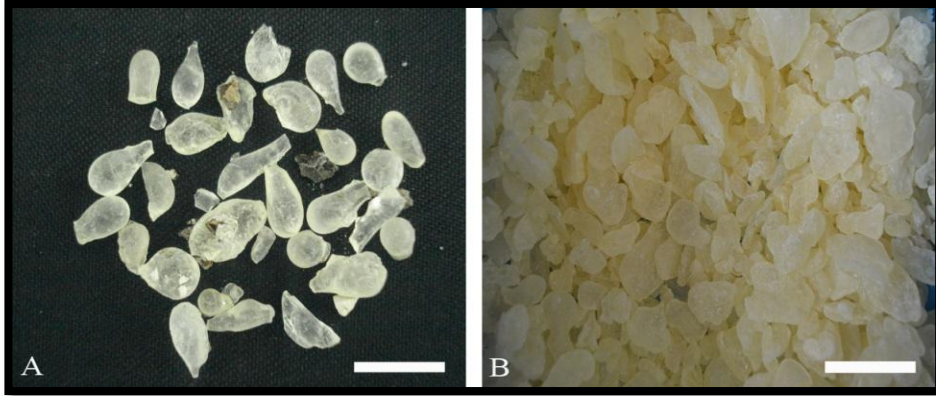
2009 verilerine göre Sakız Adası’ndaki toplam üretim 108.519,95 tondur (www.investingreece.gov.gr). Türkiye’nin yıllık damla sakızı ihtiyacı ise, yaklaşık 18 ton civarındadır. Bu ihtiyaç 2008 yılında 8 tonu ithal, 10 ton da kaçak olarak ülkemize aktarılması ile sağlanmıştır (Bilgin, 2009). Aslında İzmir’in Çeşme ve Alaçatı ilçelerindeki sakız ağacı potansiyeli, Sakız Adası’ndan daha fazladır. Ancak bu yörelerde bitkiler ya üretim yapılamayan ya da terbiye edilmemiş bozuk nitelikte çalı formunda ağaçlardır. Sakız ağacı uzun yıllar yaşayabilmektedir, gövdenin çizilmesi suretiyle, mastik sakızı elde edilmesi uzun yıllar sürmektedir.

Dişi ağaçlarda az sakız salgılanmaktadır, ancak elde edilen sakız erkek ağaçtan alınan sakız ile karşılaştırıldığında daha kalitesiz olduğu görülmektedir. Bu nedenle sakız eldesi, Sakız Adasında sadece *P. lentiscus* var. Chia’dan yapılmaktadır. Ağaçlar normal sakız verimine, 12-15 yaşlarında ulaşır ve bu dönemde ağaç başına ortalama 300 gr’a kadar sakız alınabilmektedir. Gövde ve kalın dalların kabuk kısımları haziran temmuz aylarında derin yaralanarak sakız salgısının akması sağlanır. *Pistacia* genusunda reçine kanalları floem dokusunda bulunmakta, çizim yapılan yerlerden 1-2 saat içinde sakız akmakta ve havayla temas edince katılaşmaktadır. Bu reçine suda çözünmemekte, ancak kloroform ve alkolde kısmen çözünmektedir (Acar, 1988; Perikos, 1993).

2009 verilerine göre *P. lentiscus* L. ilaç ve gıda sanayisi için önemli bir ham maddedir. Ayrıca sakız ağacı kuraklığa karşı dirençlidir ve yanma olaylarından sonra kendini çabuk yenilediğinden ekolojik bir değeri de bulunmaktadır (Mascarello, 2007). Milattan önceki yıllardan beri birçok ülkede sakız ağacı yapraklarından, reçine ve meyvelerinden ilaç ham maddesi olarak yararlanılmıştır. *P. lentiscus* L. günümüzde de ilaç ve gıda sanayisinin önemli bir ham maddesidir.

### 2.2.1. Damla Sakızının Kullanım Alanları

Damla sakızı, sakız ağacının gövdesinde açılmış yaralardan damlacıklar halinde sızan aromatik bir bileşiktir (Şekil 2.3.). 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* L. bitkileri ağaç formuna dönüştükten sonra salgıladığı reçineden yararlanılabilir. Meyveler sonbaharda olgunlaşır (Palli ve Aronne, 2000).



Şekil 2.3. A) Çeşme Yarımadası'nda iyi sakız verdiği bilinen ağaçlardan alınan kaliteli damla sakızı. Bar : 0.5 cm ve B) Okside olunca sararan damla sakızı. Bar : 0.6 cm

Bitki kendini korumak için bu reçineyi salgılar. Erkek bitkilerin sakız üretim potansiyeli dişilerden fazladır (Boztok, 1999). Trapezi veya masa denilen beyaz kil hasat zamanı yere düşen sakızı temiz ve şeffaf tutmak için ağacın altına serpilir. Ağaç altındaki alan düzgün bir süpürge ile süpürülür, tüm biriken mastik toplanır ve muhafaza edilir. İki önemli toplama zamanı vardır: Ağustos ve Eylül ayları. Hasat süresince yağmur yağarsa sakız bozulabilir, sakızı aşındırabilir veya sakız taze ise yağmur suyuyla karışıp siyaha dönüşür.

Damla sakızının **kalitesi**, rengine göre değişir. Daha temiz, şeffaf ve beyaz renkli sakız daha kalitelidir. Sakız okside olunca sararır (Şekil 2.3.B). 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 çok sayıda kullanım alanı vardır: Bu kullanım alanlarını genel olarak dört gruba ayırabiliriz:

### 2.2.1.1. İlaç Sanayisinde

Merhem yapımında, ülser hastalığının tedavisinde, diş macununda mastik sakızı kullanılmaktadır. Ülser tedavisinde mastik sakızının etkisine ilişkin olarak, iki hafta boyunca günde bir gram alınan mastik sakızının peptik ülseri tedavi edebildiği görülmüştür (Huwez ve ark., 1998). Ayrıca mastik sakızı deri hastalıklarında, yanıklarda, egzama (Palevitch ve Yaniv, 2000), kanser hastalığında (Loutrari ve ark., 2006) geniş ölçüde kullanılmaktadır. Mastik sakızının kolesterolü azalttığı ve yüksek kan basıncını düşürerek kalp krizi riskini düşürdüğü kanıtlanmıştır (Sanz ve ark., 1998). Ağız hijyenitesi için de antiseptik olarak diş macunlarında mastik sakızı kullanılmaktadır (Sherman, 2005). Yaprak ve meyvelerinde bulunan sekonder bileşikler (uçucu yağlar) nedeniyle milattan önceki yıllardan beri birçok hastalığın tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır. Bunların başında, kuduz hastalığı, uyuz ve yılan ısırıkları gelmektedir (Boztok, 1999). Sakız ağacının toprak üstü kısımları, idrar söktürücü özelliklerinden dolayı uyarıcı olarak kullanılmasının yanı sıra hipertansiyon, öksürük, boğaz ağrıları, ekzama, karın ağrısı, böbrek taşları ve sarılık tedavisinde kullanılmıştır (Bentley ve Trimen, 1980; Palevitch ve Yaniv, 2000). Yapraklardan ve ince dallardan elde edilen yağ bakteriye karşı vasat bir etkinlik gösterip ve mantara karşı tamamen etkisiz kalmasına rağmen reçinesinin uçucu yağı, mikroorganizmalara ve mantara karşı çok etkili olduğunu kanıtlamıştır (Magiatis ve ark., 1999). Gallik asit ve onun türevlerinin varlığı, meyvelerdeki 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose, K562 hücre sırasındaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' nun sebep olduğu ağız peroksidasyonuna karşı koruyucu bir rol oynadığı belirlenmiştir (Abdelwahed ve ark., 2007).

*P.lentiscus* L'nin fenolik bileşimlerinin özleri önemli derecede antimikrobiyal aktivite, özellikle de antifungal etki göstermiştir. Dahası, incelenen özler, *in vitro* ortamda süperoksit anyonlar için yüksek derecede azaltıcı ve işe yarar olanları toplayıcı

bir etkinlik göstermektedir. Güçlü bir antifungal aktivite ve zayıf bir antibakteriyel etkinlik gözlenmiştir. Ayrıca süperoksit anyonlarında yüksek derecede azaltıcı bir güç kapasitesi ve zayıf bir toplayıcı aktivite göstermişlerdir (Nabila Benhammou ve ark. 2008).

Sakız yağı, kaspaz-3 aktivitesinin yükselmesi ve damar endotelial büyüme etkisinin yayılması eşliğinde, insanlardaki lösemi K562 hücrelerinin çoğalmasını önemli ölçüde engellemiştir (Loutrari ve ark., 2006). *P. lentiscus* L. yağı alkalen fosfataz, aspartat transaminaz ve üre örneklerinde olduğu gibi cıva zehirlenmesine karşı korumada kısmen yardımcı olabilir, ve güvenilir doğal bir besin kaynağı olarak kabul edilebilir, en azından toplam kolesterol ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterolü normal değerlerinde tutarak bunu sağlayabilir (Tounes ve ark., 2008).

Damla sakızının iyileştirici özellikleri eski zamanlardan beri bilinmektedir (Moussaieff ve ark., 2005). Dioscorides Pedanius, '**De materia medica**' adlı makalesinde damla sakızının sindirme sürecini olumlu bir şekilde etkilediğini ve ek olarak kozmetik özelliklere ve diş için yararlı etkilere sahip olduğunu ifade etmiştir (Wellmann, 1907). Klinik araştırmalar ilk olarak damla sakızının gastrik ve duodenal ülserle karşı etkili olduğunu ortaya koydu (Al-Habbal ve ark., 1984; Al-Said ve ark., 1986). Damla sakızının *in vitro* ortamda *Helicobacter pylori* (Hp)'ye karşı bakteri öldürücü olduğu kanıtlandı (Huwez ve ark., 1998; Marone ve ark., 2001). Ancak, son araştırmalar damla sakızının insanlardaki Hp *in vivo* ortamda yok edemediğini göstermiştir (Bebb ve ark., 2003; Loughlin ve ark., 2003). Sakız ağacının damla sakızı *in vitro* ortamdaki HCT116 insan kolon kanseri hücrelerinin çoğalmasını engellediği ve bu hücrelerin ölümünü başlatan bileşimleri içerdiği bilinmektedir (Balan ve ark., 2007). *P. lentiscus* L'da geleneksel olarak özellikle göğüs, karaciğer, mide, dalak, rahim tümörleri üzerinde bir anti kanserojen madde ögesi olarak kabul edilmiştir (Assimopoulou ve Papageorgiou, 2005). Damla sakızı ilk kez görüldükleri beyaz kan hücreleri lenfositlerince ifade edilen gizli sinyalleme molekülleri olan sitokinlerin bir grubu olan IL-6'nın etkinlik endeksi ile plazma seviyelerini ve aktif Crohn hastalığı taşıyan hastalardaki C-reaktif proteini (CRP) önemli ölçüde azalttığı ortaya çıkmıştır (Kaliora et al., 2007). *P. lentiscus* L. kalp damar hastalıkları ile karaciğer hasarlarına karşı önleyicidir. *In vitro* ortamda insan LDL oksitlenmesini engeller (Andrikopoulos ve ark., 2003) ve içerdiği triterpenler sayesinde, antioksidan/antiatrojenik etki sağlamak

için periferik mononükleer kan hücrelerinde hareket eder (Dedoussis ve ark., 2004). Mastik yağının anti-bakteriyel (Lauk ve ark., 1996) ve antioksidan (Dedoussis ve ark., 2004) özellikte olduğu tespit edilmiştir.

#### **2.2.1.2. 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. Kıbrıs ve Suudi Arabistan'da temel bir baharat olarak kullanılmaktadır. Lübnan ve Suriye'de ev kadınlarının yapmış olduğu geleneksel peynire katılır. Yunanlıların festival ekmeklerinin temel içeriği mastiktir. Mastik sakızı ülkemizde pudinglerin ve dondurmaların ana bileşeni olup, bunların açık beyaz renkte olmasını sağlamaktadır (Sherman, 2005).

#### **2.2.1.3. 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 a ve b mastisinik asit, %0.5 mastikhonik asit, %20 a-mastikonik asit, %18 b-mastikonik asit, %30 a-mastik rezinesi ve %20 b-mastik rezinesi bulunmuştur (Sherman, 2005).

#### **2.2.1.4. 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 yenilebilir yağ üretilmekte ve bu yağ doymamış yağ asitleri olan oleik ve linoleik asit oranının zengin olması bakımından son zamanlarda dikkat çekmektedir (Ucciani ve ark., 1995).

### 2.3. Sakız Ağacının Morfolojik Özellikleri

#### 2.3.1. Kök Yapısı

*P. lentiscus* L., genç dönemde kazık kök ve birçok yan kök ile karakteristiktir. Olgun dönemde, yan kökler oldukça genişler ve saçaklar oluşturur (Mattia, 2005).

#### 2.3.2. Gövde Yapısı

Sakız ağacı, genellikle çalı veya ağaççık formunda gelişen, 1-3m'ye kadar boylanabilen hatta bazen 6m yüksekliğinde olabilen bir bitkidir. Doğal sakız ağacının gövdesi düz değildir. Gençken açık gri renkte ileri yaşlarında kül karası rengindedir. Çam ağaçlarında olduğu gibi gövdeden ayrılması zor olan "**riknides**" adıyla anılan çizgilerle kaplıdır ve pürüzlüdür (Anonymous, 2005).

#### 2.3.3. Çiçek Yapısı

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 salkım 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 ekseni üzerinde hemen hemen bir noktadan çıkar ve küçük bir demet halini altı hafta sonra gösterir (Palli ve Aronne, 2000).

#### 2.3.4. Meyve Yapısı

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, 2004; Browicz, 1987). Sakız Adasındaki kültür formlarının varyeteden ziyade, uzun yıllar verime göre selekte edilmiş bir çeşit olduğu belirtilmektedir.



### 2.3.5. 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 (Çizelge 2.3.). Yaprakları gövdeye bağlı dal üzerinde 2-12 adet dikdörtgen, mızraksı veya oval biçimindedir. Yaprakçıklar yumurtamsı, mızrak, eliptik, küt veya dikenimsi uçlu gibi forlar gösterir ve tüsüzdür. Yaprakçık uçları genelde keskin bir noktayla sonlanır (Davis, 1967). Budama yapılarak terbiye edilen bitkinin de yaprak şekli değişmektedir (Boztok, 2004). Sakız ağacı, cins içinde en kalın (etli) yaprakçıklara (490 µm) sahip olan türdür. *Pistacia* türlerinin tanımlayıcılarına göre bu cinse giren türlerde (*P. vera* L. hariç) yaprak genişliği 5.38 cm ve yaprak uzunluğu ise 5.13cm'dir (Anonymous, 1998). Yaprak boyutu ve şekilleri ile yaprakçık sayısı açısından geniş bir varyasyona sahip olan türün erkek ve dişi bireyleri de yaprak formu açısından değişiklik gösterir (Özel, 2006).

Çizelge 2.3. *P. lentiscus* L.'nin erkek ve dişi yaprak morfolojileri\*

<i>Pistacia lentiscus</i> L.	ERKEK	DIŞI
<b>Yaprakçık sayısı</b>	4-4-2-2-4-6-4-6 5-3-4-3-4-4-4-6	6-6-4-4-4 6-4-6-4-6-6
<b>Yaprak yapısı</b>	Genellikle paripinnat 1-3 Yaprakçıklı Nadiren imparipinnat (3 veya 5 yaprakçıklı) Yaprakçıklar eşit büyüklükte	Genellikle paripinnat 2-3 Yaprakçıklı(Nadiren 1 çift 3 yaprakçıklı) Yaprakçıklar eşit büyüklükte
<b>Yaprak ekseni</b>	Yaprak ekseni belirgin alt kısımda dar kanatlı, üst kısımda belirgin kanatlı 1-3 cm uzunlukta	Petiol kanatlı 2,5-4,5 cm
<b>Eksen</b>	Eksen çıkıntısız	Eksen çıkıntısız veya mukrolu
<b>Yaprakçıklar</b>	Sapsız ovat, Nadiren eliptik Damarlar pinnat	Sapsız dar eliptik damarlanma pinnat
<b>Yaprakçık uçları</b>	Kör uçlu Hafifçe girintili	Kamamsı kısa Mukronat

\*Yaprak morfolojisi Prof. Dr. Alaaddin S. ERTEKİN tarafından yapılmıştır.

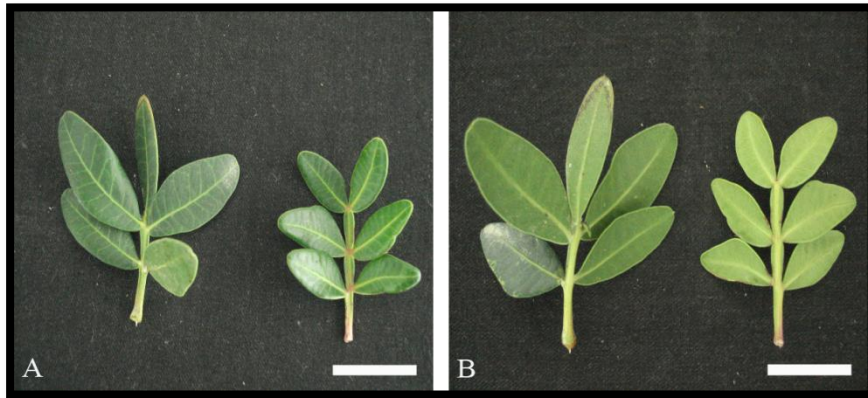
Yapraklar sıralı, kalın birleşik paripinnat (terminal yaprakçık bulunmaz) 2-3 çift koyu yeşil yaprak salkımından oluşur. Sakız ağacı, bulunduğu seksiyon içinde en kalın yaprakçılara (490 µm) sahip olan türdür (Anonymous, 1998).

### 2.3.5.1. Erkek Ağacın Yaprak Yapısı

Genellikle paripinnat, 1-3 çift yaprakçıklı, nadiren imparipinnat (3 veya 5 yaprakçıklı), yaprakçıklar eş büyüklükte, yaprak eksenini belirgin alt kısımda dar kanatlı, üst kısımda belirgin kanatlı, 1-3 cm uzunlukta, eksen çıkıntısız, yaprakçıklarda damarlar pinnat, sapsız oval, nadiren eliptik, yaprak uçları kör uçlu, hafifçe girintilidir (Şekil 2.4.). Erkek ağaçlar stres yokluğunda dişi ağaçlara göre daha yüksek fotosentetik kapasite sergilerken, kuraklık stresinde eşdeğer oranda fotosentetik kapasite ve düşük su kullanım etkinliği gösterirler (Nicotra ve ark., 2003).

### 2.3.5.2. Dişi Ağacın Yaprak Yapısı

Genellikle paripinnat 2-3 yaprakçıklı (nadiren 1 çift 3 yaprakçıklı), yaprakçıklar eşit büyüklükte. Eksen kanatlı, 2.5-4.5 cm, çıkıntısız veya mukroludur. Yaprakçıklar sapsız, dar eliptik ve damarlanma pinnattır. Yaprakçık uçları kamamsı, kısa ve mukronattır (Şekil 2.4.).



**Şekil 2.4.** Dişi (solda) ve erkek (sağda) sakız ağacı yapraklarının genel görünüşü: **A)** Üst yaprak ayası A-Sol Bar 3cm A-sağ resim; Bar 2.5cm **B)** Alt yaprak ayasının görünüşü B-sol resim Bar 2.5cm ve sağ resim Bar 3cm

### 2.3.6. Tohum

Kromozom sayısı  $2n=24$ 'tür (Zohary, 1952). Tohumlar olgunlaşma döneminde yuvarlak ve düz yüzeylidirler. Tohumlar ekim-kasım ayları arasında olgunlaşır (Prada

ve Arizpe, 2008). Sakız ağacının, çok sayıda çiçek ve meyve üretmesine karşın yaşayan tohum içeren meyve sayısı çok az olmaktadır. Çiçeklerin büyük kısmı meyve oluşturamamakta ve oluşan meyvelerin önemli bir kısmında ise tohum bulunmamaktadır (Martinez-Palie ve Aronne, 2000). Kırmızımsı veya beyaz meyvelerin toplanmasından kaçınılmalıdır (Şekil 3.1.). Çünkü bu meyvelerde embriyo ölü veya partenokarpiktir (Jordano, 1988). Bu nedenle, siyah meyvelerin içerdiği tohum oranı daha yüksek olduğu için hasat sırasında bunların tercih edilmesi gerekmektedir (Verdu ve Garcia –Fayos, 2002). Tohumların çimlenmesi epigeiktir. Buna karşın, tüm diğer *Pistacia* türlerinde çimlenme hipogeiktir. Ayrıca tohum içeren meyvelerin üretimi tek bir popülasyondaki bitkilerde bile değişiklik göstermektedir (Martinez-Palie ve Aronne, 2000; Verdu ve Garcia –Fayos, 2002).

### **2.4. *P. lentiscus* L'nin Çoğaltılması**

#### **2.4.1. *P. lentiscus* L'nin Geleneksel Yollarla Çoğaltılması**

*Pistacia* cinsine dahil tüm diğer türler gibi, sakız ağacında da tozlaşma rüzgarla olmaktadır (Whitehouse,1957). Bu nedenle dişi bitkilerde yabancı tozlanma mevcuttur. Dioik bir bitki olduğu için tohumdan gelişen her fidan genetik olarak değişkendir ve erkek ya da dişi olma olasılığı %50'dir (Onay, 1996). Tohumdan yetişen fidanlarda açılım söz konusu olduğundan verimli sakız üretimi için erkek veya dişi ağaçların mutlaka üstün nitelikli standart kültür çeşitleri ile aşılması gerekmektedir. 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 (Hartmann ve ark., 1990), bu bitkinin de bir yıllık sürgün çeliklerinin sera koşullarında ısıtılmalı köklendirme masalarında köklendirilmesi yoluyla hızlı ve ekonomik fidan üretimi ön plana çıkmaktadır.

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 (Browicz,1987; Acar, 1988). Ayrıca, yoğun plantasyon için damızlık bitki sayısı yetersiz olduğu için alınabilecek çelik sayısı da sınırlı olmaktadır. Sakız ağacının

çelikle üretilmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda, çeliklerde köklenmenin başarısız olduğu tespit edilmiştir (Hepcan, 1992). Ancak çeliklerin bir yıllık sürgünlerinde değişik oksinlerle muamele edildiğinde köklenmenin görüldüğü rapor edilmiştir (İsfendiyaroğlu, 1994).

*Pistacia* cinsine giren diğer türler gibi odun veya yarı odun çelikleri kullanılarak sakız ağacının çoğaltımı oldukça zordur (Joley and Opitz, 1971). Buna karşın, çelikle çoğaltım yöntemi uygulanacak ise çelikler genç bitkilerden alınmalıdır (İsfendiyaroğlu, 2000; Pignati ve Crobeddu, 2005; Viole ve ark., 2004). Çelik alma zamanı, çelikle çoğaltımda en önemli faktördür. Ocak ve şubat aylarının uygun dönem olduğu ve bu dönemde alınan çeliklerden %75'in üzerinde sonuç alındığı bildirilmiştir (İsfendiyaroğlu, 2000; Viola et al., 2004). Pignati ve Crobeddu (2005), çelikle çoğaltmada ocak ayının nisan ayından daha iyi olduğunu ve %80'nin üzerinde başarı sağlandığını bildirmişlerdir. Bunun için, köklendirilmenin sistem altında olması ve torf-perlit (1:1) karışımının kullanılması önerilmiştir.

Ayrıca, partenokarpi ve ovaryumun gelişmemesi gibi döllenme problemlerinden dolayı genotipler arasında tohumların çimlenme oranları da farklı olur (Mulas ve ark. 1998).

Yukarıda bahsedildiği gibi, geleneksel çoğaltımda tohumun kullanılması üretilen bitkiler açısından genetik açılımın yaşanması, bunun yanında vejetatif çoğaltımda ise çeliklerin köklenmesindeki sıkıntılardan dolayı biyoteknolojik yöntemlerle bu tip sorunlar aşılmaya çalışılmıştır.

Sakız ağacının vejetatif çoğaltım üzerine İsfendiyaroğlu (1994), yaptığı çalışmasında, bir yıllık sakız ağacı sürgünlerinden hazırladığı çeliklerde, farklı oranlarda oluşturduğu hormon kombinasyonları ile işlem yaptığında köklenme görmüş ve köklenmenin mevsimsel faktörlere bağlı kaldığı ve en yüksek köklenme oranının ise şubat ayında alınan çeliklerde olduğunu bildirmiş, diğer aylarda ise daha düşük oranda köklenme olduğunu rapor etmiştir. Ayrıca, araziye dikimde kullanılabilecek fazla sakız veren seçkin ağaç sayısı az olduğu için ana bitkiden alınabilecek çelik sayısının da sınırlı olduğunu bildirmiştir. Tohumdan ve çelikle üretime ek olarak, sakız ağacının gerek çöğür (anaç bitki) gerekse doğadaki yabani bireyler üzerine aşılansak, vejetatif yolla üretimi konusunda yapılan çalışmalarında bulunduğunu bildirmiştir.

### 2.4.2. *P. lentiscus* L'nın Biyoteknolojik Yöntemlerle Çoğaltılması

Biyoteknolojik yöntemler ile çoğaltımda bitki hücre ve doku kültürü yöntemleri kullanılmaktadır;

Bitki hücre, doku kültürü, genellikle aseptik şartlarda; karbon ve enerji kaynağı olan şeker, mineral tuzlar içeren ve agar ile katılaştırılmış steril büyüme ortamı içinde ya da üzerinde, bitki hücre, doku, ya da organlarından alınan eksplantların kültürünü içeren oldukça geniş bir alanı kapsamaktadır.

*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 (Çizelge 2.4.). Sakız ağacında ise Çizelge 2.4.'den 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 mikroelementlerinin (Lloyd ve McCown, 1980) kullanımının eksplantlarda oluşan kararmayı azalttığı, ancak sürgün proliferasyonunun MS (Murashige ve Skoog, 1962) besi ortamında daha iyi olduğu bildirilmiştir.

Sakız ağacının *in vitro* yöntemlerle çoğaltılması üzerine çok az sayıda çalışma rapor edilmiştir (Taşkın ve İnal, 2005; Fascella ve ark.2004; Ruffoni ve ark. 2004; Mascarello ve ark. 2007). Ayrıca, daha önce yapılan *in vitro* çalışmalarda sakız ağaçlarının mikroçoğaltılmasında başarılı olmayan sonuçlar rapor edilmiş (Taşkın ve İnal, 2005) ve bu konuda farklı eksplant çeşitlerinin ve bitki büyüme düzenleyicilerinin denendiği kapsamlı bir araştırma yapılmamıştır.

**Çizelge 2.4.** *Pistacia* cinsine ait türlerde yapılan önemli *in vitro* mikroçoğaltım çalışmaları

Tür	<i>In vitro</i> sistem	Sonuç	Kaynak
<i>P. vera</i>	Su ve Nt*	Çoklu sürgün oluşumu	Barghchi ve Alderson, 1983
<i>P. vera</i>	OT	Somatik fide üretimi	Onay, 1995
<i>P. vera</i>	OT	Somatik fide üretimi	Onay, 1996
<i>P. vera</i>	Su	Çoklu sürgün oluşumu	Onay, 2000
<i>P. vera</i>	Nt	Çoklu sürgün oluşumu	Ozden-Tokatlı ve ark., 2005
<i>P. khinjuk</i>	Su	Çoklu sürgün oluşumu	Barghchi, 1982
<i>P. khinjuk</i>	Su	Sürgün proliferasyonu	Tilkat ve ark., 2005
<i>P. mutica</i>	Su ve Nt	Sürgün büyümesi	Barghchi, 1982
<i>P. atlantica</i>	Su ve Nt	Sürgün büyümesi	Barghchi, 1982
<i>P. palaestina</i>	Su ve Nt	Sürgün büyümesi	Barghchi, 1982
<i>P. terebinthus</i>	Nt	Çoklu sürgün oluşumu	Pontikis, 1984
<i>P. terebinthus</i>	Nt	Sürgün proliferasyonu	Gannoun ve ark., 1995
<i>P. lentiscus L.</i>	Su	Sürgün proliferasyonu	Fascella ve ark., 2004 ( <i>kararma</i> )
<i>P. lentiscus L.</i>	Su	Kararma	Taşkın ve İnal, 2005
<i>P. lentiscus L.</i>	Su	Sürgün proliferasyonu	Yıldırım, 2012
<i>P. lentiscus L.</i>	Su	Kararma ve So	Mascarello ve ark., 2007
<i>P. lentiscus L.</i>	Su	Sürgün proliferasyonu	Kılınç ve ark. 2013

\* Su: Sürgün ucu; Nt: Nodal tomurcuk. So: Sürgün Oluşumu. OT: Olgulaşmamış Tohum

Son yıllarda yapılan çalışmada ise Yıldırım (2012)'nin yaptığı *P. lentiscus L.*'nin proliferasyon çalışmalarında en iyi sürgün sayısının 2.70 ortalamayla MS besi ortamında ve köklendirme çalışmalarındaysa en iyi köklenme yüzdesi, köklenme sayısı ve köklenme uzunluğu sonucunun  $1\text{mg}^{-1}$  IBA'nın verdiğini rapor etmiştir.

Fascelle ve ark. (2004), yüzey sterilizasyonu ve çoğaltım aşamasında değişik kombinasyonlardaki besiyeri içerikleri, bekletme sürelerini çalıştığı araştırmasında: aseptik bitki materyalleri % 70 etanol ve NaOCl (%1.2 aktif klor) çözeltisi uygulanarak elde etmiştir. Aynı çalışmada WPM besi ortamının, sürgün nekrozunu azalttığı ve çoğaltım safhasında MS besiyerindeki tuzların yüksek sürgün oluşumunu sağladığı görülmüştür.

Taşkın ve İnal (2005), *P. lentiscus* var Chia' nın yaşlı ve genç bireylerinden alınan apikal sürgün uçlarını farklı hormon derişimlerini içeren MS ve DKW (Driver ve Kuniyuki, 1984) besi ortamlarında kültüre aldıkları çalışmada, alınan materyallerden besi ortamına salınan yoğun fenolik bileşiklerden dolayı eksplantlarda organogenezis gözlenmemiştir.

Ozden-Tokatlı ve ark. (2005), tarafından antep fıstığı Kırmızı çeşidine ait tohumların *in vitro* çimlendirilmesiyle elde edilen bitkiciklerden alınan nodların, MS

besi ortamına ilave edilen BA, KİN, GA<sub>3</sub> ve AgNO<sub>3</sub>'nin gövde proliferasyonuna etkisi incelenmiştir. MS besi ortamına ilave edilen 9.0 µM BA, 0.2 µM GA<sub>3</sub> ve 24.0 yada 48.0 µM AgNO<sub>3</sub> maddelerle en yüksek proliferasyon oranı elde edilmiştir. Yine MS besi ortamına ilave edilen 12.0 µM IBA ile gövdelerin köklenmesi sağlanmış ve başarılı bir şekilde iklimlendirilmiştir.

Mascarello ve arkadaşları (2007), tarafından yapılan başka bir *in vitro* çalışmada ise, *Pistacia lentiscus*' a ait tohum ve genç bitki eksplantlarını kullanmışlar ve tohumların çimlenme oranını arttırmak için çimlenmeyi arttırıcı çeşitli uygulamalar denemişlerdir. Tohumların soğukta tutularak hidrojen klorür (HCl) ile aşındırılmasının ve giberellik asit (GA<sub>3</sub>) uygulamalarının tohumlarda çimlenme oranını arttırdığını rapor etmişlerdir. Akselik sürgünlerin *in vitro* çoğaltımında ise en iyi sürgün proliferasyonunu 0.5 mgL<sup>-1</sup> BA destekli MS besi ortamında sağladığı ve eksplant başına ortalama 3.5 sürgün oluştuğu bildirilmiştir. Gövdelerin köklendirilmesi için ise (NAA) ve (IBA) etkileri denenmiş ve 0.5 mgL<sup>-1</sup> NAA içeren besi ortamında çok sayıda uzun köklerin oluştuğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte, *P. lentiscus* var. Chia'dan alınan sürgün uçlarından kültür başlatma çalışmalarında, fenolik bileşiklerin etkisi ve oluşan enfeksiyondan dolayı *in vitro* çoğaltım için tam bir protokol geliştirilememiştir.

Yıldırım (2012), *P. lentiscus* L.'nin *in vitro* proliferasyon farklı besi ortamlarının MS, DKW, QL, WPM etkilerinin belirlendiği çalışmada en fazla sürgünün 2.70 ortalama MS besi ortamında, en iyi sürgün uzunluğunun ise, 10.6mm ile DKW destekli besi ortamında rapor edilmiştir. Yıldırım (2012), Yine aynı çalışmada en iyi besi ortamı olan MS'in konsantrasyonlarını çalışarak sürgün sayısında en iyi sonucun 1 katında ortalama 2.80 sürgün uzunluğundaysa 2 kat 12.2mm olduğunu rapor etmiştir. Yapılan çalışmanın devamında BA'nın konsantrasyonlarını çalışarak sürgün sayısı ve uzunluğunda optimum proliferasyon 0.5mgL<sup>-1</sup> olduğunu belirtmiştir. BA konsantrasyonunun 0.1 IBA ve 0.1 GA<sub>3</sub>'lü besi ortamında sürgün uzunluğu ve sürgün sayısında azalma olduğunu bildirerek IBA ve GA<sub>3</sub>'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* L.'nin köklenme çalışmalarında



oksin tiplerinden IBA, NAA, IAA ve  $1 \text{ mg l}^{-1}$  için en iyi sonucu köklenme yüzdesi köklenme sayısı ve köklenme uzunluğunu  $1 \text{ mg l}^{-1}$  IBA'nın verdiğini rapor etmiştir.

## 2.5. Somaklonal Varyasyon Çalışmaları

Somaklonal varyasyon, *in vitro* koşullarda rejenere olan bitkiler arasında ortaya çıkan, genetik (Evans, 1988) veya epigenetik (Li ve ark., 2008) kökenli değişikliklerdir. *In vivo* bitki büyüme ve gelişiminde somatik farklılaşma sürecinde genomda meydana gelen endopoliploidi, politeni ve DNA dizilerinde azalma/artışlar gibi büyük değişiklikler *in vitro* kültürlerin erken aşamalarında da görülebilir. *In vitro*'da rejenere olmuş somaklonlarda kromozom sayısı ve yapı değişiklikleri görülebilir (Hao ve Deng 2002; Mujib ve ark., 2007; Larkin ve Scowcroft 1981). Somaklonlarda regenerasyon sistemi, doku tipi, eksplant kaynağı, besi yeri bileşenleri, genotip ve kültürleme süresi ve altkültür sayısı gibi faktörler, çok çalışılan ancak mekanizması konusunda pek çok bilinmeyi içeren somaklonal varyasyonu etkileyen etmenler arasındadır (Pierick 1987; Skirvin ve ark., 1993, 1994). Ayrıca, transpozon elementlerinin aktivasyonu, gen sessizleşmesi ve tek-kopya dizilerde yüksek oranda görülen metilasyon da somaklonal varyasyonda önemli rol oynar (Hirochika 1993; Barret ve ark., 2006).

Bitki biyoteknolojisi yöntemleri kullanılarak, geleneksel çoğaltımda karşılaşılan birçok zorluğun örneğin mikro aşılama yöntemiyle köklenmesi zor olan badem çeşitlerinin köklenmesi başarı ile sağlanmıştır (Süzerer, 2013). Bu yöntemlerle karşılaşılan sorunların çözülmesi dışında çoğaltımı yapılan bitkiler, kültürün başlatıldığı elit ağacın aynısı olan klonların yetiştirilmesi amaçlanmaktadır. Ancak bu teknolojinin kullanımı sırasında, kullanılan kimyasallar, iş gücü, yöntem ve yapay ortam neticesinde içsel beklenmeyen ve kontrol edilemeyen varyasyonlar ortaya çıkabilmektedir (Kaya, 2011). Özellikle bu değişim başta ticari olarak çalışan laboratuvarlar olmak üzere istenmeyen bir durum olarak nitelendirilmektedir. Ancak bitki biyoteknolojisi yöntemlerinden herhangi birisinin kullanımı ile yapılan çalışmalarda bu tip bir olayın gerçekleşmesi olasıdır.

### 2.5.1. Somaklonal Varyasyonların Belirlenmesi

Mikroçoğaltılmış bitkilerde somaklonal varyasyon, morfolojik (İsraeli ve ark. 1991), sitolojik (Loureiro ve ark 2005), fizyolojik/biyokimyasal (Wang ve ark. 2007) ve

moleküler özellikler yönünden farklı bitki türlerinde tanımlanmıştır (Huang ve ark. 2009, Bairu ve ark. 2011). Somaklonal varyasyonların belirlenmesinde PCR tabanlı birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında en çok kullanılanlar ise RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA, Williams ve ark., 1990), ISSR (Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizmi, Zietkiewicz ve ark., 1994), AFLP (Çoğaltılmış Parçaların Uzunluk Polimorfizmi, Vos ve ark., 1995), REMAP (Retrotranspozon ve Mikrosatellit Çoğaltılmış Bölge Polimorfizmi, Kalender ve ark., 1999) ve IRAP (Retrotranspozon Arası Çoğaltılmış Bölge Polimorfizmi, Kalender ve ark., 1999)'dir.

Tez çalışması kapsamında, çoğaltılma protokolleri optimize edilen 4 klonun 6.-9. ve 12. alt kültürleri sonucunda olası varyasyonların belirlenmesi amacıyla IRAP tekniği kullanılmıştır.

### **2.5.2. Bazı Türlerde Somaklonal Varyasyon Çalışmaları**

*Pistacia* cinsine ait türlerin biyoteknolojik yöntemlerle çoğaltımı yapılan klonlar arasında, olası meydana gelen somaklonal varyasyonların irdelenmesi ile ilgili çalışmalara rastlanılmamıştır. Yalnız, aynı cinse ait *P. vera*'nın Atlı çeşidine ait uzun süreli saklama çalışmalarında sıvı azot öncesi ve sonrası olası somaklonal varyasyonun belirlenmesine ait bir çalışma rapor edilmiştir (Akdemir ve ark., 2013).

Süzerer (2013), badem bitkisinin en fazla tercih edilen üç çeşidi Nonpareil, Ferrastar ve Teksas çeşitlerinin *in vitro* mikroaşılama sonrası, 3., 6. ve 9. altkültürlerdeki regenerantların genetik kararlılıkları irdelenmiştir. Yapılan değerlendirmede kültürün başlatıldığı ana bitkiyle *in vitro* mikroaşılama sonrası çoğaltılan klonlar ile yapılan genetik kararlılık incelemesinde RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) belirteci kullanılmıştır. Bariz olarak *in vitro* mikroaşılama sonrası genetik benzerlik 6. altkültürde kendini daha çok göstermiştir.

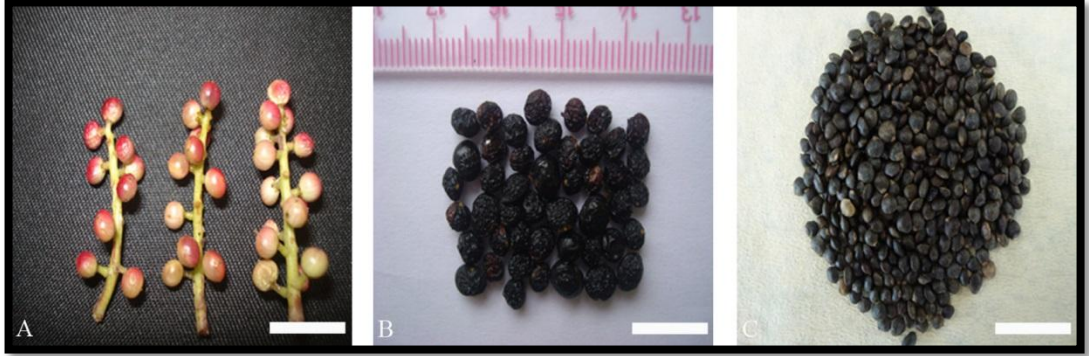
### **2.5.3. *P. lentiscus* L. Bitkisine Ait Somaklonal Varyasyon Çalışmaları**

*P. lentiscus* L. bitkisine ait klonal çoğaltım sonrası, olası somaklonal varyasyonlarının belirlenmesi ile ilgili çalışmalara rastlanmamıştır.

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. Materyal

Tez çalışmasında İzmir ili Çeşme ilçesinin Çiftlikköy mevkiinde bulunan ve fazla miktarda sakız reçinesi verdiği tespit edilen dişi ağaçlardan toplanan olgunlaşmamış (Şekil 3.1.A) ve olgunlaşmış (Şekil 3.1.B) tohumlar *in vitro* kültür başlatılmasında eksplant olarak kullanıldı. Tohumlar toplandıktan sonra mezokarp ve ekzokarpından arındırılıp (Şekil 3.1.C) gölge ve havadar bir ortamda kurutularak, kese kağıtları içerisinde *in vitro* çimlendirme çalışmalarına kadar +4°C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.1. Sakız ağacının : **A)** Olgunlaşmamış meyveleri. Bar : 0.8 cm, **B)** Olgunlaşmış meyveleri. Bar : 0.7 cm, **C)** Endokarplı tohumları. Bar : 0.5 cm

#### 3.2. Besi Ortamının Hazırlanması, Yüzey Sterilizasyonunda Kullanılan Kimyasallar ve Kullanılan Cihazlar

Besi ortamlarının hazırlanmasında ve yüzey sterilizasyonunda kullanılan kimyasallar (Çizelge 3.1.)'de verilmiştir. Çalışmalarda kullanılacak olan besi ortamları (Çizelge 3.2.), besi ortamlarına ilave dillecek olan bitki büyüme düzenleyicileri (Çizelge 3.3.) ve kullanılan cihazlar (Çizelge 3.4.)'te verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Besi ortamlarının hazırlanmasında yüzey sterilizasyonunda ve somaklonal varyasyon belirlenmesinde kullanılan kimyasallar

<b>Kimyasal Adı</b>	<b>Firma Adı</b>	<b>Katalog No</b>
<b>Etil alkol (%96)</b>	Pro-Lab	Ticari
<b>ACE</b>	Gamble Tüketim	Ticari
<b>Glisin</b>	Merck	K-27061401
<b>Nikotinik asit</b>	Sigma	N-0765
<b>Tiamin HCl</b>	Sigma	T-3902-25
<b>Piridoksin HCl</b>	Sigma	P-8666
<b>Myo-inositol</b>	Sigma	I-3011
<b>Agar</b>	Sigma	A-1296
<b>Sakkaroz</b>	Sigma	S-5391
<b>Laktoz</b>	Sigma	61345
<b>Glikoz</b>	Sigma	G-7520
<b>Fruktoz</b>	Sigma	F-1019
<b>IAA (Indolasetik asit)</b>	Sigma	İ2886
<b>IBA (Indolbütirik asit)</b>	Sigma	I-5386
<b>NAA (Naftalenasetik asit)</b>	Sigma	N-0640
<b>KIN (Kinetin)</b>	Sigma	K-0753
<b>TDZ (Tidiazuron)</b>	Sigma	P-6186
<b>BA (Benzil adenin)</b>	Sigma	B-3408-5
<b>(2-İP) 2-İzopentiladenin</b>	Sigma	D-7674
<b>Valine</b>	Sigma	V-0513
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (Amonyum nitrat)</b>	Sigma	A-3795
<b>KNO<sub>3</sub> (Potasyum nitrat)</b>	Sigma	P- 8291
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Potasyum fosfat)</b>	Sigma	P-8416
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Kalsiyum klorür)</b>	Sigma	C-2536
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Magnezyum sülfat)</b>	Sigma	M-7774
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Borik asit)</b>	Sigma	B-9645
<b>KI (Potasyum iyodür)</b>	Ridel-de Haen	03124
<b>MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O (Mangan sülfat)</b>	Sigma	M-7899
<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Çinko sülfat)</b>	Sigma	Z-1001
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (Molibdik asit)</b>	Sigma	M-1651
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (Bakır sülfat)</b>	Sigma	C-8027
<b>CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (Kobalt klorür)</b>	Sigma	C 2911
<b>FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Demir sülfat)</b>	Sigma	F-8263
<b>Na<sub>2</sub>EDTA (Sodyum etilendiamintetraasetik asit)</b>	Sigma	E-6635
<b>dH<sub>2</sub>O</b>		

Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan besi ortamı içerikleri

Kimyasallar	MS	WPM	DKW	QL
<b>Besi ortamları ana solüsyonu</b>				
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	1650 mg	400 mg	1400 mg	400 mg
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1900 mg	0mg	0mg	1800 mg
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	170 mg	168 mg	260 mg	272 mg
<b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	0mg	460 mg	1950 mg	1204 mg
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	370 mg	368 mg	740 mg	356 mg
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	440 mg	72 mg	150 mg	0mg
<b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0mg	988 mg	1560 mg	0mg
<b>Mikroelement-I</b>				
<b>MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O</b>	16.9 mg	16.9 mg	33 mg	16.9 mg
<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	8.6 mg	8.6 mg	16 mg	8.6 mg
<b>Na<sub>2</sub>MO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0.25 mg	0.25 mg	0.4 mg	0.25 mg
<b>KI</b>	0.83 mg	0.83 mg	0mg	0.83 mg
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub></b>	6.20 mg	6.20 mg	5 mg	6.20 mg
<b>Mikroelement-II</b>				
<b>CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	0.025 mg	0.025 mg	0mg	0.025 mg
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	0.025 mg	0.025 mg	0.25 mg	0.025 mg
<b>Komplex kelatör (Demir)</b>				
<b>FeSo<sub>4</sub></b>	28 mg	28 mg	0mg	56 mg
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	37 mg	37 mg	0mg	74 mg
<b>Vitaminler</b>				
<b>Glycine</b>	2 mg	2 mg	2 mg	2 mg
<b>Nicotinic Acid</b>	0.5 mg	0.5 mg	0.5 mg	0.5 mg
<b>Thiamin HCl</b>	0.1 mg	0.1 mg	0.1 mg	0.1 mg
<b>Pyridoxine HCl</b>	0.5 mg	0.5 mg	0.5 mg	0.5 mg
<b>Sakkaroz</b>	30 g	30 g	30 g	30 g
<b>Myo-İnositol</b>	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg
<b>Agar</b>	6.4 g	6.4 g	6.4 g	6.4 g
<b>pH</b>	5.8	5.8	5.8	6
<b>Tamamlanan Distile su</b>	1000ml'e	1000ml'e	1000ml'e	1000ml'e

**Çizelge 3.3.** Çalışmalarda kullanılan besi ortamlarına ilave edilen BBD'ler

İçerik	Miktar
<b>6-Benzyladenin (BA)</b>	100 mg
<b>1 N HCl</b>	2-3 ml
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	100 ml'e tamamlama
<b>(2-İP)</b>	100 mg
<b>1 N HCl</b>	2-3 ml
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	100 ml'e tamamlama
<b>Tidiazuron (TDZ)</b>	100 mg
<b>1 N HCl</b>	2-3 ml
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	100 ml'e tamamlama
<b>Kinetin (KIN)</b>	100 mg
<b>1 N HCl</b>	2-3 ml
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	100 ml'e tamamlama
<b>α-Naftalenasetik asit (NAA)</b>	100 mg
<b>1 N HCl</b>	2-3 ml
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	100 ml'e tamamlama
<b>3-İndolbutirik asit (IBA)</b>	100 mg
<b>1 N HCl</b>	2-3 ml
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	100 ml'e tamamlama

**Çizelge 3.4.** Çalışmalarda kullanılan cihazlar

Cihaz İsmi	Model	Firma	Ülke
<b>Buzdolabı (+4°C)</b>	BK 8450 T	Beko	Türkiye
<b>Derin Dondurucu (-20)</b>	GS51NAW30	İndesit	Türkiye
<b>Derin Dondurucu (-80 °C)</b>	Forma 8600	Thermo	ABD
<b>Hassas Terazı</b>	XT 320M	Precisa	Türkiye
<b>Çalkalayıcı</b>	0425966	J.P.Selecta	İspanya
<b>pH Metre</b>	211	Hanna	Almanya
<b>Manyetik Karıştırıcı</b>	Are	Velp	İspanya
<b>Etüv</b>	0462637	J.R.Selecta	İspanya
<b>Fırın</b>	6330N	Beko	Türkiye
<b>Saf Su Cihazı</b>	Arium 611	Sartorius	İspanya
<b>Laminar Akımlı Kabin</b>	MH-100	Telstar	İspanya
<b>Santrifüj</b>	D-78532	Hettich	Almanya
<b>Sıcak Su Banyosu</b>	MP	Julaba	Almanya
<b>Vortex</b>	Vortex Mixer	VWR	ABD
<b>Mikrodalga Fırın</b>	MW71E	Samsung	Malezya
<b>Liyofilizatör</b>	RC101	Jouan	Almanya
<b>Elektroforez Sistemi</b>	MS09092879	Cleaver	İngiltere
<b>Jel Dökümantasyon Sistemi</b>	Chemidoc XRS <sup>+</sup>	BioRad	ABD
<b>Nanodrop</b>	BioSpec-Nano	Shimadzu	Japonya
<b>Otoklav</b>	CL-40M	Alp	Japonya

Çizelge 3.5. gDNA izolasyonu ve miktar tayininde kullanılan kimyasallar

Kimyasal	Üretici Firma	Katalog Numarası
Sıvı Azot	Messer	PL-N2-089B
Etil alkol (%96)	Pro-Lab	
CTAB (SetilTrimetil Amonyum Bromid)	Merck	1.02342.0100
Tris-HCl	AppliChem	A3452.0250
Trisma Base	Sigma	T6066
NaCl	Sigma	S3014
EDTA	Calbiochem	324503
β-Merkaptoetanol	Applichem	A,11080,0100
PVP (Polivinil piroolidon)	Sigma	P-2307
Kloroform	Sigma	372978
Oktanöl	AppliChem	A3461.1000
RNaz A	Intron Biotechnology	27062
Proteinaz K	Intron Biotechnology	32181
Agaröz	Merck	1.16802.0250
Tris-HCl	AppliChem	A3452.0250
Asetik asit	Merck	1.00063.2511
EDTA	Calbiochem	324503
Etidyum bromür (EtBr)	Sigma	E-1510
Jel Yükleme boyası	Invitrogen	10813-015
λ DNA-Hind III	Fermentas	SM0103
Distile Su (dH <sub>2</sub> O)		

Çizelge 3.6. PCR reaksiyonu için kullanılan kimyasallar

Kimyasal	Üretici Firma	Katalog Numarası
Taq DNA polimeraz PZR kiti	Intron Biotech.	25022
dNTP	Intron Biotech.	25022
MgCl <sub>2</sub>	Intron Biotech.	25022
Agaröz	Merck	1.16802.0250
Tris-HCl	AppliChem	A3452.0250
Asetik asit	Merck	1.00063.2511
EDTA	Calbiochem	324503
Etidyum bromür	Sigma	E-1510
Jel Yükleme boyası	Invitrogen	10813-015
1 kb DNA belirteç	Invitrogen	10488-072
100 bp DNA belirteç	Invitrogen	10488-058
dH <sub>2</sub> O		

### 3.3. METOT

#### 3.3.1. BBD'lerin ve Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda kullanılan BBD'lerinin stok çözeltileri Çizelge 3.3.'e göre hazırlandı. Bununla birlikte, tez çalışması kapsamında kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin istenen miktarlarda stoklarının hazırlanması için hassas terazi yardımıyla belirlenen miktarda bitki büyüme düzenleyicisi tartıldı, önce az miktar çözücü (dH<sub>2</sub>O) ilave edilip, 1 Normal HCl çözeltisinden homojen olarak çözünmesi için damlatılıp, çözüldükten ve bitki büyüme düzenleyicileri stokları hazırlandıktan sonra küçük miktarlara bölünerek daha sonra kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edildi. Ancak bazı bitki büyüme düzenleyicilerinin (2-iP, TDZ ve KIN) ısıtma işlemi sırasında kimyasal yapıları bozulabileceğinden, besi ortamına otoklavlandıktan sonra ilave edildi. Besi ortamının pH'sı otoklavlanmadan önce 1N NaOH veya 1N HCl kullanılarak 5.70-5.80'e ayarlandı.

Çizelge 3.2.'de önerilen jelleştirici ilave edilen besi ortamı 121°C'de 1.2 atm basınç altında 15 dk steril edildikten sonra soğutularak sıcaklık yaklaşık 60°C iken laminar akımlı kabin içerisinde kültür kaplarına aktarıldı ve soğuyana kadar ağzı açık bir şekilde bırakıldı ve sonrasında ağzuları kapatılarak kullanılmak üzere kaldırıldı.

#### 3.3.2. Diğer Malzemelerin Sterilizasyonu

Tüm *in vitro* çalışmalar esnasında izlenen sterilizasyon yöntemleri aşağıda tanımlanmıştır.

Aşağıdaki maddelerde belirtilen materyaller iki katlı alüminyum folyo içine sarıldı ve otoklavda 121°C'de 20 dakika 1.2 atm basınç altında sterilize edildi.

1. Distile su içeren Erlenmayerler (kaplar) ve
2. Doku kültür kapları.

Bunların dışında doku kültüründe kullanılan diğer malzemeler; kültür işlemleri esnasında kullanılan pens ve bisturilerin muhafazası ve bitki parçalarının kesilmesi amacı ile iki ayrı ebatta kullanılan filtre kağıtları, iki kat ambalaj kağıtlarına sarılarak, etüvde 180°C'de iki saat süre ile sterilize edildi. Cam malzemeler (tüp, petri kutusu, erlen, mezür, balon joje, pipet, beher vs.) sadece sıcak su kullanılarak fırça yardımı ile



iyice temizlendi. Daha sonra üç defa saf sudan geçirilerek 180°C'de etüvde bir saat bekletilmek suretiyle kurutuldu. Daha sonra ambalaj kağıtları ile iki kat sarılıp etüvde 180°C'de iki saat süre ile sterilize edildi. Pens ve bisturiler, önce %96'luk etil alkol ile silinip 10'arlı gruplar halinde alüminyum folyolara sarılarak, 180°C'de 2 saat süre ile etüv'de sterilize edildi.

### **3.3.3. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu İçin Uygun NaOCl Konsantrasyonun Belirlenmesi**

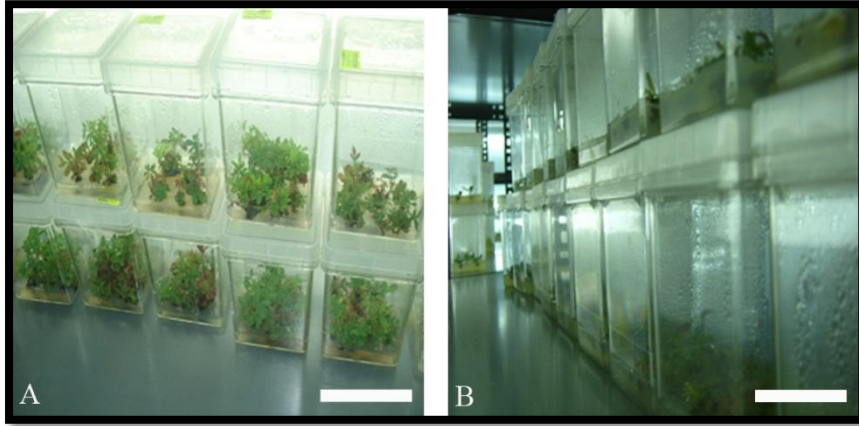
*P. lentiscus* olgun tohumlarının, yüzey sterilizasyonu için, Onay (1996), Tilkat (2006), Tilkat ve ark. (2008, 2009) tarafından antep fıstığı için kullanılan yüzey sterilizasyon metodu modifiye edilerek tohumların yüzey sterilizasyonu yapıldı. Sterilant olarak Sodyum hipoklorit (NaOCl) kullanıldı. Etl ekzokarp kısmından izole edilerek +4°C'de muhafaza edilen tohumların sert kabukları kırıcı alet yardımı ile uzaklaştırıldı ve laminar akımlı kabin içerisinde yüzey sterilizasyonu işlemine tabi tutuldu. Tohumların yüzey sterilizasyonu için, steril cam kaplar içerisinde hazırlanmış olan farklı NaOCl (%10, %20 ve %30) konsantrasyonları ile yüzey sterilizasyonları yapıldı. Tohumlar belirtilen konsantrasyonlarda 20'şer dakika boyunca 150 rpm'de çalışan bir çalkalayıcıda veya elle NaOCl çözeltisinde çalkalandı ve sonrasında yine steril erlenler içerisinde 5'er dakika arayla 3 defa steril distile su (dH<sub>2</sub>O) ile en az 5'er dakika yıkandı. Sonra steril filtre kağıdı üzerine alınarak sert tohum kabuğu filtre kağıdı üzerinde kurutuldu. Akselik tohumların çimlenmesi için optimize edilmiş (ayrıntı için bakınız Onay ve ark. 2011; KBAG 110T 941 Nolu projenin birinci ara raporu) besi ortamı kullanıldı. Tohumların yüzey sterilizasyonu için yapılan deneyler aşağıda verilmiştir. 4 haftalık kültür süresi sonunda kontaminasyon, çimlenme oranları ve morfolojik değişiklikler rapor edildi.

### **3.3.4. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu için %20'lik NaOCl'de Çalkalama Süresinin Belirlenmesi**

Bir önceki başlıkta denenen değişik NaOCl oranı için uygun görülen konsantrasyon, 10-20 ve 30dk olacak şekilde %20 NaOCl konsantrasyonu denendi. 4 haftalık kültür süresi sonunda kontaminasyon, çimlenme oranları ve morfolojik değişiklikler rapor edildi.

#### 3.3.5. Stok Kùltürlerin Eldesi

Kùltüre alındıktan dört hafta sonra çimlenerek iyi gelişim gösteren 4 tohuma ait sürgün uçları,  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA destekli MS besi ortamında kùltüre alındı ve her 4 haftada bir aynı kùltür besi ortamında altkùltüre alınarak (yaklaşık 10-12 defa altkùltür sonucu deneyler için yeterli stok üretilmiştir) 4 klonal hat için stok kùltürler çoğaltıldı. Klonlar 2 yıllık çalışma süresince alt kùltürlenerek muhafaza edildi.



Şekil 3.2.  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA ve  $100 \text{ mg l}^{-1}$  valin içeren MS besi ortamında 4 haftalık kùltür süresi sonucu çoğaltılmış Klon-II'ye ait kùltürlerin görünüşü. A) Bar : 7 cm. B) Bar : 4 cm

#### 3.3.6. Sürgün Proliferasyonu

Proliferasyon çalışmalarında aşağıdaki deneyler yapıldı ve her deneyde (4 haftalık kùltür süresi) her bir klon için morfolojik gelişimlerin yanı sıra çalışılan parametrelerde eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu rapor edildi.

##### 3.3.6.1. Sürgün Çoğaltımına Farklı Besi Ortamlarının Etkisi

4 farklı klona ait stok kùltürlerden, yaklaşık 1 cm uzunluğunda sürgün uçları  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA,  $50 \text{ mg l}^{-1}$  Valin içeren MS, QL, WPM ve DKW besi ortamlarında kùltüre alındı.

### **3.3.6.2. Sürgün Çoğaltımına MS Besi Ortamının Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi**

4 farklı klona ait stok kültürlerden, yaklaşık 1 cm uzunluğundaki sürgün uçları 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BA ve 50 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> valin içerikli MS'in 1/4x, 1/2x, 1x ve 2x kuvvetli besi ortamlarında kültüre alındı.

### **3.3.6.3. Sürgün Çoğaltımına Farklı Sitokininlerin Etkisi**

4 farklı klona ait stok kültürlerden, yaklaşık 1 cm uzunluğunda sürgün uçları, 50 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> Valin ve 4 farklı sitokininin (BA, 2iP, Kin ve TDZ) 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> konsantrasyonunu içeren MS besi ortamında kültüre alındılar.

### **3.3.6.4. Sürgün Çoğaltımına BA'nın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi**

4 farklı klona ait stok kültürlerden, yaklaşık 1 cm uzunluğunda sürgün uçları, BA'nın 4 farklı konsantrasyonu (0.5, 1, 2 ve 4 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>) ve 50 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> valin içeren MS besi ortamlarında kültüre alındılar.

### **3.3.6.5. Sürgün Çoğaltımına Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi**

4 farklı klona ait stok kültürlerden yaklaşık 1 cm uzunluğunda sürgün uçları, 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BA ve 50 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> Valin ve 4 farklı karbonhidrat tipinin (glikoz, sakkaroz, fruktoz ve laktoz) her birinden 30g<sup>l</sup><sup>-1</sup>, içeren MS besi ortamlarında kültüre alındılar.

### **3.3.6.6. Sürgün Çoğaltımına Farklı Sakkaroz Konsantrasyonlarının Etkisi**

4 farklı klona ait stok kültürlerden, yaklaşık 1 cm uzunluğunda sürgün uçları, 10, 20, 30, 40, 50 g<sup>l</sup><sup>-1</sup> fruktoz, 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BA ve 50 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> valin ilave edilerek MS besi ortamında kültüre alındı.

### **3.3.7. Sürgün Köklendirilmesi**

Köklendirme çalışmalarında aşağıdaki deneyler yapıldı ve her deneyde (4 haftalık kültür süresi) her bir klon için morfolojik gelişimlerin yanı sıra çalışılan parametrelerde eksplant başına kök sayısı ve kök uzunluğu rapor edildi.

#### 3.3.7.1. Köklenmeye Farklı Oksin Tiplerinin Etkisi

4 farklı klona ait stok kültürlerden, yaklaşık 2 cm uzunluğunda sürgün uçları, 1 mg l<sup>-1</sup> oksin (IAA, IBA, NAA) ve 50 mg l<sup>-1</sup> valin içeren MS besi ortamında kültüre alındı ve her bir sürgün için eksplant başına kök sayısı, köklenme oranı (%) ve kök uzunlukları rapor edildi.

#### 3.3.7.2. Köklenmeye Farklı IBA Konsantrasyonlarının Etkisi

4 farklı klona ait stok kültürlerden, yaklaşık 2 cm uzunluğunda sürgün uçları, IBA'nın farklı konsantrasyonları (0.5, 1, 2 ve 4 mg l<sup>-1</sup>) ve 50 mg l<sup>-1</sup> Valin içeren MS besi ortamında kültüre alındılar.

#### 3.3.8. Adaptasyon

Köklenmiş fidelerin köklerindeki ağarı uzaklaştırmak için önce çeşme suyunda iyice yıkandı. Daha önceden otoklavda steril edilmiş 1:1 oranındaki torf:kum karışımından oluşan kompost hazırlandı. Komposta transfer edilen fidelerin %90±5 **bağıl nemini** korumak için fidelerin üzerleri en az iki hafta boyunca Pyrex beher ya da naylon poşetlerle kapatılarak 3. günden sonra her gün 3dk'dan başlayarak kademeli bir şekilde havalandırıldı. Daha sonra fidelerin bağıl nemi derece derece yaklaşık %60±5'e düşürüldü. Bu bitkilere düzenli olarak 3 günde bir su verildi.

Fideler ayrı ayrı saksılar içinde büyüme odasında gece gündüz sıcaklığı 20°C'ye ayarlanan 16/24 saat fotoperiyot (20 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) altında gelişmeye devam ettiler. 5-6 haftalık adaptasyondan sonra, fideler tarlaya aktarılmaya hazır hale geldiler.

#### 3.3.9. Kültür Odası Koşulları

Kültürler 8000'lük ışık şiddetine kadar ayarlanabilir cıvalı Flüoresan lambalı (400 w, MBFR/U, Thorn) büyüme odasına transfer edildi ve ortam sıcaklığını 25±2°C de sabit tutan bir sıcaklık kontrol sistemi bulunmaktadır. Ayrıca fotoperiyot, bir zaman ayarlayıcısı ile 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak biçimde düzenlenmiş bir ortamda kültürlerin gelişmesi için gerekli koşullar sağlandı.

### 3.3.10. İstatistiksel Analiz (Verilerin Değerlendirilmesi)

Bütün çalışmalar tesadüf blokları deneme desenine göre yapılmıştır. Verilerin anlamlı olarak değerlendirilmesi için bütün çalışma sonuçlarının tanımlayıcı analizleri yapılmıştır (SPSS 2.0). Test edilen işlemler arasındaki önemli farklılıkları belirlemek için, faktöriyel veya nonfaktöriyel deneylerden alınan veriler ANOVA'ya tabi tutuldular. Belirlenen istatistiksel farklılıklar  $P = 0.05$  seviyesinde LSD testine tabi tutuldu.

Oransal veriler durumunda Ki kare ( $\chi^2$ ) 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

### 3.4. *P. lentiscus* L. Klonlarının Genetik Analizleri

#### 3.4.1. Genomik DNA (gDNA) İzolasyonu

Klon-I, Klon-II, Klon-III ve Klon-IV'ten 6., 9. ve 12. alt kültürler sonrası alınan yaprak örnekleri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildikten sonra gDNA izolasyonu CTAB (Lodhi ve ark., 1994) yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu amaçla, derin dondurucuda ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) muhafaza edilen yaprak örneklerinden (100 mg) tartılarak ve sıvı azotla ezilerek 1 ml CTAB ekstraksiyon çözeltisiyle karıştırıldı.

Karışım, 15 ml'lik falkon tüplere konularak üzerine, 10 mg PVP eklendi. Su banyosuna ( $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) alınan örnekler birkaç kez karıştırılarak 25 dakika süreyle inkübe edildi ve daha sonra oda sıcaklığına alınarak soğutuldu. Karışımın üstüne 6 ml kloroform/oktanol (24:1) eklenerek 20-25 defa hızla çalkalandı ve karışım  $4000\text{ rpm}$ 'de 25 dakika santrifüj edildi. Üst faz (az olması durumunda) ependorf tüpe aktarıldı. Elde edilen çözeltiliye 0.5 hacim 5M NaCl eklenerek iyice karıştırıldı. Çözeltiliye 1 hacim soğuk ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) %95'lik etanol eklendi ve  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de DNA iplikçikleri belirene kadar bekletildi. Daha sonra oda sıcaklığında sırasıyla  $13000\text{ rpm}$ 'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüjün ardından üst sıvı

dökülüp pelet soğuk %76'lık etanolle yıkandı. Tüpler 37°C'de etüvde etanol tamamen uzaklaşana kadar bekletildi. DNA steril distile suda (50 µl) çözüldü. Örneklere son derişimi 0.1 mg/ml olacak şekilde 10 mg/ml RNAaz çözeltisi eklendikten sonra 37°C'de 45 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından örneklere 1 mg/ml proteinaz K çözeltisi son derişimi 0.01mg/ml olacak şekilde eklendi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.

Karışımın üstüne eşit hacimde kloroform/oktanol eklenerek 20-25 defa, hızla çalkalandı ve karışım 4000 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi. Üst faz yeni bir eppendorf tüpe aktarıldı ve elde edilen çözeltiliye 0.5 hacim 5M NaCl eklenerek iyice karıştırıldı. Çözeltiye 1 hacim soğuk (-20°C) %95'lik etanol eklenip, 4°C'de DNA belirlenene kadar bekletildi. Daha sonra oda sıcaklığında sırasıyla 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edilip, üst sıvı döküldü ve pellet 4°C'ta soğutulan %76'lık etanolle yıkandı. Tüpler 37°C'ta etanol tamamen uzaklaşana kadar bekletildikten sonra DNA, steril distile suda çözüldü. İzolasyonu gerçekleştirilen gDNA'ların 260-280nm dalga boylarında spektrofotometrik (Nanodrop) ölçümleri yapıldı.

#### **3.4.2. IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) Analizleri**

Klonların 6., 9. ve 12. alt kültürlerinden elde edilen regenerantlar ile ana bitki arasındaki genetik kararlılık düzeylerinin belirlenmesi amacıyla IRAP analizleri gerçekleştirildi. Analizde 5 adet IRAP primeri (LTR-2, LTR-3, LTR-5, LTR-6, LTR-10) kullanıldı. gDNA'nın amplifikasyonu tüp başına, 1× PZR tampon [10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl], 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM dNTP karışımı (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP), 1 µM primer, 50 ng kalıp DNA ve 2U Taq DNA polimeraz içerecek şekilde toplamda 25 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirildi. Termal döngü cihazında (MJ Research INC PTC-200) gerçekleştirilen PZR analizi için optimize edilen program, ilk olarak kalıp DNA'nın 95°C'de 3 dk ön denaturasyonunu takiben, minimum 35 döngü olacak şekilde, 95°C'de 15sn, reaksiyonda kullanılan primerlere özgü bağlanma sıcaklığı olan 55°C'de 30sn, 72°C'de 3dk ve son final uzama basamağı için 72°C'de 10dk inkübasyon adımlarını içermektedir.

PZR ürünlerinin amplifiye olup olmadıklarının tespiti için; balon joje içerisinde 750mg agaroz, 75ml 1× TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tamponu ile karıştırıldı ve

mikrodalga fırında eritildi. Oda sıcaklığında soğuması beklenen agaroz jele, DNA'ların UV ışığı altında görülebilmesi için EtBr eklenip, karıştırıldı. Jel daha sonra jel kasting sistemine döküldü ve polimerleşmesi bekledi. Polimerleşmenin ardından jel, tarak ve kasting sisteminden alınarak tray üzerinde 1X TAE yüklü elektroforez tankına konuldu.

IRAP-PZR'a özgü rastgele primerlerle çoğaltılan çoğaltım ürünleri, toplamda 12 µl yükleme örneği olacak şekilde 11 µl IRAP-PZR ürünü ve 1 µl yükleme boyası eklenerek, agaroz jele yüklendi. Oluşan bantların büyüklüklerinin belirlenmesi için jele 100 bç (1.5 µl) ve 1 kb (1.5µl+9 µl dH<sub>2</sub>O) DNA Ladder da yüklendi. Jel, 80 V'da yaklaşık 150 dk süreyle devam eden elektroforez işleminin ardından jel dökümentasyon cihazında UV ışık altında dijital olarak görüntülendi ve çoğaltım ürünleri belirlendi.

### **3.4.3. IRAP PZR Ürünlerinin Değerlendirilmesi, Benzerlik Oranlarının Hesaplanması ve Dendogramların Oluşturulması**

Her bir klonun 6., 9. ve 12. alt kültürlerinden alınan regenerantlar ve anaç örnekleriyle IRAP primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR analizleri sonucunda elde edilen çoğaltım ürünleri "1" ve "0" değerleri verilerek var/yok şeklinde belirlendi ve MVSP 3.1 software (Kovach, 1999) kullanılarak istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Aynı zamanda ilgili program kullanılarak

Jaccard (1908) benzerlik oranları hesaplandı ve ana bitki-klonlar arasında dendogram oluşturuldu. Ayrıca, PIC (Polymorphism Information Content) değeri,  $PIC = 2P_i(1-P_i)$  formülü (Botstein ve ark., 1980; Bhat, 2000) kullanılarak hesaplandı.





## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. *In vitro* Kültürlerin Başlatılması, Tohumların Dekontaminasyonu ve Aksenik Klonal Hatların Üretimi

Bu kısımda tohumların aksenik olarak çimlendirilmesi ve sürgün uçlarından itibaren 4 klonal hat oluşturulması çalışmaları verildi.

#### 4.1.1. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu Üzerine NaOCl'nin Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Tohumlar aksenik materyalin çoğaltılması için %10, %20 ve %30'luk NaOCl'in konsantrasyonları 20 dk süre çalkalandı ve üç defa steril saf su ile yıkandı. Tohumlar hormon içermeyen MS besi ortamına çimlenmeye bırakıldı. Rapor edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi ve sonuçlar Çizelge 4.1.'de sunuldu.

**Çizelge 4.1.** *P. lentiscus* L. tohumların aksenik çimlenmesi üzerine farklı NaOCl konsantrasyonlarının etkisi\*

Uygulama	Enfekte Olan Tohum (%)	Çimlenen Tohum (%)
<i>Kontrol</i>	100	0.0
<i>% 10 NaOCl 20 dk</i>	70	38.3
<i>% 20 NaOCl 20 dk</i>	0.0	86
<i>% 30 NaOCl 20 dk</i>	0.0	64

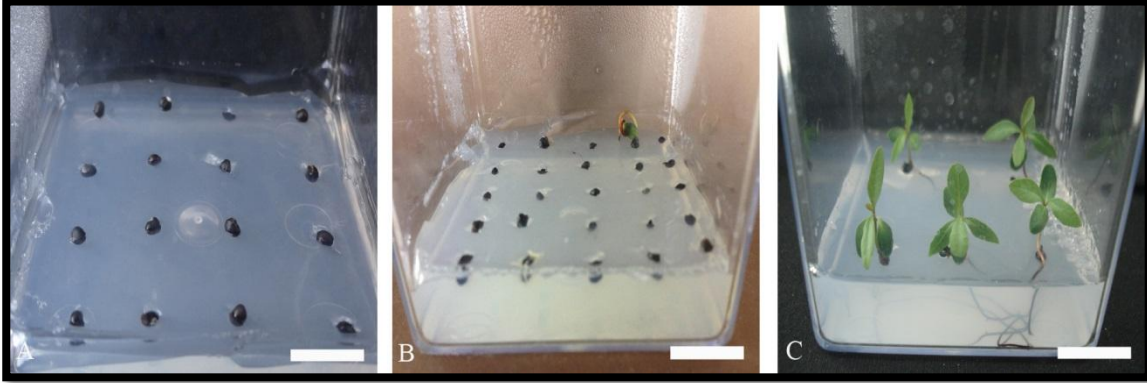
\*Rakamlar kültürün 21. gününde her bir uygulamada en az 50 tohum ortalamasıdır.

Çizelge 4.1.'de görüldüğü gibi kontrol grubundaki tohumların tamamı kontamine olurken, aynı uygulama zamanına göre artan NaOCl oranı tohumların kontaminasyonunu engellemiştir. %20 ve %30'luk 20 dakika NaOCl uygulamasında hiç kontaminasyon görülmedi ve çimlenme yüzdeleri sırasıyla, %86 ve %64 olarak gözlemlendi. Ancak, %30'luk NaOCl konsantrasyonunda tohumlarda kontaminasyon gözlenmezken, tohumların çimlenme yüzdesi %20 NaOCl işlemine göre %22 oranında azaldı.

Sonuçlar morfolojik olarak değerlendirildiğinde, tohumlarda radikula farklılaşması kültüre alındıktan 48 saat sonra gözle görülebilir hale geldiler, koleoptil uzaması çimlenme sürecindeki tohumlarda genelde 5. günden sonra belirginleşmeye başladı (Şekil 4.1.B). Çimlenen tohumlardaki kök farklılaşması ve gelişimi, sürgün uzaması ve gelişiminden daha hızlı olduğu gözlemlendi. Tohumlardaki sürgün gelişimi genellikle kültürün ilk haftası içinde görülmeye başladı. Gövdelerdeki ikincil yaprak

#### 4. Bulgular ve Tartışma

oluşumu ise, kültürün ikinci haftasında görüldü. Genel olarak çimlenen tohumlardan gelişen fideciklerin uzunluğu kültüre alındıktan 4 hafta sonra 1-3 cm arasında ölçüldü (Şekil 4.1.C).



**Şekil 4.1.** *P. lentiscus* L. tohumlarının aksenik çimlendirilmesi: **A)** Kültüre alındıktan hemen sonra. Bar : 1 cm, **B)** 1 hafta sonra. Bar : 1.6 cm ve **C)** kültüre alındıktan 4 hafta sonra çimlenmiş tohumlar. Bar : 1.6 cm

#### 4.1.2 Tohumların Yüzeysel Sterilizasyonu Üzerine NaOCl'nin Uygulama Süresinin Etkisi

Bir önceki deneyde en iyi çimlenme yüzdesinin elde edildiği %20'lik NaOCl konsantrasyonunda, rapor edilen çimlenme yüzdesini artırmak amacıyla tohumlarda %20'lik NaOCl'de farklı çalkalama süreleri çalışıldı (Çizelge 4.2.). Çizelge 4.2.'de de görüldüğü gibi NaOCl'in 20dk ve 30dk uygulamalarında kontaminasyon görülmezken, sırasıyla %88.30 ve 69.09 çimlenme oranları elde edildi.

**Çizelge 4.2.** *P. lentiscus* L. tohumların aksenik çimlenmesi üzerine %20'lik NaOCl'in farklı uygulama sürelerinin etkisi\*

Uygulama	Enfekte Olan Tohum (%)	Çimlenen Tohum(%)
Kontrol(Steril saf su)	100	0.0
10 dk x % 20 NaOCl	5.76	71.15
20 dk x % 20 NaOCl	0.00	88.30
30 dk x % 20 NaOCl	0.00	69.09

\* Rakamlar kültürün 21. gününde her bir uygulamada en az 50 tohum ortalamasıdır

Çizelge 4.2. incelendiğinde, kontrol grubundaki tohumların hepsi kontamine olurken, artan uygulama sürelerinde (20 ve 30 dakika) kontaminasyon görülmedi. Çimlenme yüzdesi irdelendiğinde, %20 NaOCl'lik 20 dakika uygulamasında diğer denemelere göre daha fazla çimlenme gözlemlendi (%88.30), bu bir önceki denemeye benzer sonuçlar gösterdi. Çizelge 4.2.'ye göre, %20'lik NaOCl konsantrasyonunda 30 dakika uygulama süresinde 20 dakika uygulama süresine göre çimlenme oranında yaklaşık %20 seviyesinde düşüş gözlemlendi.

Yüzey sterilizasyonu denemelerinde elde edilen sonuçlar (Çizelge 4.1. ve 4.2.) genel olarak değerlendirildiğinde, en uygun yüzey sterilizasyonu metodu olarak; 20 dakika %20'lik NaOCl konsantrasyonunun aksenik materyal eldesi için yeterli olduğu görüldü.

Belirlenen yüzey sterilizasyonu metodu ile *in vitro* ortamda çimlendirilen tohumlardan en iyi gelişme gösterenlerden 4 adet fide seçildi. Seçilen bu aksenik fideciklerin sürgün uçları 10-12 ay boyunca (yaklaşık 12 defa) altkültürlenerek stok klonal hatlar oluşturuldu.

Odunsu bitkilerde tohum çimlenme oranının düşük olması, mikroplardan arındırılmış aksenik eksplantlar elde edilmesi veya doğal olarak büyüyen ağaçlardan yada genç fidelerden bulaşıksız aksenik eksplantların eldesi ve aksenik sürgünlerin bazal kısmında fenoliklerin salınması *in vitro* doku kültürü başlatılmasında karşılaşılan önemli sorunlardır. Benzer zorluklar genç sakız ağacı sürgünlerinden aksenik sürgünlerin başlatılması (Fascella ve ark., 2004; Mascarello ve ark., 2007; Ruffoni ve ark., 2004) ve *in vitro* tohum çimlenmesinde (Grundwag, 1976; Mascarello ve ark., 2007; Mulas ve ark., 1998) daha önce rapor edildi. Son zamanlarda rapor edilen bir çalışmada Yıldırım (2012)'nin sakız ağacı tohumlarının %66 oranında aksenik olarak çimlendiği belirtildi. Bizim çalışmamızda ise, (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2), %20 NaOCl konsantrasyonunda 20 dk'lık çalkalamanın tohumların yüzey sterilizasyonu için yeterli olduğu ve bu işlemle tohumların %86'sının aksenik olarak çimlendiği rapor edildi.

Yıldırım (2012) hariç daha önce yapılan bütün çalışmalarda sakız ağacı tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesinde başarılı bir protokol rapor edilmedi. Bizim çalışmamızda ise, Yıldırım (2012)'nin yaptığı çalışmalar tekrarlanarak klonal materyal üretimi için bir *in vitro* yüzey sterilizasyonu protokolü rapor edildi.

#### **4.2. Sürgünlerin Proliferasyonu**

Bu alt bölümde, sürgünlerin *in vitro* proliferasyonu için besi ortamı tipi ve konsantrasyonu, şeker tipi ve konsantrasyonu, sitokinin tipi ve konsantrasyonu çalışmalarının sonuçları sunuldu. Sürgün proliferasyonu çalışmalarında aksi bilgi verilmedikçe yaklaşık 1 cm uzunluğundaki sürgünler kullanıldı.

#### 4.2.1. Sürgün Çoğaltımına Besi Ortamı Tiplerinin Etkisi

Klonlar yeterli eksplant uzunluğu ve sayısına ulaşana kadar 10-12 defa altkültürlendi. Klonların sürgün çoğaltımına besi ortamı tipinin etkisini belirlemek için apikal sürgünler kültüre alındılar. Elde edilen sonuçlar istatistiksel uygulamalara tabi tutuldu ve sonuçlar Çizelge 4.3.'de verildi.

Çizelge 4.3. Sürgün çoğaltımına besi ortamı tiplerinin etkisi\*

Klon No	Besi Ortamı Tipi mgl <sup>-1</sup>	Ortalama Sürgün Sayısı** ± SH	Ortalama Sürgün Uzunluğu** ± SH (mm)
Klon I	MS	2.25 ± 0.23 b	12.22 ± 0.79 b
	QL	1.25 ± 0.11 c	12.09 ± 0.81 b
	WPM	1.50 ± 0.16 c	12.12 ± 0.90 b
	DKW	1.06 ± 0.06 d	12.37 ± 0.71 b
Klon II	MS	3.44 ± 0.26 a	13.13 ± 0.39 b
	QL	1.06 ± 0.06 d	12.56 ± 0.83 b
	WPM	1.13 ± 0.09 d	12.75 ± 0.55 b
	DKW	1.19 ± 0.10 cd	14.81 ± 0.99 a
Klon III	MS	2.37 ± 0.20 b	11.26 ± 0.35 cd
	QL	1.56 ± 0.20 c	11.78 ± 0.81 bc
	WPM	1.38 ± 0.18 c	11.43 ± 0.65 bc
	DKW	1.56 ± 0.16 c	11.93 ± 0.58 bc
Klon IV	MS	2.75 ± 0.23 b	10.82 ± 0.37 d
	QL	1.25 ± 0.14 c	11.25 ± 0.56 bc
	WPM	1.19 ± 0.10 c	10.63 ± 0.58 d
	DKW	1.31 ± 0.20 c	11.28 ± 0.38 cd

\*Rakamlar kültürün 28. gününde her bir klon için toplam 64 eksplantın ortalamasıdır.

\*\*Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların ANOVA'yı takip eden LSD testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olmadığını gösterir. SH: Standart Hata

Her bir klon için denenen farklı besi ortamlarında sürgün proliferasyonu bakımından en iyi sonuç MS besi ortamında elde edilmiş olup, gövde başına düşen eksplant sayısı, 2.25 ile 3.44 aralığında olduğu görülmektedir. Gövde başına düşen en fazla eksplant sayısı Klon-II'ye ait sürgünlerde 3.44 olarak rapor edildi. Diğer besi ortamlarının gövde başına eksplant sayıları irdelendiğinde DKW, QL ve WPM besi ortamlarındaki klonların değişik sonuçlar verdiği görüldü. Elde edilen sonuçlar arasında ortalama gövde uzunlukları irdelendiğinde, en uzun gövdeler MS besi ortamı yerine DKW besi ortamında elde edildi. Klonlar açısından ortalama gövde uzunluğu değerlendirildiğinde, Klon-II'de daha uzun gövdeler elde edildi. Bunlar arasında en uzun sürgün DKW besi ortamında ortalama 14.81 mm olarak ölçüldü.

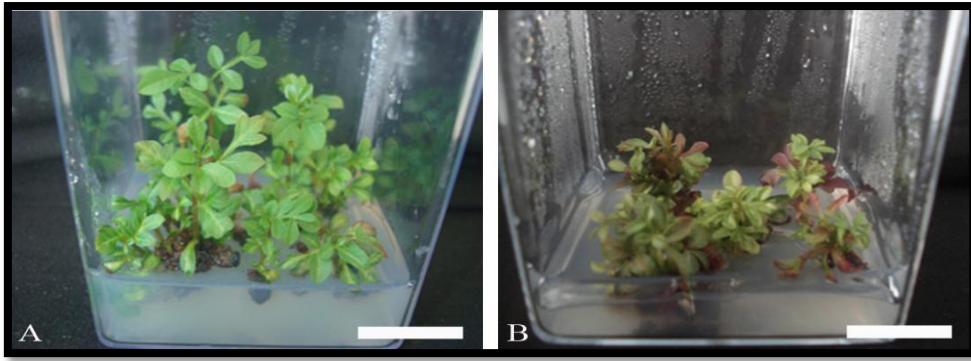
Morfolojik olarak yapılan gözlemlere göre yaprak gelişimleri incelendiğinde, MS besi ortamında özellikle de Klon-II'ye ait sürgünlerin yaprakları diğer besi ortamlarında gelişen sürgünlerin yapraklarına göre daha koyu yeşil renkte ve ayalarının diğer besi ortamlarında gelişenlere göre daha geniş olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2.). 28 günlük kültür süresi sonucu QL besi ortamında Klon-I'e ait sürgünler hariç diğer klonlarda, herhangi bir oksin uygulaması olmaksızın farklı oranlarda köklenme olduğu (çoğaltma besi ortamı olmasına rağmen), bununla beraber en fazla köklenmenin Klon-II'de olduğu görülmüştür. Ayrıca, Klon-IV'ün sürgünlerine ait yaprakların QL besi ortamında kızılattığı gözlemlendi (Şekil 4.2.). Bununla beraber, DKW besi ortamında ise, klonlara ait sürgünlerin yaprakları genel olarak koyu ve mat bir renkte gelişirken, WPM destekli besi ortamında ise, yaprakların rengi DKW besi ortamında bulunan sürgünlerin yapraklarına oranla daha açık renkte olduğu görüldü. Klon-III ve Klon-IV'e ait sürgünlerin yaprak yapısı ise, uygulanan diğer besi ortamlarındaki gibi cılız ve daha az olduğu gözlemlendi.

Sürgünlerin *in vitro* proliferasyonu üzerine yapılan bir çok çalışmada sitokin ve oksinleride içeren farklı BBD'nin etkileri üzerine odaklanırken, genellikle MS besi ortamı kullanıldı ve besin kompozisyonunun etkisi daha az irdelendi (Bell ve ark., 2009). Sürgünlerin çoğaltılma koşullarının optimizasyonu için, bitki türlerinin spesifik gereksinimleri sadece MS değil DKW, QL ve WPM gibi diğer besi ortamları ile de test edilmelidir. Sakız ağacı ile ilgili olarak MS ve WPM besi ortamı için çelişkili sonuçlar rapor edildi (Fascella ve ark., 2004; Mascarello ve ark., 2007).

Çalışmamızda dört farklı klona ait sürgünlerin dört farklı besi ortamında sürgün proliferasyonlarına etkileri karşılaştırıldı (Çizelge 4.3.). Çizelge 4.3.'te görüldüğü gibi, MS besi ortamının test edilen diğer 3 besi ortamı tipine göre çalışılan 4 farklı klonda da sürgün proliferasyonu bakımından en iyi sonuçları verdiği görüldü. Her ne kadar DKW besi ortamı kültüre alınan eksplantlardan sürgün başına en fazla yeni tomurcuk gelişimini teşvik etse de bu tomurcuklardan gelişen sürgünlerin kırmızı yapraklarından dolayı *in vitro* proliferasyona uygun olmadığı Yıldırım (2012) tarafından rapor edildi. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da Yıldırım (2012)'nin rapor ettiği gibi QL ve DKW besi ortamında gelişen sürgün yapraklarının kırmızı olduğu gözlemlenmiştir. Yukarıda bahsedilen besi ortamları arasındaki temel farklılıklar hem nitrat hem de amonyum iyon konsantrasyonlarıdır. MS besi ortamı amonyum (20.6mM) ve nitrat

#### 4. Bulgular ve Tartışma

iyonlarınca (39.4mM) yüksek iken QL, WPM ve DKW nispeten düşük amonyum konsantrasyonlarına sahiptir (hem QL, hem de WPM, 5mM ve DKW'de 17.7mM) Ayrıca, bu besi ortamlarındaki nitrat kaynağında değişiktir. MS ve WPM'de potasyum nitrat kullanılmasına rağmen QL ve DKW kalsiyum nitrat içerir. Dahası bu besi ortamlarındaki toplam iyon konsantrasyonu WPM besi ortamından düşük ve QL besi ortamından da daha yüksek olduğu için farklıdır. MS ve DKW'nin toplam iyon konsantrasyonları sırasıyla 93.3 ve 83.2mM'dır (Fascella ve ark., 2000). Bizim çalışmamızda MS besi ortamında elde edilen iyi sonuçlar bu ortamdaki toplam iyon kuvvetinin yüksek olmasından kaynaklanmış olabilir. Bu sonuç klonal olmayan rejenerantlar kullanılarak Yıldırım, (2012) tarafından da rapor edildi.



**Şekil 4.2.** Klon-II'nin 4 haftalık kültür sonrası: **A)** MS besi ortamında gelişen sürgünler. Bar : 3.5 cm ve **B)** QL besi ortamında gelişen sürgünler. Bar : 3.3 cm

#### 4.2.2. Sürgün Çoğaltımına MS Besi Ortamı Kuvvetinin Belirlenmesi

Her bir klona ait 14 defa alt kültürlenen eksplantlar kullanılarak MS besi ortamı farklı kuvvetlerinin (1/4x, 1/2x, 1x ve 2x) sürgün çoğaltımına etkileri gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar istatistiksel uygulamalara tabi tutuldu ve sonuçlar Çizelge 4.4.'te verildi.

**Çizelge 4.4.** Sürgün çoğaltımına MS besi ortamı kuvvetinin etkisi\*

Klon No	MS Kuvveti	Ortalama Sürgün Sayısı ** $\pm$ SH	Ortalama Sürgün Uzunluğu ** $\pm$ SH (mm)
Klon I	1/4x	2.05 $\pm$ 0.05 e	12.30 $\pm$ 0.40 d
	1/2x	2.28 $\pm$ 0.10 d	12.50 $\pm$ 0.60 d
	1x	2.37 $\pm$ 0.15 d	12.70 $\pm$ 0.60 d
	2x	2.52 $\pm$ 0.13 cd	14.60 $\pm$ 0.50 b
Klon II	1/4x	3.31 $\pm$ 0.15 b	16.80 $\pm$ 0.20 a
	1/2x	3.60 $\pm$ 0.13 a	12.90 $\pm$ 0.20 d
	1x	3.40 $\pm$ 0.15 ab	13.70 $\pm$ 0.40 c
	2x	2.90 $\pm$ 0.16 c	14.50 $\pm$ 0.50 b
Klon III	1/4x	2.29 $\pm$ 0.18 d	11.60 $\pm$ 0.20 e
	1/2x	2.31 $\pm$ 0.11 d	12.00 $\pm$ 0.20 d
	1x	2.87 $\pm$ 0.20 c	11.70 $\pm$ 0.20 e
	2x	2.62 $\pm$ 0.15 c	12.40 $\pm$ 0.20 d
Klon IV	1/4x	2.25 $\pm$ 0.17 d	11.70 $\pm$ 0.20 e
	1/2x	2.27 $\pm$ 0.11 d	12.30 $\pm$ 0.20 d
	1x	2.80 $\pm$ 0.20 c	11.80 $\pm$ 0.20 e
	2x	2.55 $\pm$ 0.15 cd	12.80 $\pm$ 0.20 d

\*Rakamlar kültürün 28. gününde her bir klon için toplam 64 eksplantın ortalamasıdır.

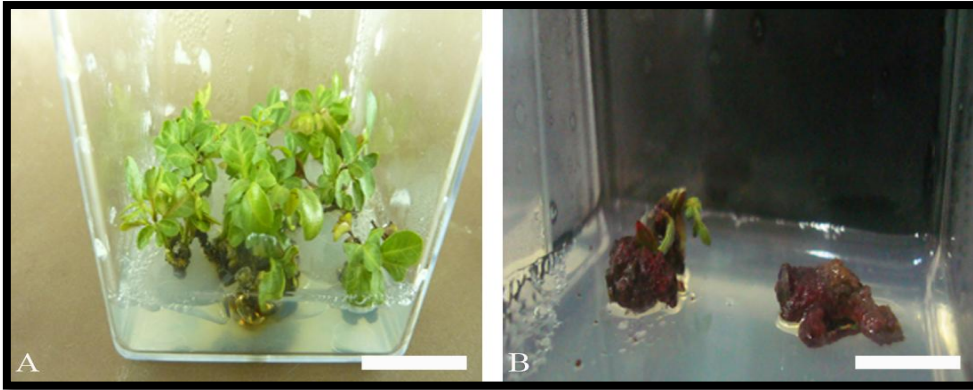
\*\*Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların ANOVA'yı takip eden LSD testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olmadığını gösterir. SH: Standart Hata

Farklı klonların sürgünlerinin proliferasyonu üzerine denenen dört farklı kuvvetteki besi ortamları içerisinde en iyi gelişme 1x kuvvetindeki MS besi ortamında gözlemlendi. Ancak, gövde başına düşen eksplant sayısı olarak en yüksek oran Klon-II'ye ait olan sürgünlerde, 1/2x kuvvetteki MS'te 3.60 olarak ölçüldü. Bunun yanında gövde başına düşen eksplant oranı en düşük 1/4x kuvvetteki MS besi ortamında gözlemlendi ve bu kuvvetteki MS besi ortamında Klon-I'de gövde başına ortalama eksplant sayısı 2.05 olarak rapor edildi. Bu bilgilere ilave olarak, 2x kuvvetteki MS besi ortamında, bütün klonlarda genel olarak 1/4x ve 1/2x kuvvetteki MS besi ortamına göre gövde başına düşen eksplant oranının daha iyi olduğu belirlendi. Gövde başına düşen eksplant oranı olarak klonlar irdelendiğinde, Klon-II'de gövde başına düşen eksplant oranı her 4x kuvvetteki MS besi ortamında da yüksek oranda tespit edilirken, gövde başına düşen eksplant oranı 1x kuvvetteki MS besi ortamında 3.40 olarak ölçüldü. Ancak gövde uzunluğu bakımından değerlendirildiğinde, genel olarak klonlarda gövde başına düşen eksplant oranı 1x kuvvetteki besi ortamında en yüksek iken, klonlar arasında gövde uzunlukları bakımından en uzun gövdeler genel olarak 2x kuvvetteki MS besi ortamında elde edildi.

#### 4. Bulgular ve Tartışma

Morfolojik olarak yapılan gözlemlerde ise; *in vitro* ortamda 28 günlük kültür süresi sonunda gelişen MS kuvvetlerinde kültüre alınan klonlardan en iyi proliferasyon gösteren Klon-II'de gerek sürgün boyu, gerekse yan sürgünlerin oluşumu ile birlikte yaprak canlılığının öne çıktığı görüldü ve MS kuvveti arttıkça primordiyal sürgün boylarından yanal sürgünlerin sayısında artma ve yaprak ayalarının da daha geniş olduğu görüldü (Şekil 4.3.A). Ayrıca, MS kuvvetinin artmasıyla özellikle 2x'de yapraklarda kızıllaşma görüldü. Bununla birlikte 1/4x kuvvetteki MS besi ortamında ve özellikle Klon-II'nin tüm kuvvetlerinde 14. günde hiç bir oksin ilavesi olmadan spontane köklenme görüldü. Bu şekilde klonal olarak MS kuvvetinin etkisi Klon-III ve Klon-IV'te de klonların karakteristik özelliğinden dolayı yaprak yapıları ve birincil gövde sürgünlerinin durumu zayıf olarak rapor edildi. Klon-I'in, genel olarak Klon-III ve Klon-IV'e nazaran daha iyi olduğu görüldü. Besi ortamına temas eden primer yapraklarda kararma olduğu tespit edildi (Şekil 4.3.B).

Farklı klonlar için MS besi ortamı kuvvetlerinin sürgün proliferasyonuna etkisinin çalışıldığı Çizelge 4.4'te de görüldüğü gibi en az sürgün sayısının ¼ kuvvetli MS besi ortamında elde edilmesi ve artan besi ortamı kuvvetiyle sürgün sayısının artması sürgün proliferasyonu için ½ yada 1/1 kuvvetteki MS besi ortamının kullanılması gerekliliğini gösterdi. Benzer sonuçlar, diğer *Pistacia* türlerinde de rapor edildi (Onay 1996; Tilkat 2006).



**Şekil 4.3.** Kültüre alındıktan 4 hafta sonra : **A)** 1 mgI<sup>-1</sup> BA içeren MS besi ortamında Klon-II'ye ait gelişen sürgünler. Bar : 3.5 cm **B)** Besi ortamına temas eden yaprakların kalluslaşması ve kararması. Bar : 2.13 cm



### 4.2.3. Sürgün Çoğaltımına Sitokin Tiplerinin Etkisi

Bu deneyde, 16 defa alt kültürlenmiş sürgünler kullanıldı. Önceki deneyde 1x kuvvetinde MS besi ortamının sürgünlerin proliferasyonunda en iyi ortam olduğu tespit edildi. Bu deneyde BA, KİN, TDZ ve 2iP (her biri 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>) ve 50 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> valin 1x kuvvetteki MS besi ortamına eklendi. Elde edilen sonuçlar istatistiksel uygulamalara tabi tutuldu ve sonuçlar Çizelge 4.5.'te verildi.

Çizelge 4.5. Sürgün çoğaltımına sitokin tiplerinin etkisi\*

Klon No	Sitokin Tipi (mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup> )	Ortalama Sürgün Sayısı ** ± SH	Ortalama Sürgün Uzunluğu ** ± SH (mm)
Klon I	BA	2.69±0.29 a	13.41±0.50 b
	KIN	1.06±0.06 d	10.56±0.33 c
	TDZ	1.25±0.11 c	10.72±0.85 c
	2-IP	1.24±0.16 c	13.27±0.83 b
Klon II	BA	2.45±0.22 a	15.50±0.47 a
	KIN	1.13±0.09cd	12.69±0.60 b
	TDZ	1.44±0.20bc	10.51±0.47 c
	2-IP	1.00 ± 0.00	13.75±0.58 b
Klon III	BA	2.44±0.35 a	12.86±0.43 b
	KIN	1.00±0.00 d	10.06±0.36 c
	TDZ	1.13±0.13 c	10.19±0.37 c
	2-IP	1.00±0.00 d	10.94±0.46 c
Klon IV	BA	1.24±0.14 c	9.99±0.51 cd
	KIN	1.06±0.06 d	8.13±0.36 d
	TDZ	1.69±0.22 b	8.54±0.32 d
	2-IP	1.33±0.11bc	8.94±0.41 d

\*Rakamlar kültürün 28. gününde her bir klon için toplam 64 eksplantın ortalamasıdır.

\*\*Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların ANOVA'yı takip eden LSD testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olmadığını gösterir. SH: Standart Hata

28 günlük kültür sonucunda elde edilen sonuçlara uygulanan istatistiksel analiz sonucu oluşturulan Çizelge 4.5. incelendiğinde, 4 farklı sitokin (BA, KIN, TDZ ve 2-iP) arasında genel olarak, gövde başına düşen eksplant oranını en yüksek BA'li ortam verildi ve en yüksek gövde başına düşen eksplant oranı 2.69 ile Klon-I'e ait sürgünlerden elde edildi. Bununla beraber, BA dışında çalışılan KİN, TDZ ve 2-İP gibi sitokinlerle elde edilen sonuçlar BA ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklılıklar gösterdi.

Çizelge 4.3. ve 4.4.'te eksplant başına düşen gövde sayısı ile gövde uzunluğu arasında doğru orantı görülmezken, Çizelge 4.5.'te, gövde başına düşen eksplant sayısı ile gövde uzunluğundaki en yüksek değerler BA destekli MS ortamında elde edildi. BA'lı MS besi ortamında elde edilen sonuçlarda klonlar arasında en fazla gövde

uzunluğu 15.50 mm ile Klon-II'ye ait sürgünlerde elde edildi ve en kısa sürgünler, Klon-IV'e ait sürgünlerde ortalama 9.99 mm olarak ölçüldü.

Sonuçlar morfolojik olarak değerlendirildiğinde, klonlar arasında en iyi gelişme Klon-II'ye ait sürgünlerde  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA destekli MS besi ortamında elde edildi. Bununla birlikte, yan sürgün oluşumu ancak 3. haftanın sonunda görülmeye başlandı. Aynı zamanda Klon-II'ye ait sürgünlerde,  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA destekli besi ortamlarında koyu yeşil renkli yapraklarda, diğer klonlara nazaran yaprak yeşilliğinde sararma, kızıllaşma yada kararma görülmedi. Genel olarak klonlarda,  $1 \text{ mg l}^{-1}$  (2-iP ve KİN) destekli besi ortamında yaprakların kızılıştığı görüldü.  $1 \text{ mg l}^{-1}$  Kin destekli ortamda yer yer yapraklarda sararma görüldü.  $1 \text{ mg l}^{-1}$  TDZ destekli besi ortamında yapraklar çok fazla soluk, mat ve son olarak sürgünün bazal kısmında beyazımsı kallus oluşumu görüldü (Şekil 4.4.). Bunlara ilaveten besi ortamına temas eden yapraklarda kararma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3.).



Şekil 4.4. TDZ ilaveli MS ortamda gelişen sürgünlerin basal kısımlarından beyazımsı kallus gelişimi. Bar : 2 cm

#### 4.2.4 Sürgün Çoğaltımına BA Konsantrasyonlarının Etkisi

Bu çalışmada, 16 defa alt kültürü yapılmış sürgünler kullanıldı. Önceki deneylerde tespit edilen optimum koşullar (1x kuvvetinde MS besi ortamına  $50 \text{ mg l}^{-1}$  valin ve sitokin BA) ve BA'nın farklı konsantrasyonları (0.5, 1.0, 2.0, ve  $4.0 \text{ mg l}^{-1}$ ) besi ortamına eklendi. Elde edilen sonuçlar istatistiksel uygulamalara tabi tutuldu ve sonuçlar Çizelge 4.6.'da verildi.

Çizelge 4.6. Sürgün Çoğaltımına BA konsantrasyonlarının Etkisi\*

Klon No	BA (mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup> )	Ortalama Sürgün Sayısı** ± SH	Ortalama Sürgün Uzunluğu** ± SH (mm)
Klon I	0.5	2.00±0.21 b	9.51±0.59 b
	1	1.83±0.21 b	9.20±0.57 b
	2	2.00±0.28 b	9.17±0.53 b
	4	2.33±0.43 ab	8.63±0.40 b
Klon II	0.5	2.50±0.44 ab	11.49±1.11 a
	1	2.75±0.25 a	8.86±0.23 b
	2	2.92±0.36 a	8.96±0.32 b
	4	2.83±0.39 a	8.80±0.47 b
Klon III	0.5	1.67±0.26 bc	9.23±0.33 b
	1	2.25±0.49 a	9.45±0.61 b
	2	1.08±0.08 d	8.04±0.50 b
	4	1.83±0.37 b	9.24±0.98 b
Klon IV	0.5	1.50±0.19 c	9.29±0.48 b
	1	1.83±0.27 b	9.14±0.67 b
	2	2.17±0.30 ab	8.26±0.46 b
	4	1.25±0.25 c	7.96±0.45 b

\*Rakamlar kültürün 28. gününde her bir klon için toplam 64 eksplantın ortalamasıdır.

\*\*Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların ANOVA'yı takip eden LSD testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olmadığını gösterir. SH: Standart Hata

Çizelge 4.6. incelendiğinde, çalışılan farklı BA konsantrasyonlarında, klonlar arasında farklı sonuçlar elde edilmiştir. Klon-II'ye ait sürgünler, bu çalışmada kullanılan diğer klonlara göre daha iyi sonuçlar verdi ve gövde başına düşen eksplant oranı en yüksek 2 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BA destekli MS besi ortamında 2.92 olarak elde edildi. Gövde uzunluğu bakımından klonlar arasında denenen farklı BA konsantrasyonları değişik sonuçlar gösterdi. Yine de en yüksek gövde uzunluğu Klon-II'ye ait sürgünlerde gözlenmiş olup, 0.5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BA destekli besi ortamında 11.49 mm gövde uzunluğu elde edildi.

Optimum sürgün poliferasyonu için besi ortamı kompozisyonu ve tipinin yanı sıra, BBD'lerin kompozisyonu da önemli bir rol oynar. Bu çalışmada farklı BA konsantrasyonları (Çizelge 4.6.). MS besi ortamına eklendi ve rapor edilen parametrelerin içinde en iyi cevap Klon-II'de 2.0 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BA'lı besi ortamında elde edildi. Bu çalışma düşük BA konsantrasyonlarının sakız ağacının *in vitro* regenerantlarının çoğaltılması için daha uygun olduğunu gösterdi. Bu bulgular Mascarello ve ark. (2007)'nin sonuçları ile uyumludur. Ayrıca, sürgün poliferasyonunda nispeten düşük sitokin konsantrasyonlarının etkinliği *P. vera*'da rapor edildi (Ozden-Tokatli ve ark., 2005; Onay 2000). Ancak, 0.5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BA içeren besi ortamına GA3 ve IAA ilavesinin sürgün proliferasyonunu artırmadığını Mascarello ve ark. (2007) tarafından rapor edildi.

#### 4. Bulgular ve Tartışma

Çalışılan parametrelerdeki sürgünlerin morfolojik gelişimine bakıldığında bütün klonlarda farklı formlar gelişti (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. *In vitro* ortamda kültüre alındıktan 4 hafta sonra gelişen klonal rejenerantlar. A) Klon-I, C) Klon-II B) Klon-III, ve D) Klon-IV'ü göstermektedir A-C) Bar : 4 cm, B-D) Bar : 4.5 cm

##### 4.2.5. Sürgün Çoğaltımına Karbon Kaynaklarının Etkisi

Bu deneyde, 18 defa alt kültürlenmiş klonlara ait aksenik kültürlerden alınan her bir klon için 16'şar sürgün kullanıldı. Bu deneyde önceki deneylerdeki optimum koşullar kullanılarak sürgün proliferasyonuna farklı karbon kaynaklarının etkisi 4 farklı klon için çalışıldı. Elde edilen sonuçlar istatistiksel uygulamalara tabi tutuldu ve sonuçlar Çizelge 4.7.'de verildi.

Çizelge 4.7. Sürgün çoğaltımına karbon kaynaklarının etkisi\*

Klon No	Karbonhidrat Tipi	Ortalama Sürgün Sayısı** $\pm$ SH	Ortalama Sürgün Uzunluğu** $\pm$ SH (mm)
Klon I	Fruktoz	2.25 $\pm$ 0.13d	12.00 $\pm$ 0.40 ab
	Sakkaroz	2.37 $\pm$ 0.15 cd	11.50 $\pm$ 0.20bc
	Laktoz	2.00 $\pm$ 0.00 e	11.20 $\pm$ 0.30c
	Glikoz	2.18 $\pm$ 0.13 d	11.00 $\pm$ 0.30c
Klon II	Sakkaroz	2.94 $\pm$ 0.17b	11.90 $\pm$ 0.20 b
	Fruktoz	3.62 $\pm$ 0.17a	12.50 $\pm$ 0.30 a
	Laktoz	2.15 $\pm$ 0.08 d	12.60 $\pm$ 0.30a
	Glikoz	3.45 $\pm$ 0.16 a	12.10 $\pm$ 0.20a
Klon III	Fruktoz	2.83 $\pm$ 0.14 b	11.30 $\pm$ 0.20c
	Sakkaroz	3.00 $\pm$ 0.19 b	11.30 $\pm$ 0.20 c
	Laktoz	2.37 $\pm$ 0.12 cd	11.90 $\pm$ 0.30 b
	Glikoz	2.31 $\pm$ 0.15 c	12.00 $\pm$ 0.30 ab
Klon IV	Fruktoz	2.76 $\pm$ 0.13 b	11.00 $\pm$ 0.20c
	Sakkaroz	2.80 $\pm$ 0.17 b	11.50 $\pm$ 0.20 bc
	Laktoz	2.40 $\pm$ 0.12 c	11.70 $\pm$ 0.30 b
	Glikoz	2.18 $\pm$ 0.14 d	12.50 $\pm$ 0.40a

\*Rakamlar kültürün 28. gününde her bir klon için toplam 64 eksplantın ortalamasıdır

\*\*Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların ANOVA'yı takip eden LSD testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olmadığını gösterir. SH: Standart Hata

Bu deneyde MS besi ortamında farklı karbon kaynakları olarak fruktoz, sakkaroz, laktoz ve glikoz arasından sakkarozlu besi ortamında gelişen gövde başına eksplant oranı en yüksek olup, önceki optimizasyon çalışmalarında olduğu gibi Klon-II'ye ait sürgünlerde ortalama eksplant oranı en fazla 3.62 olarak belirlendi. Gövde başına düşen eksplant oranı en az laktoz ve glikozlu besi ortamında elde edilerek, klonlar arasında gövde başına düşen eksplant oranı en az Klon-I'de 2.00 olarak elde edildi. Gövde uzunlukları incelendiğinde, gövde başına düşen eksplant oranında olduğu gibi doğru orantılı sonuçlar elde edilmedi. Ancak, Klon-II'ye ait sürgünlerde, diğer klonlara göre ortalama gövde uzunluklarının daha fazla olduğu görüldü. Bununla birlikte, gövde uzunluğu Klon-II'ye ait olan sürgünlerde en fazla 12.60 mm ile laktozlu MS besi ortamında elde edildi.

Sakız ağacının *in vitro* çoğaltılmasında şeker tiplerinin etkisi ile ilgili daha önce herhangi bir çalışma rapor edilmedi. Ancak, KBAG 110-T941 nolu proje kapsamında yaptığımız çalışmalara göre, karbonhidrat tipi kültüre alınan sürgünlerin yaş, sürgün uzunluğu ve genotipe göre farklılıklar gösterdi. Fakat, genel olarak sakkaroz diğer şeker tiplerine göre daha baskın olarak dikkat çekti.

#### 4.2.6. Sürgün Çoğaltımına Sakkaroz Konsantrasyonlarının Etkisi.

Bu çalışmada 18 defa alt kültürlenmiş sürgünler sakkarozun 5 farklı konsantrasyonunun proliferasyona etkisi için kültüre alındı. Elde edilen sonuçlar istatistiksel uygulamalara tabi tutuldu ve sonuçlar Çizelge 4.8.'de verildi.

Çizelge 4.8. Sürgün çoğaltımına sakkaroz konsantrasyonlarının etkisi\*

Klon No	Sakkaroz Konsantrasyonu (gl <sup>-1</sup> )	Ortalama Sürgün Sayısı** ± SH	Ortalama Sürgün Uzunluğu** ± SH (mm)
Klon I	10	2.00±0.21 a	08.01±0.55 b
	20	2.25±0.33 a	09.71±0.96 ab
	30	2.42±0.34 a	10.99±1.25 a
	40	2.58±0.19 a	09.92±0.56 ab
	50	1.83±0.24 b	10.24±0.61 ab
Klon II	10	2.67±0.31 a	08.66±0.48 b
	20	2.67±0.38 a	10.20±0.98 ab
	30	2.75±0.25 a	10.11±0.31 ab
	40	2.75±0.39 a	10.71±0.51 a
	50	1.92±0.29 b	11.43±0.72 a
Klon III	10	1.67±0.26 b	08.20±0.56 b
	20	1.58±0.23 b	08.65±0.50 a
	30	1.33±0.14 c	09.46±0.65 a
	40	2.50±0.23 a	09.47±0.68 a
	50	1.75±0.28 b	10.05±0.76 a
Klon IV	10	1.00±0.00 d	08.00±0.52 b
	20	1.25±0.13 c	08.70±0.50 b
	30	1.08±0.08 c	09.33±0.28 a
	40	1.00±0.00 d	10.00±0.00 a
	50	1.33±0.19 b	08.89±0.31 b

\*Rakamlar kültürün 28. gününde her bir klon için toplam 80 eksplantın ortalamasıdır. \*\*Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değeri bu ortalamaların ANOVA'ya takip eden LSD testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olmadığını gösterir. SH: Standart Hata

Çizelge 4.8. incelendiğinde, sürgün başına düşen eksplant sayısı bakımından en iyi sonuçlar Klon-II'de elde edildi. Klon-II'nin ortalama sürgün sayısı en fazla 30gl<sup>-1</sup> sakkaroz içeren MS besisi ortamında 2.75 olarak ölçüldü. Gövde uzunlukları bakımından farklı konsantrasyonlarda klonlar arasında değişimler gözlemlendi. Özellikle 50 mgI<sup>-1</sup> gibi yüksek oranda sakkaroz içeren MS besisi ortamında ortalama 11.43 mm gövde uzunluğu elde edildi.

#### 4.3. Sürgünlerin *in vitro* Köklendirilmesi

Köklendirme çalışmalarında *in vitro* ortamda 20 defa alt kültüre alınmış *Pistacia lentiscus* L. klonları 4 haftalık proliferasyon ortamında gelişmesinden sonra köklenme

deneyleri için kullanıldı. Elde edilen sonuçlar istatistiksel uygulamalara tabi tutuldu ve sonuçlar Çizelge 4.9. ve 4.10.'da verildi.

#### **4.3.1. Köklenmeye Oksin Tiplerinin Etkisi**

4 farklı klona ait sürgünlerin köklenmesine değişik oksinlerin kullanılmasıyla yapılan köklendirme çalışmalarında, rapor edilen köklenme ortamları hem oksin tipi hem de çalışılan klonlar arasında istatistiksel olarak farklılıklar gösterdi (Çizelge 4.9.). Klon-II'ye ait sürgünler kontrol grubunda %20 oranında köklenme verirken, diğer klonların hiçbirinde kontrol grubunda köklenme gözlenmedi. Ortama ilave edilen oksinler neticesinde özellikle IBA'da köklenme yüzdesi %87'ye kadar yükselme gösterdi. Bunun yanında diğer klonlarda da IBA, sürgünlerin köklenmesinde yüksek başarı oranı göstermedi. Gövde başına düşen kök sayısı incelendiğinde yine IBA ile destekli besi ortamında köklenmeye bırakılan gövdelerde diğer oksinler ile destekli besi ortamlarına göre daha fazla kök oluşumu gözlenmedi. Gövde başına düşen kök sayısı Klon-II'ye ait sürgünlerde en fazla olduğu gözlendi ve ortalama eksplant başına düşen kök sayısının 5.45 olduğu görüldü. Köklerin uzunlukları incelendiğinde IBA destekli MS besi ortamında tüm klonlarda fazla uzunlukta kökler elde edildi. En uzun köklerin, yine Klon-II'ye ait gövdelerin köklenmesinde elde edildi ve 45.60mm olduğu gözlendi.

Çizelge 4.9. Köklenmeye oksin tiplerinin etkisi\*

Klon No	Oksin Tipi	Köklenme (%)	Ortalama Kök Sayısı ** ± SH	Ortalama Kök Uzunluğu ** ± SH (mm)
Klon I	Kontrol	00.00±0.00	0.00±0.00 h	00.00±0.00 e
	IAA	30.00±9.20	1.90±0.05 e	14.20±1.30 d
	IBA	50.00±6.70	4.50±0.48 b	38.70±0.90 b
	NAA	20.10±7.20	2.05±0.12 de	20.40±0.50 c
Klon II	Kontrol	20.00±0.00	1.00±0.00 g	10.00±1.00 d
	IAA	42.00±10.35	2.15±0.10 d	16.50±0.70 d
	IBA	87.00±5.53	5.45±0.48 a	45.60±0.60 a
	NAA	26.30±8.40	2.35±0.12 d	25.70±0.70 c
Klon III	Kontrol	00.00±0.00	0.00±0.00 h	00.00±0.00 e
	IAA	20.30±8.40	1.60±0.06 f	13.30±1.10 d
	IBA	30.15±5.20	3.00±0.24 cd	25.40±1.30 c
	NAA	14.30±4.46	1.80±0.10 ef	15.30±0.10 d
Klon IV	Kontrol	00.00±0.00	0.00±0.00 h	00.00±0.00 e
	IAA	18.90±9.20	1.53±0.04 f	10.00±1.30 d
	IBA	27.12±4.50	2.85±0.32 d	23.50±1.00 c
	NAA	13.40±3.30	1.65±0.15 f	12.50±1.60 d

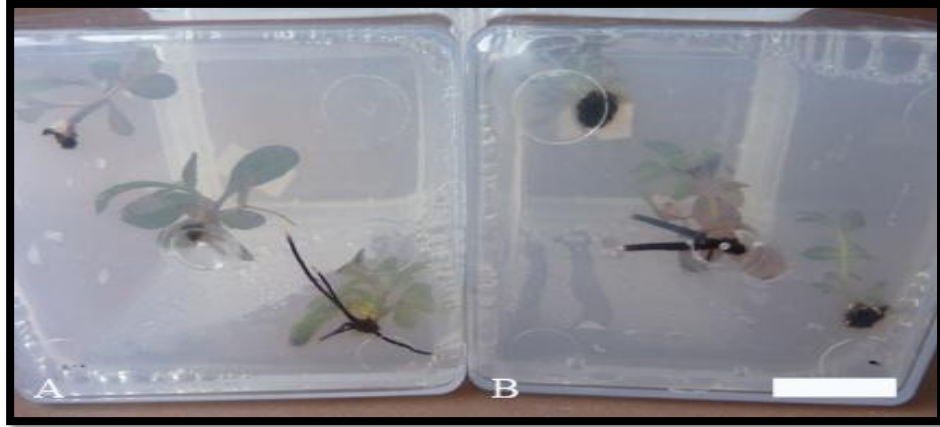
\*Rakamlar kültürün 28. gününde her bir klon için toplam 64 eksplantın ortalamasıdır.

\*\*Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların ANOVA'yu takip eden LSD testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olmadığını gösterir. SH: Standart Hata

Morfolojik gözlemler irdelendiğinde, kültüre alındıktan 3 hafta sonra klonlarda primer köklerin oluşmaya başladığı gözlemlendi ve 4. haftada sekonder köklerin de hızlı bir şekilde geliştiği gözlemlendi. Oksin destekli MS besi ortamlarında kök uzunluğu ve kök kalınlığı bakımından oksin tiplerinde ve klonlarda morfolojik farklılıkların olduğu tespit edildi. Bununla birlikte tüm klonlarda genel olarak NAA'lı MS besi ortamındaki eksplantlara ait primer kökün kalınlığı IBA ve IAA içerikli ortamlarda bulunan eksplantlardakinden daha kalın ve dayanıksız olduğu tespit edildi (Şekil 4.6.). IAA içerikli ortamda gelişen bitkiciklerin ise klonal olarak en cılız kök sistemi oluşturduğu rapor edildi.

IBA içerikli ortamda gelişen bitkiciklerin kök sistemine bakıldığında ise, en iyi gövde ve yaprak gelişimi gösteren klona (Klon-II) paralel bir şekilde kök gelişiminde iyi gelişme görüldü. Bununla beraber IBA içerikli ortamda gelişen tüm klonların kendi içinde en iyi ortalama adventif kök sayısı ve kök uzunluğunu verdiği rapor edildi.





**Şekil 4.6.** Farklı oksinlerin kök gelişimine etkisi: **A)** Klon-IV'e ait 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> IAA'li ve **B)** Klon-IV'e ait 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> NAA içerikli *in vitro* ortamda kültüre alındıktan 20 gün sonra gelişen köklerin görünüşü. Bar : 2 cm

#### 4.3.2. Köklenmeye IBA Konsantrasyonlarının Etkisi

Bu deneyde, IBA'nın farklı konsantrasyonlarının (0.5, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>) etkisi 22 defa alt kültürlenmiş 2-3 cm'lik aksenik sürgünler kullanılarak 4 farklı klon üzerinde köklenmeye etkileri irdelendi. Elde edilen sonuçlar istatistiksel uygulamalara tabi tutuldu ve sonuçlar Çizelge 4.10.'da verildi.

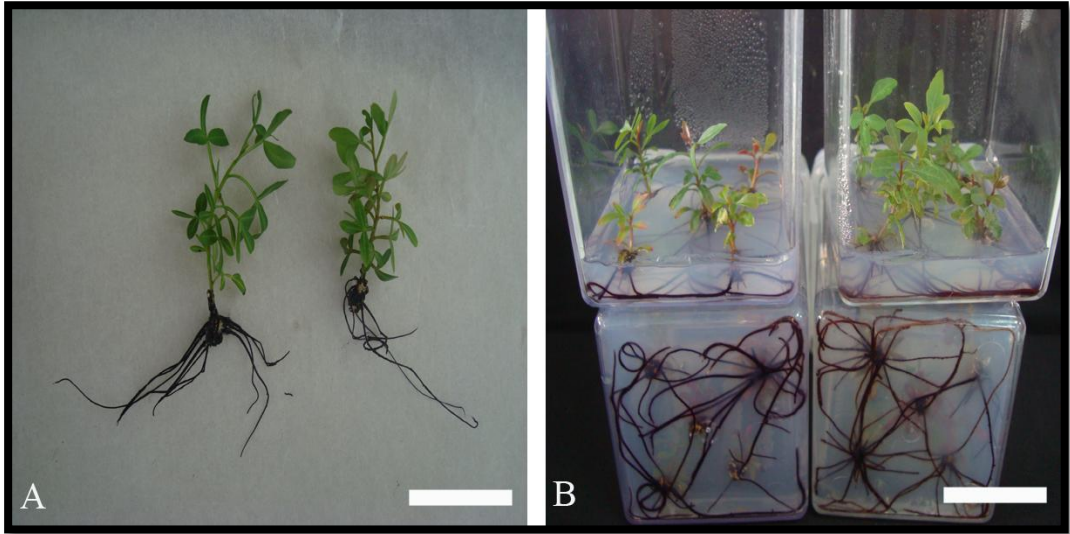
Çizelge 4.10. Köklenmeye IBA konsantrasyonlarının etkisi\*

Klon No	IBA Konsant rasyonu (mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup> )	Köklenme (%)	Ortalama Adventif Kök Sayısı ± SH**	Ortalama Kök Uzunluğu ± SH mm**
Klon I	Kontrol	00.00±0.00	0.00±0.00 f	00.00±0.00 g
	0.5	45.06±0.25	1.75±0.45 cd	38.70±3.10 d
	1	55.03 ±0.42	2.15±0.30 c	45.30±3.20 c
	2	65.07±0.40	2.80±0.80 c	50.20±3.60 b
	4	67.06±0.30	4.55±1.05 ab	55.40±3.90 b
Klon II	Kontrol	25.00±0.00	1.00±0.00 e	10.00±1.00 h
	0.5	69.10±0.31	1.88±0.55 c	47.60±3.10 c
	1	94.12±0.31	3.69±0.58 b	49.40±3.20 c
	2	81.09±0.31	3.75±0.72 b	53.50±3.60 b
	4	94.15±0.31	5.43±1.00 a	64.10±3.90 a
Klon III	Kontrol	00.00±0.00	0.00±0.00 f	00.00±0.00 g
	0.5	50.06±0.22	1.60±0.32 cd	35.40±3.10 d
	1	53.08±0.18	2.03±0.38 c	39.30±3.20 d
	2	58.15±0.10	2.20±0.45 c	42.00±3.60 c
	4	60.10±0.09	3.33±0.92 b	46.40±3.90 c
Klon IV	Kontrol	00.00±0.00	0.00±0.00 f	00.00±0.00 g
	0.5	45.34±0.43	1.42±0.60 d	30.70±3.10 e
	1	50.30±0.36	1.96±0.50 c	33.20±3.20 de
	2	55.25±0.15	2.10±0.82 c	34.10±3.60 de
	4	58.20±0.10	3.05±0.94 bc	40.60±3.90 cd

\*Rakamlar kültürün 28. gününde her bir klon için toplam 80 eksplantın ortalamasıdır.\*\*Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların ANOVA'yı takip eden LSD testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olmadığını gösterir. SH: Standart Hata

Çizelge 4.10. incelendiğinde, farklı oksin denemelerinde görüldüğü gibi Klon-II'ye ait sürgünlerde hiçbir oksin uygulaması olmadan da %25 oranında köklenme elde edildi. Bununla birlikte, farklı oksin denemelerinde daha başarılı sonuçlar elde edilen IBA'nın bu çalışmada denenen farklı konsantrasyonlarında, özellikle Klon-II'ye ait sürgünlerde 4 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> IBA destekli MS besi ortamında %94 oranında köklenme görüldü. IBA miktarının artması tüm klonlarda köklenme yüzdelerini artırdı. Bunun yanında gövde başına düşen ortalama eksplant oranı incelendiğinde yine IBA konsantrasyonunun artmasıyla köklenme oranının arttığı gözlemlendi. Gövde başına düşen ortalama kök oranı Klon-II'ye ait sürgünlerde 4 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> destekli besi ortamında gözlemlendi ve en fazla 5.43'tür. Bununla beraber, kök uzunlukları da, köklenme yüzdesi ve gövde başına düşen ortalama eksplant oranında olduğu gibi doğru orantılı bir şekilde gözlemlendi. En uzun kök Klon-II'ye ait olan 4 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> IBA destekli MS besi ortamında elde edildi ve 64.10 mm'dir (Şekil 4.7.).

Kökün morfolojik gelişiminin, yirmi sekiz günlük kültür süresince çok yavaş geliştiği tespit edildi. Kültürün 10. gününde kök uçlarında büyüme ve şişkinleşme görülmesine rağmen radikulanın belirgin bir şekilde gözlenmesi çoğu eksplantlarda kültürün ilk üç haftası içinde (Şekil 4.6.) gözle görülebilir hale geldi. İlk kök oluşumu kültürün 20. gününde  $1 \text{ mg l}^{-1}$  IBA grubunda gerçekleşti. Kültürün 4. haftasında tüm uygulamalarda kültüre alınmış eksplantlarda köklerin hızlı bir şekilde geliştiği tespit edildi.



Şekil 4.7. Klon-II'ye ait  $4 \text{ mg l}^{-1}$  IBA destekli besi ortamında köklenmiş sürgünler.

A) Bar : 5 cm ve B) Bar : 4.1 cm

*In vitro* çoğaltılan sakız ağaçlarının mikro sürgünlerindeki adventif köklenmesi  $1 \text{ mg l}^{-1}$  IBA içeren MS ortamında en yüksek değerde (%94) olup, her mikro sürgün için Klon-II'de ortalama kök sayısı (5.43) ve en uzun kök Klon-II'de  $4 \text{ mg l}^{-1}$  IBA destekli ortamda (64.10 mm) gelişti. Benzer şekilde Yıldırım (2012),  $1 \text{ mg l}^{-1}$  IBA destekli besi ortamında kültüre alınan sürgünlerden gelişen köklerin ortalama uzunluğu 47.8 mm ve adventif kök sayılarının 5.60 olduğunu rapor edildi. Bizim sonuçlarımızın aksine Mascarello et al. (2007) IBA değil NAA'yi köklenmede en etkili sitokinin olduğunu rapor etti ancak, bu araştırmacılar çalışmalarında kantitatif sonuçlar sunmadı. Ancak, *P. vera* ve *Prunus armeniaca* birçok çeşidinde oksin tipleri içinde IBA'nın en etkili köklendirme ajanı olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edildi (Onay, 2000; Tilkat ve ark, 2009; Tilkat ve Onay, 2009; Yıldırım ve ark, 2011).

#### 4.4. Köklenen Bitkiciklerin Adaptasyonunda Steril Kompostun Etkisi

*In vitro* ortamda çoğaltılıp köklendirilen her klona ait 20 bitkinin doğal ortama alıştırılmasında, otoklavlanmış ve otoklavlanmamış kompost kullanıldı. 5 hafta ve 4 ay adaptasyon süresi sonunda alışan bitkiciklerin yüzdeleri rapor edildi.

**Çizelge 4.11.** Köklenen bitkiciklerin adaptasyonunda steril kompostun etkisi\*.

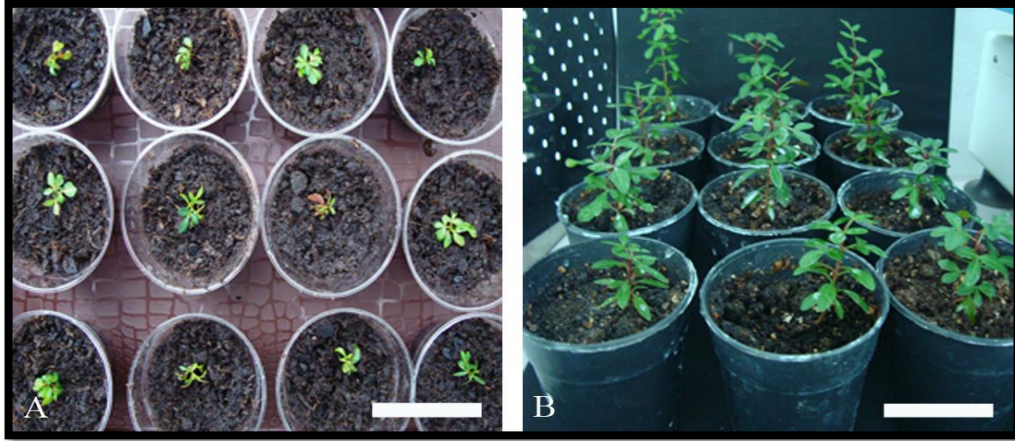
Klon No	Torf Tipi	Yaşayan Rejenerant** (%)	4 Ay Sonra Yaşayan Fideler** (%)
Klon I	Otoklavlanmış	60	90
	Otoklavlanmamış	50	84
Klon II	Otoklavlanmış	70	95
	Otoklavlanmamış	65	92
Klon III	Otoklavlanmış	55	85
	Otoklavlanmamış	48	83
Klon IV	Otoklavlanmış	52	84
	Otoklavlanmamış	45	82

\*Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır.

\*\*Çizelgede bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların ANOVA'yı takip eden LSD testine göre  $P \leq 0.05$  seviyesinde istatistiksel olarak farklı olmadığını gösterir. SH: Standart Hata

Çizelge 4.11. incelendiğinde yaklaşık 5 hafta süre sonunda elde edilen iyi köklenen sürgünler (1:1) oranında torf ve perlit içeren karışıma transfer edildi ve en yüksek yaşayan regenerant oranı %70 ile Klon-II'de gözlemlendi (Şekil 4.8.). Bitkiciklerin sürgünleri, bu kompostta hızlı bir şekilde büyüdü ve kompostta transferinden 5 hafta sonra her bir bitki en az iki çift yeni yaprak oluşturdu. Alıştırılan bitkicikler, büyüme odasına transfer edildi. Bitki adaptasyonu için geliştirilmiş bu metot tatmin edici oldu. Çünkü büyüme odasında en az (%70) oranında yaşayan bitkiler elde edilmiştir ve 4 ay sonra çalışılan klonlardaki rejenerantların yaşama oranları en az %82 ile Klon-IV'te en fazla %95 ile Klon-II'de elde edildi (Şekil 4.8.).

Bu çalışmalardaki sonuçlara paralel olarak Yıldırım (2012), *in vitro* regenerantların adaptasyonunda transferden 4 hafta ve iki ay sonra sırasıyla % 83.3 ve % 96 gibi yüksek oranda hayatta kalma yüzdeleri rapor etti. Juvenil de olsa bu değişik oranlar, köklendirilen sürgünlerin proliferasyon aşamasında çok uzun bir süre alt kültürdenmesinden kaynaklandığı düşünüldü.



**Şekil 4.8.** 1:1 oranında torf : kum karışımı içeren saksılarda alıştırılan bitkiler: **A)** Büyüme odasında 5 haftalık bir süre sonunda gelişen bitkiler. Bar : 5.5 cm ve **B)** 4 ay sonra gelişen fideler. Bar : 4.8 cm

#### 4.5. İzole Edilen gDNA Miktarlarının Belirlenmesi

6., 9. ve 12. alt kültürlerden alınan yaprak örneklerine ait gDNA miktarları A260/A280 dalga boyunda nanodrop cihazında ölçüldü (Çizelge 4.12).

**Çizelge 4.12.** *P. lentiscus* L. anaç ve klonlarına ait gDNA miktarları

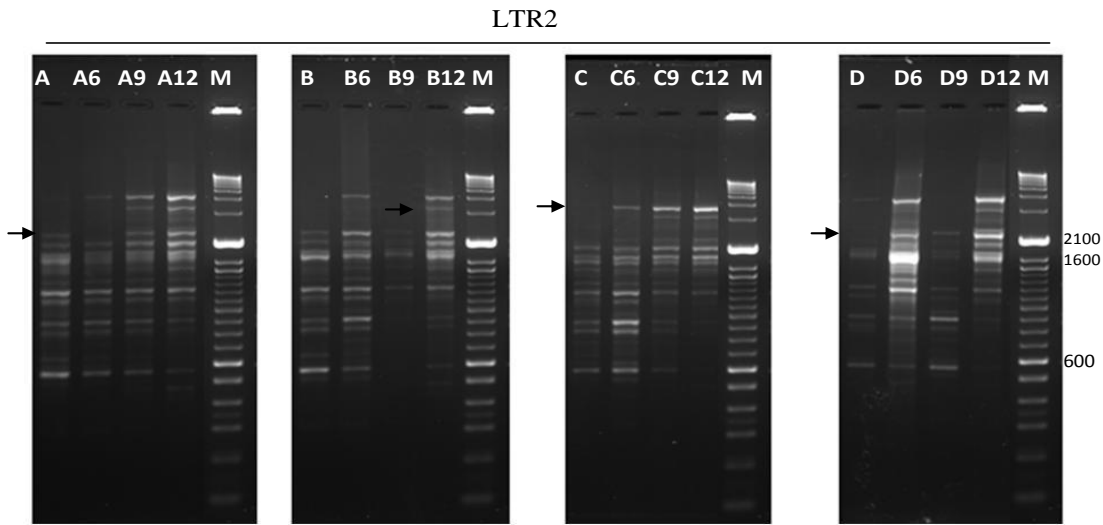
<i>P. lentiscus</i> L. Klonlar	gDNA (ng/μL)
A	100
A6	50
A9	50
A12	50
B	75
B6	50
B9	50
B12	75
C	150
C6	80
C9	75
C12	50
D	120
D6	100
D9	100
D12	50

A: I. Klona ait anaç bitki, A6: I. Klona ait 6 defa alt kültürlenen bitki, A9: I. Klona ait 9 defa alt kültürlenen bitki, A12: I. Klona ait 12 defa alt kültürlenen bitki. B: II. Klona ait anaç bitki, B6: II. Klona ait 6 defa alt kültürlenen bitki, B9: II. Klona ait 9 defa alt kültürlenen bitki, B12: II. Klona ait 12 defa alt kültürlenen bitki. C: III. Klona ait anaç bitki, C6: III. Klona ait 6 defa alt kültürlenen bitki, C9: III. Klona ait 9 defa alt kültürlenen bitki, C12: III. Klona ait 12 defa alt kültürlenen bitki. D: IV. Klona ait anaç bitki, D6: IV. Klona ait 6 defa alt kültürlenen bitki, D9: IV. Klona ait 9 defa alt kültürlenen bitki, D12: IV. Klona ait 12 defa alt kültürlenen bitki.

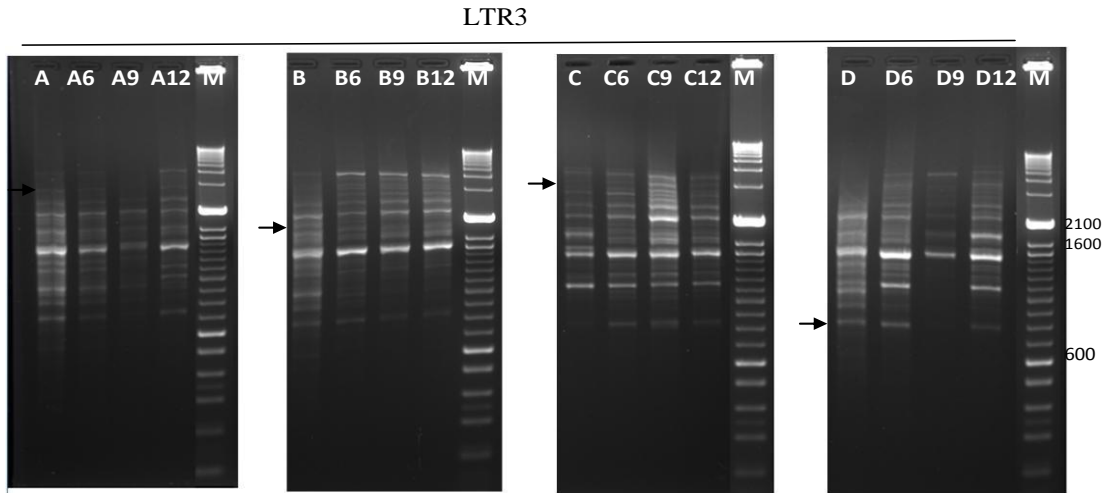
Tüm klonlarda anaç bitki ile kıyaslandığında 6, 9, ve 12. alt kültürlere ait genomik DNA miktarlarında B klonuna ait 12. alt kültür dışındaki örneklerde bir azalma söz konusudur. Kültürde hücrelerin yeniden ve tersine farklılaşması süreci genomda hem kalitatif hem de kantitatif değişikliklere neden olabilir. Ayrıca, hücrenin yeniden programlanması sırasında farklı DNA dizileri amplifiye olabilir veya delesyona uğrayabilir (Lee ve Philips 1988). *In vitro*'da farklı alt kültürlere ait genomik DNA miktarlarındaki bu azalma sözü edilen bu değişimler sonucu ortaya çıkmış olabilir. Ancak, detaylı moleküler çalışmalar ve kromozom analizleri ile doğrulanması gerekir.

#### 4.6. IRAP-PCR Analizleri

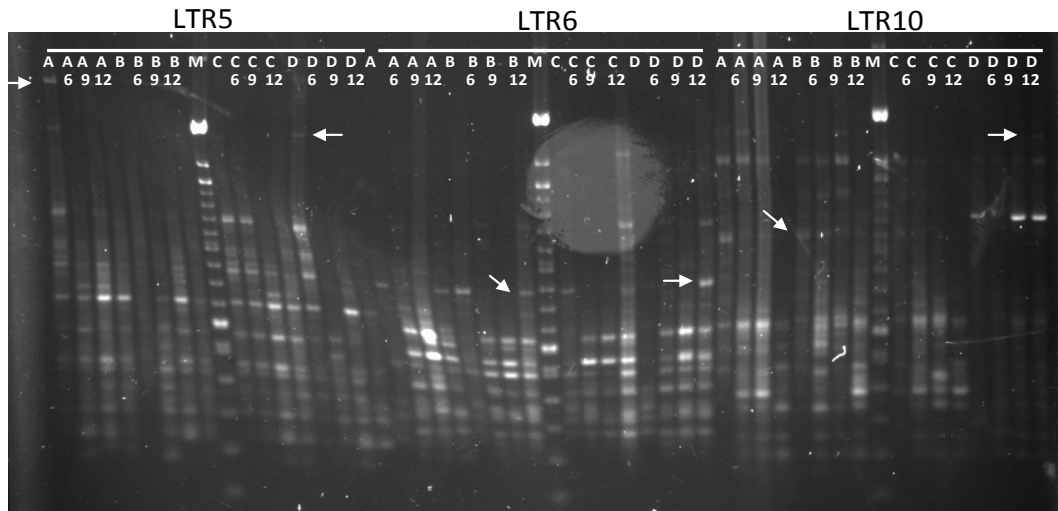
Hem anaç hem de 6., 9. ve 12. alt kültürlerde IRAP-PZR analizleri, 5 farklı LTR primeri (LTR-2, LTR-3, LTR-5, LTR-6 ve LTR-10) kullanılarak gerçekleştirildi ve PZR ürünleri Şekil 4.9-11'de sunuldu.



**Şekil 4.9.** LTR2 primerleri ile elde edilen bant profilleri. M: 100 bç + 1 kb Ladder DNA, A, B, C, D: *P. lentiscus* L. anaç klonları; A6, B6, C6, D6 : A, B, C ve D klonlarının 6 ay altkültürlenmiş bitkileri; A9, B9, C9, D9: 9 ay altkültürlenmiş klonlar; A12, B12, C12, D12: 12 ay altkültürlenmiş klonlar; Oklar polimorfik bantları göstermektedir



**Şekil 4.10.** LTR3 primerleri ile elde edilen bant profilleri. M: 100 bç + 1 kb Ladder DNA; A, B, C, D: *P. lentiscus* L. anaç klon bitkiler; A6, B6, C6, D6 : A, B, C ve D klonlarının 6 ay altkültürlenmiş bitkileri; A9, B9, C9, D9: 9 ay altkültürlenmiş klonlar; A12, B12, C12, D12: 12 ay altkültürlenmiş klonlar; Oklar polimorfik bantları göstermektedir



**Şekil 4.11.** LTR5, LTR6 ve LTR10 primerleri ile elde edilen bant profilleri. M: 100 bç + 1 kb Ladder DNA, A, B, C, D: *P. lentiscus* L. anaç klonlar; A6, B6, C6, D6 : A, B, C ve D klonlarının 6 ay alt kültürlenmiş bitkileri; A9, B9, C9, D9: 9 ay alt kültürlenmiş klonlar; A12, B12, C12, D12: 12 ay alt kültürlenmiş klonlar; Oklar polimorfik bantları göstermektedir

Değerlendirme sonucunda klonlara ait gDNA'ların çoğaltılması sonrası her LTR primeri için oluşan bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm yüzdesi ve PIC değeri ise Çizelge 4.13'de verildi.

#### 4. Bulgular ve Tartışma

**Çizelge 4.13.** *P. lentiscus* L. klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan LTR primer dizileri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilir bant ve polimorfik bant sayısı ve yüzdesi

Primer	Dizi (5'-3')	Oluşan Bant Aralığı (bç)	Oluşan Bant Sayısı	Polimorfik bant sayısı	Polimorfizm (%)	PIC değeri
LTR-2	CTTGCTGG AAAGTGTG TGAGAGG	100-2200	20	14	70.0	0.313616
LTR-3	TGTTAATC GCGCGCTC GGGTGGGA GCA	600-4000	22	11	50.0	0.247159
LTR-5	CTGGCATT TCCATTGT CGTCGATG C	100-1250	17	8	47.1	0.359375
LTR-6	GCATCAGC CTGGACCA GTCCTCGT CC	250-4000	28	13	46.4	0.366587
LTR-10	TGAGTTGC AAGGTCCA GGCATCA	100-1800	22	9	41.0	0.385417
<b>Toplam</b>			109	55		
<b>Ortalama</b>					50.4	0.33125

IRAP reaksiyonları sonucu büyüklükleri 100-4000 bç arasında 109 bant oluştu ve en fazla bant LTR-6 primeri (28) ile en az bant LTR-5 primeri (17) ile elde edildi. Ortalama 21.8 bant elde edildi ve bunlarda %50.4'ü polimorfiktir. LTR-5 için PIC değeri 0.359 iken LTR-6 için 0.367 oldu. Ortalama PIC değeri ise 0.331 olarak hesaplandı.

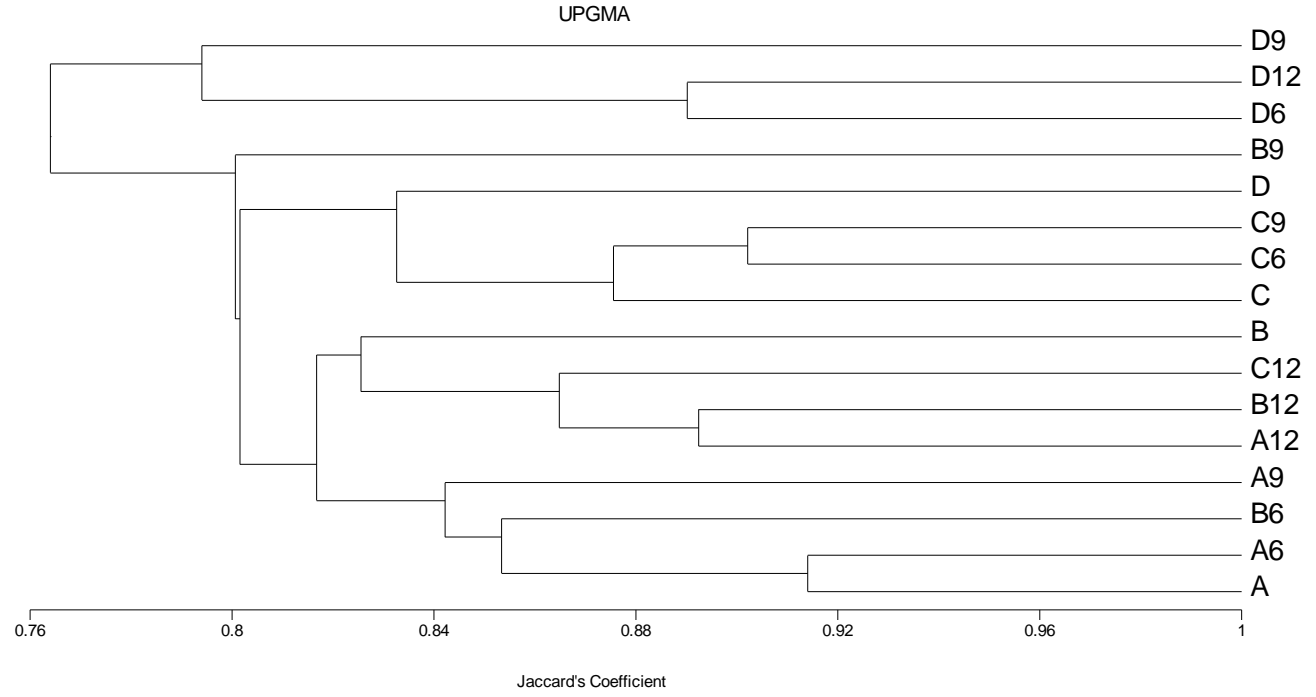
*P. lentiscus* L. klonlarına 'ait jel profilleri sonucu elde edilen benzerlik matriksi (Çizelge 4.14) ve dendogram (Şekil 4.12) irdelendiğinde dendogramda görüldüğü gibi A, B, C, D ve bunların alt kültürlenen bitkileri arasında somaklonal varyasyonların oluşmaya başladığı görüldü. Alt kültürlemeye bağlı olarak özellikle A, B ve her ikisinin klonları uzak dallarda kümelenirken, C, D ve her ikisinin klonları daha yakın dallarda toplandı. Bitkilerin benzerlik katsayıları 0.69' den 0.914' e değişmekte olup ortalama 0.8 olarak hesaplandı.



**Çizelge 4.11.** *P lentiscus* L. klonları arasındaki IRAP analizi ile elde edilen benzerlik matrisi

Similarity matrix																
	A	A6	A9	A12	B	B6	B9	B12	C	C6	C9	C12	D	D6	D9	D12
A	1.000															
A6	0.914	1.000														
A9	0.843	0.860	1.000													
A12	0.780	0.796	0.806	1.000												
B	0.842	0.840	0.777	0.840	1.000											
B6	0.854	0.853	0.824	0.833	0.840	1.000										
B9	0.792	0.789	0.782	0.771	0.796	0.848	1.000									
B12	0.816	0.833	0.824	0.892	0.840	0.872	0.848	1.000								
C	0.872	0.832	0.786	0.776	0.781	0.851	0.806	0.832	1.000							
C6	0.818	0.798	0.808	0.816	0.750	0.835	0.792	0.854	0.892	1.000						
C9	0.786	0.765	0.777	0.840	0.753	0.860	0.835	0.840	0.859	0.902	1.000					
C12	0.775	0.790	0.817	0.884	0.796	0.827	0.784	0.845	0.806	0.828	0.892	1.000				
D	0.794	0.773	0.750	0.755	0.707	0.773	0.766	0.755	0.868	0.813	0.817	0.786	1.000			
D6	0.788	0.786	0.762	0.804	0.811	0.823	0.690	0.804	0.784	0.806	0.755	0.798	0.727	1.000		
D9	0.707	0.722	0.752	0.722	0.691	0.758	0.713	0.722	0.774	0.742	0.745	0.771	0.753	0.766	1.000	
D12	0.786	0.765	0.743	0.784	0.753	0.821	0.722	0.784	0.819	0.786	0.789	0.796	0.742	0.890	0.822	1.000
A	A6	A9	A12	B	B6	B9	B12	C	C6	C9	C12	D	D6	D9	D12	

#### 4. Bulgular ve Tartışma



Şekil 4.12. *P. Lentiscus* L. klonlarının, 5 IRAP primeri ile elde edilen 109 banttandır UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogram

Ana materyal ile klon bitkiler arasındaki benzerliklerin görüldüğü, benzerlik matrisinde (Çizelge 4.14) ve dendogramda (Şekil 4.12)'de benzerlik katsayıları 0.722'dan 0.914'e değişmekte olup, ortalama 0.854 olarak belirlendi.

Bu çalışmada, ana bitki ile bunun *in vitro* koşullara aktarımı ile elde edilen klonlarının 6., 9. ve 12. alt kültürleri arasında somaklonal varyasyonların belirlenmesine yönelik olarak gerçekleştirilen IRAP analizleri sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde, en dikkat çekici varyasyonun Klon-II'de olduğu gözlemlendi. Klon-I, Klon-III ve Klon-IV'e ait ana bitki ve 6., 9. ve 12. alt kültürlerde ise varyasyonun Klon-II'ye kıyasla daha düşük düzeyde olup, klonların genetik olarak nispeten bir araya toplandıkları belirlendi. Ana bitkiye genetik olarak en yakın klonların Klon-I ve Klon-III'e ait 6.alt kültüre (A6, C6) ait olduğu tespit edildi. Ayrıca, Klon-I'in ana bitki ile en uzak alt kültürün 12.alkültür (A12) olduğu belirlendi.

Cinse ait türlerin gDNA izolasyon çalışmalarında, içerdiği polisakkarit ve polifenol bileşikleri izole edilen gDNA'nın yapısına zarar vermektedir (Ramirez ve ark., 2004). Ticari olarak satılan kitler gDNA izolasyonunda başarılı olmakta zorlanmaktadır. Literatür incelendiğinde genel olarak *Pistacia* cinslerine ait türlerin genetik akrabalıklarına yönelik çalışmalara rastlanılmaktadır. Bununla birlikte bu cinsin türlerine ait mikroçoğlatım sonrası genetik kararlılık çalışması bulunmamaktadır. Somaklonal varyasyonların meydana geldiği, farklı bitki türlerinde yapılan çalışmalarda rapor edildi (Rival ve ark. 1998; Sahijram ve ark. 2003; Martins ve ark. 2004). Hareketli (transpozonlar) elementlerin *in vitro* kültürde genetik düzenlenmelerden birinin nedeni olduğu ve doku kültürü koşullarının da bu elementleri aktive ettiği rapor edildi (Hirochika ve ark. 1996; Sato ve ark. 2011).

Tez kapsamında sakız ağacında ilk defa IRAP belirteci kullanılarak yapılan analizde %80 oranında benzerlik bulundu. Ortalama 0.331 PIC değeri klonlar arasında düşük seviyede de olsa polimorfizm gerçekleştiğini gösterdi. Bununla birlikte, PIC değeri>0.5 ise polimorfizm yüksek derecedir, eğer 0.25<PIC<0.5 ise makul bir polimorfizm, eğer ki 0.25>PIC ise zayıf polimorfizm varlığından bahsetmek gerekir (Botstein ve ark., 1980).



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında geliştirilen klonal mikroçoğaltma protokolü, sakız ağacının büyük ölçekte çoğaltılması için ideal bir model olabilir. Sakızın *in vitro* ortamda çoğaltılması geleneksel çoğaltım metotlarına alternatif bir metot olabilir. Çünkü özellikle Klon-II'de, hatta sürgün proliferasyon ortamında kültüre alınan sürgünlerin yaklaşık 1/3'ünün kendiliğinden köklenmesi, klonal mikroçoğaltmanın önemini göstermektedir. Farklı klonların *in vitro* ortamda da olsa büyüme, farklılaşma ve gelişmelerinde çalışmamız kapsamında gözlenen bu farklılıklar, sakız üretimi için kurulacak yeni bahçelerde dikilecek klonal erkek veya dişi hatlardan bazılarının diğerlerine göre daha fazla sakız vereceği aşikardır. Ancak, ornamental bir bitki olan sakız ağacının ülkemizde yok olmuş ormanlarının/bahçelerinin yeniden tesisi ve sakız reçinesi üretimi için bahçelerin kurulması *in vitro* ortamda olgun, kaliteli (aromalı) ve fazla miktarda sakız verdiği bilinen ağaçların rejuvenasyonu için protokollerin geliştirilmesi gereklidir. Bu nedenle, kaliteli ve fazla sakız verdiği bilinen ağaçlardan alınan eksplantlardan, mikroçoğaltım protokolleri geliştirilmesi çalışmalarının yapılması gereklidir. Doku kültüründe oldukça karmaşık olan somoklonal varyasyonun anlaşılması için çok farklı yaklaşımın bir arada ve doğru bir biçimde uygulanmasına ihtiyaç vardır. IRAP gibi tek tip bir moleküler markörün kullanımı *in vitro* üretimde genetik kararlılığın belirlenmesi için yeterli olmayabilir. Bu nedenle, moleküler analizlerin yanısıra morfolojik karakterlerin değerlendirilmesinin yapılması da önemlidir ve bu tip somoklonal varyasyonların belirlenmesine yönelik çalışmalar için tamamlayıcı bir unsurdur.

*Pistacia lentiscus*'da somoklonal varyasyonların belirlenmesine yönelik bundan sonra yapılacak çalışmalar kapsamında birden fazla moleküler markör kullanımının yanısıra morfolojik, sitolojik ve biyokimyasal karakterlerin de dikkate alınması sonuçların güvenilirliği açısından yapılacak çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



## 6. KAYNAKLAR

- Abdelwahed, A., Bouhleb, I., Skandrani, I., Valenti, K., Kadri, M., Guiraud, P., Steiman, R., Mariotte, A.M., Ghedira, K., Laporte F., Dijoux-Franca, M.G., Chekir-Ghedira, L., 2007. Study of antimutagenic and antioxidant activities of Gallic acid and 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose from *P. lentiscus* Confirmation by microarray expression profiling. *Chem. Biol. Interact.*, 165 (1): 1–13.
- Acar, İ. 1988. (*P. lentiscus* L. Var chia.) sakızı üretiminin geliştirilmesine esas olmak üzere sakzın fiziko-kimyasal yönden incelenmesi, Ormancılık Araştırma Ens., Teknik Rap.Ser.No.35.
- Ak, B.E. ve Parlakçı, 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):77-82
- Al-Habbal, M.J., Al-Habbal, Z., Huwez, F.U., 1984. A double-blind controlled clinical trial of mastic and placebo in the treatment of duodenal ulcer. *J. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*, 11: 541–544.
- Al-Said, M.S., Ageel, A.M., Parmar, N.S, Tariq, M. 1986. Evaluation of mastic, a crude drug obtained from *Pistacia lentiscus* for gastric and duodenal anti-ulcer activity. *J. Ethnopharmacol*, 15:271–278
- AL-Saghir, M.G., 2009. Evolutionary History of the Genus *Pistacia*. (Anacardiaceae). *Int. J. Bot.*, 5 (3): 255-257.
- AL-Saghir, M.G., 2010. Phylogenetic Analysis of the Genus *Pistacia* L. (Anacardiaceae) Based on Morphological Data. *Asian J. Plant Sci.*, 9 (1): 28-35.
- AL-Saghir, M.G., Porter, D.M. 2012. Taxonomic Revision of the Genus *Pistacia* L. (Anacardiaceae). *AJPS*, 3 (1): 12-32.
- Andrikopoulos, N.K., Kaliora, A.C., Assimopoulou, A.N., Papapeorgiou, V.P., 2003. Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against *in vitro* LDL oxidation. *Phytother. Res.*, 17 (5): 501–507.
- Anonymous, 1998. The Wealth of India, A Dictionary of Indian Raw Materials and Industrial Products. (Publication and Information Directorate, CSIR, New Delhi.) VIII: 120
- Anonymous. 2005. Turkish Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Directorate of Samsun, Agricultural Products Planning Statistics.

Assimopoulou, A.N. and Papageorgiou, V.P. 2005. GC-MS analysis of penta- and tetracyclic triterpenes from resin of *Pistacia* species. *P. lentiscus* var. Chia. Biomedical chromatography, 1 (19): 285-311.

Bailey, L.H., 1963. How Plants Get Their Names The Standard Cyclopedia Of Horticulture. 13: 9780486207964, 150, New York U.S.A

Balan, K.V., Prince, J., Han, Z., Dimas, K., Cladaras, M., Wyche, G.H., Sitaras, N.M., Pantazis, P., 2007. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated *in vitro* with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. chia. PhytoMed., 14 (4): 263–272.

Benhammou, N., Bekkara, F., A., Panovska, T.K., 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. Afr. J. Pharm. Pharmacol., 22-281.Vol.2, No.2,

Barghchi, M. 1982. *In vitro* propagation of *Pistacia* species. Ph.D. Thesis, Nottingham University, UK, 45.

Barghchi, M., Alderson, P.G., 1983. *In vitro* propagation of *Pistacia vera* L. from seedling tissues. J Hort. Sci. 58:435–445.

Bentley, RY., Trimmen H., 1980. Medicinal plants. In Gardeli et al. (eds) Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtuscommunis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. Food Chem: 1-11.

Barret, P., Brinkman, M., Beckert, M.A., 2006. Sequence related to rice Pong transposable element displays transcriptional activation by *in vitro* culture and reveals somaclonal variations in maize. Genome 49 (13): 99–1407.

Bebb, J.R., Bailey-Flitter, N., Ala'Aldeen, D., Atherton, J.C., 2003. Mastic gum has no effect on *Helicobacter pylori* load *in vivo*. J. Antimicrob. Chemother.52 (3): 522–523.

Bilgin, D.C., 2009. 20 bin sakız ağacı dikecek, Türkiye'yi Yunan'a rakip yapacak. Erişim: <http://hurarsiv.hurriyet.com.tr/goster/ShowNew.aspx?id=12192244>, 15.07.2013.

Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Human Genet. 32: 314–331

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.



- Boztok, Ş., Zeybek, U. 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 (1-4): 189-195
- Calabro, G., Curro, P., 1974. Costituenti degli olii essenziali. Nota IV essenza di lentisco, Estratto da Essenze Derivati Agrumari, 44: 82-92
- Davis, P. H., 1967. *Linum* L. In Davis PH. (ed.) Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Edinburgh, 2: 425-450.
- Dedoussis, G.V., Kaliora, A.C., Psarras, S., Chiou, A., Mylona, A., Papadopoulos, N.G., Andrikopoulos, N.K., 2004. Antiatherogenic effect of *Pistacialentiscus* via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression. Atherosclerosis, 174 (2): 293-303.
- Driver J.A., Kuniyuki A.H. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut *Juglans hindsii* x *Juglans regia* rootstock. HortScience, 19: 507-509.
- Evans, D.A. 1988. Applications of Somaclonal Variation . Biotechnology in Agriculture, 203-223.
- Fascella, G., Airo, M., Zizzo, G.V., Ruffoni, B., 2004. Prime osservazioni sulla coltivazione *in vitro* di Lentisco (*Pistacia lentiscus* L.). Italus Hortus 11(4):141-143.
- Gannoun, S., Lionakis, S.M., Gerasopoulos, D. 1995. Aspects of *in vitro* culture of *Pistacia terebinthus* and *Pistacia vera*. Acta Hort., 419:201-206.
- Golan-Goldhirsh A., Barazani, O., Wang, Z.S., Khadka, D.K., Saunders, J.A., Kostiukovsky, V. 2004. Genetic relationships among Mediterranean *Pistacia* species evaluated by RAPD and AFLP markers. Plant Syst. Evol., 246: 9-18.
- Chryssavgi, G., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, Th., Michael, K. 2008. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L. Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*, 107, 1120-1130.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies Jr. F.T. 1990. Propagation principles and practices. 5th. Edition, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, 647.
- Hao, Y-J, Deng X-X. 2002. Occurrence of chromosomal variations and plant regeneration from long-term-cultured citrus callus. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant*, 38: 472-476.

## 6. Kaynaklar

---

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, 57.

Hirochika, H., Sugimoto, K., Otsuki, Y., Tsugawa, H., Kanda, M. 1996 Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. Proc Natl Acad Sci USA, 93: 7783–7788

Hirochika, H. 1993. Activation of tobacco transposons during tissue culture. EMBO J, 12: 2521-2528.

Huwez, F.U., Thirwell, D., Cockayne, A., Ala'Alden, DAA. 1998. Mastic gum kills *Helicobacter pylori*. New England Journal of Medicine 339:1946.

İsfendiyaroğlu, M., 1994. Bazı dış mekan süs bitkileri yeşil çeliklerinin köklenmelerine çeşitli faktörlerin etkileri üzerine araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, E.Ü.Z.F. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova, 59.

İsfendiyaroğlu, M., 2000. Cutting Propagation of Mastic Tree (*Pistacia lentiscus* var. Chia Duham.). NUCIS Newsletter, 9: 42-44.

Joley, L.E., Opitz, K.W. 1971. Further experiments with propagation of *Pistacia*. Proc. Inter. Plant Prop. Soc., 21: 67-76.

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

Kafkas, S., Kafkas, E., Perl-Treves, R., 2002. Morphological Diversity and a Germplasm Survey of Wild *Pistacia* Species in Turkey. Genet. Resour. Crop Ev., 49 (3): 261-270.

Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Suoniemi, A., Schulman, A.H. 1999. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. Theor Appl Genet., 98: 704–711.

Kaliora, A.C., Stathopoulou, M.G., Triantafillidis, J.K., Dedoussis, G.V., Andrikopoulos, N.K., 2007. Chios mastic treatment of patients with active Crohn's disease. World J. Gastroenterol., 13 (5): 748–753

Katsiotis, A., Hagidimitriou, M., Drossou, A., Pontikis, C., Loukas, M. 2003 Genetic relationships among species and cultivars of *Pistacia* using RAPDs and AFLPs. Euphytica, 132: 279–86.

Kaya, E. 2011. Kekik (*Thymus vulgaris* L.) Bitkisinin *in vitro* Doku Kültürü Yöntemleriyle Mikroçoğaltımı ve Tek Aşamalı Dondurma Yöntemleriyle Kriyoprezervasyonu Doktora Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze, 201.

Kılınç, F.M., Suzerer, V., Çiftçi, Y.Ö., Koç, İ., Akdemir, H., Yıldırım. H., Tilkat, E., Onay, A. 2013. Improved Shoot Multiplication of lentisk (*pistacia lentiscus* l.) *In vitro* Using Different Carbohydrates and Medium Strengths. VI. International Syposium on Almonds and Pistashios, Spain/Murcia, 130.

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.

Larkin, P., Scowcroft, W. 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theoretical and Applied Genetics, 60: 197-214.

Lee, M., Phillips, R.L. 1988. The Chromosomal basis of somaclonal variation. Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology, 39 :413-437.

Loughlin, M.F., Ala'Aldeen, D.A., Jenks, P.J. 2003. Monotherapy with mastic does not eradicate *Helicobacter pylori* infection from mice. *J. Antimicrob. Chemother.*, 51(2): 367–371.

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.

Magiatis, P., Melliou, E., Skaltsounid, AL., Chinou, IB., Mitaku, S., 1999..Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. chia. *Plant Med.*, 65: 749-752.

Marone, P., Bono, L., Leone, E., Bona, S., Carretto, E., Perversi, L., 2001. Bactericidal activity of *Pistacia lentiscus* mastic gum against *Helicobacterpylori*. *J. Chemother.*, 13 (6): 611–614.

Martins, M., Sarmiento, D. and Oliveira, M.M. 2004. Genetic stability ofmicropropagated almond plantlets as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Reports* 23 (7): 492-49

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

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

Mattia, C., Bischetti, G.B., Gentile, F., 2005. Biotechnical characteristics of root systems of typical Mediterranean species *Plant Soil.*, 278 (1-2): 23-32.

Mitchell, J.D., and S.A., Mori. 1987. The cashew and its relatives (Anacardium: Anacardiaceae). *Mem, NY Bot. Gard.* 42: 1-76.

Moussaieff, A., Fride, E., Amar, Z., Lev, E., Steinberg, D., Gallily, R., Mechoulam, R., 2005. The Jerusalem Balsam: from the Franciscan Monastery in the old city of Jerusalem to Martindale 33. *J Ethnopharmacol*, 101 (1-3) 16-26.

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

Mujib, A., Banerjee, S., Dev Ghosh, P. 2007. Callus induction, somatic embryogenesis and chromosomal instability in tissue culture raised hippeastrum (*Hippeastrum hybridum* cv.). *Propagation of Ornamental Plants*, 7:169-174. United Nations

Mulas, M., Albentino, P., Brigaglia, N., 1998. Evaluation of *Pistacia lentiscus* L. genetic resources to select ecotypes having high efficiency in the colonisation of marginal lands. *Acta Hort.*, 457: 279-286.

Nicotra A. B., Chazdon R. L., Montgomery R. A., (2003). Sexes Show Contrasting Patterns of Leaf and Crown Carbon Gain In a Dioecious Rainforest Shrub. *Am. J. Bot.*, Vol.90 No.3, pp.347-355.

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

Onay A., Jeffree C.E., Yeoman M.M. 1996. Plant regeneration from encapsulated embryoids and an embryogenic mass of Pistachio. *Plant Cell Rep.* 15: 723-726.

Onay, A., 2000. Micropropagation of pistachio from mature trees. *Plant Cell Tiss. Org.*, 60, 159–162.

Ozden-Tokatli Y, Ozudogru, E.A., Akcin, A. 2005. *In vitro* response of pistachio nodal explants to silver nitrate. *Sci. Hortic.* 106: 415–426.

Parfitt, D., Badenes, E., M. L., 1997. Phylogeny of the Genus *Pistacia* as Determined from Analysis of the Chloroplast Genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 7987-7992, Vol.94, No.15, USA.

- Parlak, S., Akbin, A.N., 2008. Sakız (*Pistacia lentiscus* var. Chia)'nın Aşılama Yoluyla Çoğaltılması. Çevre ve Orman Bakanlığı Araştırma Projesi, proje no: 15.2110: 2008-2010
- Palevitch, D., Yaniv, Z., 2000. Medicinal Plants of the Holy Land. Modan Publishing House, In Ljubuncic et al. (eds) The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. J. Ethnopharmacol, 198–204. Tel Aviv, Israel.
- Palli, E. M., Aronne, G., 2000. Reproductive cycle in Southern Italy of *Pistacia lentiscus* (*Anacardiaceae*). Plant Biosyst., Vol.134 365-371, No.3. Italy
- Perikos, J., 1993. The Chios Gum Mastic. Print All Ltd. Athens, Greece 95.
- Pignatti, G., Crobeddu, S. 2005. Effects of rejuvenation on cutting propagation of Mediterranean shrub species. Foresta 2: 290-295
- Pierick, RLM. 1987. In vitro culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 50: 225–227.
- Pontikis, C.A. 1984. *In vitro* propagation of *Pistacia terebinthus* L. Plant Propagator 30:14–15.
- Prada, M. A., Arizpe, D., 2008. *Pistacia lentiscus* L. In:Riparian tree and shrub propagation handbook. Page, 90-93.
- Quoirin, M. and Lepoivre, P., 1977. Étude des milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. Acta Hortic. 78: 437–442 French.
- Ramirez, I.M., Rodriguez, N.N., Valdez-Infante, J., Capote, M., Becker, Dand Rohde, W. 2004. Isolation of Genomic DNAs from tropical fruit trees avocado, coconut, guavo and mango for PCR-based DNA marker application, Cultivos Tropicales, 25: (1) 33-38.
- Rival, A., Bertrand, L., Beule, T., Combes, M.C., Trouslot, P., Lashermes, P. 1998. Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq), Plant Breed, 117 :73-76.
- Sahijram, L, Soneji, J.R, Bollamma, K.T. 2003. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas. *Musa* spp. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant., 39: 551-556.
- Sanz, M.J., Terencio, M.C., Paya, M. 1998. *In vivo* hypotensive activity of *Pistacia lentiscus* L. Phytotherapy Research, 2:201–202.
- Sato, M., Hosokawa, M., Doi, M. 2011. Somaclonal Variation Is Induced De Novo via the Tissue Culture Process: A Study Quantifying Mutated Cells in Saintpaulia. Plos One. 6 (8): 323-541.

## 6. Kaynaklar

---

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

Skirvin, R.M., Norton, M., McPheeters, K.D. 1993. Somaclonal variation:has it proved useful for plant improvement Acta Horticulturae; (336) 333–340.

Skirvin, RM, McPheeters, K.D., Norton, M. 1994. Sources and frequency of somaclonal variation. HortScience; 29: 1232-1237.

Stevens, P. F., 2008. Angiosperm Phylogeny. Erişim: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/Apweb>, 15.07.2013.

Süzerer, V. 2013. Mikroşılanan 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.

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.

Tilkat, E., Iřıkalan, Ç., Onay, A. 2005. *In vitro* propagation of khinjuk pistachio (*Pistacia khinjuk* stocks) through seedling apical shoot tip culture. Propagation of Ornamental Plants 5 (3): 124–128.

Tounes, M., Abdennour, C., Houaine, N., 2008. Influence of *Pistacia Lentiscus* Oil on Serum Biochemical Parameters of Domestic Rabbit *Oryctolagus Cuniculus* in Mercury Induced Toxicity. Eur. J. Sci. Res., 24 (4): 591-600.

URL-1: 22:43. Data from Chios Mastiha Producers Association: <http://www.investingreece.gov.gr/default.asp?pid=127&nwslID=3&sec=9&la=1>, 10.06.2013.

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

Verdu, M., Garcia –Fayos, P., 2002. Ecologia reproductiva de *Pistacia lentiscus* L. (*Anacardiaceae*): anacronismo evolutivo en el matorral mediterranes. Rev. Chil. Hist. Nat., 75(1): 57-65

Viola, F., Forieo, L.R., Coccozza, M.A. 2004. Propagazione agamica di alcune specia della macchia mediterranea. Italus Hortus 11: 186-1

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407–4414.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Liva, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid Res.*, 18: 6531-6535.

Yeoman, M. M. 1993. *Lecture Notes for plant Physiology.*

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

Zeitkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. 1994. Genome finger printing by simple sequence repeat (SSR) anchored PCR amplification. *Genomics* 20:176-183.

Zohary, M. 1952. A Morphological study of the genus *Pistacia*, *Palaestine Journal of Botany, Jerusalem Series*, 5(1):187-228.

Wannan, B.S., C.J. Quinn,. 1991. Floral structure and evolution in the Anacardiaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 107: 349-385 .

Wellmann, M., (Ed.), 1907. *Pedanii Dioscuridis Anazarbei de materia medica libri quinque*, vol. 1. Weidmann, Berlin.

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

## **ÖZGEÇMİŞ**

1984 yılında Kahramanmaraş'ta doğdu.

İlk ve orta öğrenimini 1998 yılında,

Lise eğitimini de 2001 yılında tamamladı.

2005-2009 yılları arasında Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisansını,

2011- 2013 yılları arasında Dicle Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisansını tamamladı.