

SAKIZ AĞACI (*Pistacia lentiscus* var. *chia* Duhamel)'NİN IN VITRO MİKROÇOĞALTIMI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Tuncer TAŞKIN

Abdullah İNAL

**Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü
P.K.9 35661 Menemen-İzmir/TURKEY**

ÖZ: Bu çalışmada, ülkemizde sayısı giderek azalan Sakız ağacı (*Pistacia lentiscus* L. var. *chia*)'nin apikal sürgün uçları *in vitro* koşullarda farklı hormon konsantrasyonları içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) ve B5 (Gamborg ve ark., 1968) DKW (Driver ve Kuniyuki, 1984) ortamları orijinal ya da modifikasyonlar yapılarak ve antioksidantlar ilave edilerek hazırlanan ortamlarda kültüre alınmışlardır. Yaşlı ağaçlar ve genç fidanlardan alınan materyalde fenolik bileşiklerin etkisinden dolayı gelişebilir özellikte rejenerasyon sürgün veya organojenez oluşmamıştır.

Anahtar Sözcükler: Sakız ağacı, *Pistacia lentiscus* L., bitki doku kültürleri, sürgün-ucu kültürleri.

THE RESEARCHES ON IN VITRO MICROPROPAGATION OF MASTIC TREE (*Pistacia lentiscus* var. *chia* Duhamel)

ABSTRACT: In this study, apical shoot-tips of mastic trees whose number in Turkey gradually decreases were taken to the *in vitro* culture in original and some modified media of MS (Murashige ve Skoog, 1962), Gamborg B5 (Gamborg ve ark., 1968) and DKW (Driver ve Kuniyuki, 1984). Various antioksidants were also added to some of the media used in the study. Explants of aged and young trees did not form regenerated shoot or organogenesis because of phenolic compounds.

Keywords: Mastic tree, *Pistacia lentiscus* L., plant tissue culture, apical shoot-tip cultures.

GİRİŞ

Sakız ağacı (*Pistacia lentiscus* L.) ülkemizde, Akdeniz ve Ege bölgelerinde doğuda ise Hatay'a kadar maki vejetasyonu içerisinde yayılış gösterir. Dünya'da ise, Mısır ve Sina yarımadası dışında bütün Akdeniz ülkeleri ve batıda Kanarya Adalarına kadar deniz seviyesinden 500 m'ye kadar varan yükseklikte sahil bölgelerindeki maki formasyonunda doğal yayılışa sahiptir (Zohary, 1952; Davis, 1966). *P. lentiscus*'un yayılış alanı oldukça geniştir, ancak sakız üretimi sadece Sakız Adası'nın güneydoğu kesimleri ve bu bölgenin tam karşı sahilinde bulunan çeşme ilçesinde belirli

yörelere yer alan *P. lentiscus* var. *chia*'nın erkek ağaçlarından elde edilmektedir (Acar, 1988).

Sakız ağacı'nın gövde ve dallarından yaralama ile "Mastik" adı verilen ve bileşiminde rezin ve uçucu yağ (% 1-2) taşıyan damla sakızı elde edilir (Baytop 1984). Sakız ağacından elde edilen sakız birçok amaç için kullanılmaktadır. Bunlar arasında doğal çiklet olarak, içkilere aroma vermek, sakız yağı elde etmek, parfüm yapımı, diş macunu yapımı, cila yapımı, gıda sanayii ve tıbbi amaçlar sayılabilir (Karakır ve İsfendiyaroğlu, 1993). Ekonomik anlamda sakız üretimi sadece ağaç formundaki var. *chia*'dan elde edilmektedir. *Chia*'yı diğer yabancı sakızlardan ayıran en önemli özellik, sahip olduğu ağaçsı büyüme karakteridir (Browicz, 1987). Ülkemizde çok az sayıda Çeşme ve Alaçatı da ağaç formunda sakız ağacı bulunmakta ve sakız ihtiyacının tamamı Yunanistan'dan karşılanmaktadır.

Yakın geçmişe kadar Çeşme yarımadasının belli yörelerindeki plantasyonlardan damla sakızı üretimi yapılırken, son yıllardaki yoğun yapılaşma nedeniyle mevcut sakız ağacı varlığı yok olma tehlikesi altına girmiş ve sakız üreticiliği ekonomik bir uğraş olmaktan çıkmıştır (İsfendiyaroğlu 1999). Bu nedenle, sakız ağacının *in vitro* üretim imkanlarının araştırılması, hem hızlı bir şekilde sağlıklı fidan üretimini, hem de bu bitkinin genetik olarak muhafazasına da olanak sağlayacaktır.

Sakız ağacının geleneksel çoğaltma yöntemi, kalın dallardan hazırlanan 50-100 cm boyundaki çeliklerin kış aylarında doğrudan plantasyon kurulacak alana dikilmesine dayanmaktadır. Bu yöntemde hem köklenme uzun sürmekte, hem de başarı oranı düşük olmaktadır (Browicz 1987; Acar 1988). Bu güne kadar sakız ağacının gerek çöğür gerekse doğadaki yabancı bireyler üzerine aşılama çalışmaları da herhangi bir olumlu sonuç alınmamıştır (Whitehouse, 1957; Acar, 1988). Sakız ağacının *in vivo* çelikle üretilmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda; Hepcan (1992), çeliklerde köklenmenin başarısız olduğunu bildirmiştir. İsfendiyaroğlu (1999) ise, sakız ağacının bir yıllık sürgünlerinden hazırladığı çelikleri değişik hormon kombinasyonları ile muamele ederek sisleme metoduyla köklendirmiş ve şubat ayında aldığı çeliklerde en yüksek, diğer aylarda ise daha düşük düzeyde köklenme olduğunu ifade etmiştir.

Yapılan literatür taramalarında sakız ağacının *in vitro* çoğaltılması ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bitkinin bulunduğu *Pistacia* cinsindeki diğer türler ile ilgili *in vitro* üretim çalışmaları vardır. *Pistacia vera* (Antep fıstığı)'da Barghchi ve Alderson (1983), Barghchi ve Martinelli (1984), Barghchi ve Alderson (1985), Barghchi (1985a), Martinelli (1988), Abousalim (1990), Yücel ve ark. (1991), Mederos and Trujillo (1994), Taşkın ve ark. (1996a, 1996b), Onay ve ark (1995) ve

Onay (1996, 2000), *Pistacia integerrima*'da ve *Pistacia atlantica*'da Martinelli (1988) ve Abousalim (1990), *Pistacia terebinthus* (Menengiç)'da Pontikis (1985) *in vitro* üretim yapmışlardır. Mederos ve ark. aynı zamanda *Pistacia vera* ve *Pistacia atlantica*'da *in vitro* sürgünlerde kahverengileşmenin eliminasyonu ile ilgili (Mederos ve Trujillo, 1999) ve *Pistacia atlantica*'nın *in vitro* kültüre alınmasında besin ortamının etkilerini araştırmışlardır (Mederos ve ark., 1997).

Pistacia türleri ile ilgili yapılan *in vitro* çalışmalarda bitki çoğaltımı için eksplant olarak 10-12 günlük fide ve 1-4 yaş arası ağaçlardan alınan sürgün uçları ve nod tomurcuk segmentleri kültürün başlatılması için kullanılan ana eksplant kaynakları olmuştur (Barghchi ve Alderson, 1983; Barghchi, 1985a; Barghchi ve Alderson, 1985; Pontikis, 1985; Yücel ve ark., 1991; Taşkın ve ark., 1996a).

Meristem uçları aynı zamanda olgun ağaçlardan alınan eksplantlarda incelenmiştir (Barghchi ve Martinelli, 1984; Barghchi, 1985a; Onay, 2000). Nod tomurcuk segmentleri kültürü ile sürgün ucu kültürleri karşılaştırıldığında, sürgün ucu kültürlerinin apikal dominansı yönünden daha güçlü oldukları gözlenmiş ancak bu fark devamındaki alt kültürlerde ortadan kalkmıştır (Barghchi, 1985b; Barghchi ve Alderson, 1985).

Pistacia türlerinin *in vitro* çoğaltımı genellikle apikal ve aksillar tomurculardan çok sayıda sürgün gelişimi ve büyümeyi teşvik etmeyle başarılıdır. Murashige ve Skoog besin ortamı ve modifikasyonları *P. vera*'da sürgün gelişimi için kullanılmıştır (Barghchi ve Alderson, 1983; Barghchi ve Alderson, 1985; Yücel ve ark., 1991; Taşkın ve ark., 1996a). Martinelli (1988) *P. integerrima*, *P. atlantica* ve *P. vera* sürgün çoğaltılması için MS besin ortamlarını ve modifikasyonlarını kullanmıştır. Pontikis (1985), *P. terebinthus*'da sürgün çoğaltımı için Anderson'un makro ve mikro elementleri formülünü kullandığını bildirmiştir.

Mederos ve ark.'nın (1999) bazı *Pistacia* türlerinin (*Pistacia vera* cv. *mateur* ve *Pistacia atlantica*) 1-2 aylık sürgünleri üzerindeki apikal ve nodal tomurcukların *in vitro* kültür tesisi üzerinde yaptıkları araştırmalarda Murashige ve Skoog, Quirn & Lepouvre gibi ortamlarda modifiyeler yaparak kullanmışlar ve farklı antioksidant kimyasalları kullanarak, eksplant nekrozisi ve eksplantlardan ortama salınan fenolik bileşikleri önlemeye çalışmışlardır. Çalışmalarında kullandıkları birçok antioksidant kimyasal (glutathion, askorbik asit, sitrik asit, PVP, Na-DEDC, Rosmanol) sürgün gelişimi, sürgün uzunluğu ve eksplant nekrozisi ve kahverengileşmesini önleyememiştir. Ancak L-sistein kullandıkları ortamlarda *Pistacia vera* cv. *mateur*'da bir miktar gelişme sağlayabilmişlerdir. *Pistacia atlantica* da ise hiçbir gelişme sağlayamamıştır. Aynı araştırmadaki çalışmaların devamında ise aktif karbonlu ortam kullanılmış ve her iki türde de gelişme sağlanmıştır.

Bu çalışmada, ülkemizde giderek azalan sakız ağacının *in vitro* çoğaltılması ve sakız elde edilen ana bitkilerle aynı genetik yapıya sahip, rejenere fidelerin elde edilmesini sağlayacak bir kültür ortamı ve hormon konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Sakız ağacı (*Pistacia lentiscus* L.) Anacardiaceae familyasına ait *Pistacia* cinsi içinde yer almaktadır. Doğada 1-4 m'ye kadar boylanabilen, çalı veya ağaççık formunda görülen ve yaprağını dökmeyen herdem yeşil, dioik bir bitkidir.

Bu çalışmada, İzmir'in Çeşme ilçesine bağlı Alaçatı' da bulunan Sakız Ağacı Koruma Alanı'nda yer alan olgun (Şekil 1a) ve 3-4 yıllık genç fertlerin (Şekil 1b) bulunduğu üreticilere ait sakızlıklarda bulunan sakız ağaçlarının, apikal ve aksillar tomurcukları ve sürgün uçları bitkisel materyal olarak kullanılmışlardır.



Şekil 1. İzmir'in Çeşme ilçesine bağlı Alaçatı'da bulunan (a) Sakız ağacı koruma alanında yer alan yaşlı sakız ağaçları, (b) 3-4 yıllık genç fertlerin bulunduğu üreticilere ait sakızlıklarda bulunan sakız ağaçları.

Figure 1. *Pistacia lentiscus* L.var chia growing at Alaçatı, in the Çeşme district of İzmir (a) adult mastic trees in the protection area of mastic tree, (b) 3-4-years-old juvenil mastic trees at the mastic garden that belong to producers.

Bitkisel materyal kültüre alma işlemlerinden bir gün önce Alaçatıya gidilerek materyal olarak kullanılacak kısımları içeren 10-15 cm uzunluğundaki yapraklı çelikler halinde alınıp perlit ortamına yerleştirilmiş ve su kaybını engellemek için üzerleri nemli bezlerle yada naylon ile örtülerek enstitüye getirilmiştir.

Metot

Bu araştırmada, metot olarak bitki doku kültürü teknikleri kullanılmış ve temel ortam olarak Murashige ve Skoog (1962), Gamborg B5 (1968) ve DKW (Driver ve Kuniyuki, 1984) ortamları orijinal ya da bazı modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır. Bu temel ortamlara sürgün oluşturmak için gerekli hormonlar, vitaminler, fenolik bileşiklerce eksplantların ve ortamın siyahlaşmasını önlemek için askorbik asit karbon kaynağı olarak sakkaroz (30 g/l) ve katılaştırma ajanı olarak da agar (7-8 g/l) ilave edildikten sonra pH 5,7-5,8'e ayarlanmış ve tüplere (her bir konsantrasyon için 20 tüp hazırlanmıştır) bölüştürülerek 121°C'de 20 dk süreyle sterilize edilmiştir.

Eksplant sterilizasyonu ve Kültüre alma işlemleri

Laboratuvara getirilen bitkisel materyal önce çeşme suyu altında yarım saat yıkandıktan sonra sterilizasyon işlemlerine maruz bırakılmışlardır. Sakız ağacına ait apikal sürgün ucu eksplantları *in vitro* kültüre alınmadan önce Laminar Flow Kabin içerisinde % 96'lık etil alkolde 40-60 sn ve farklı konsantrasyonlarda NaOCl (%0, 10, 15, 20) içeren çözeltilerde 20 dk süreyle çalkalanmış ve ardından 5 defa steril saf suyla durulanmıştır. *In vitro* kültüre alınma ortamı olarak 1 mg/l BAP+0,5 mg/l NAA içeren MS ortamları kullanılmıştır. 10 gün sonra eksplantlar da enfeksiyon oranları gözlenmiştir.

Mart 2002 ortalarında, aşağıda verilen ortamlarda kültüre alma işlemlerine başlanmıştır.

- MS orijinal ortam + MS vit+BAP (0:1:2:4 mg/l)
- MS + Gamborg B5 vitaminleri + BAP (0:1:2 4 mg/l)
- Gamborg B5 orijinal ortam + BAP (0:1:2:4 mg/l)
- MS orijinal ortam+MSvit.+ Askorbik asit (50 mg/l) + BAP (0:1:2:4 mg/l)

Hazırlanan bu ortamlarda yaşlı ağaçlardan ve genç fidanlardan alınan 1,5-2 mm uzunluğunda, sürgün ucu eksplantları yerleştirilerek farklı temel ortamlarda BAP konsantrasyonlarının etkisi araştırılmıştır.

Ekim ayı başlarında yapılan bir diğer çalışmada ise temel ortam olarak MS + Gamborg B5 vitaminleri, Gamborg B5 orijinal ortam ve DKW (Driver ve Kuniyuki) orijinal ortamı kullanılmıştır. Bu ortamlara karbon kaynağı olarak 30 g/l sakkaroz, 8 g/l agar, bitki büyüme düzenleyicisi olarak tüm ortamlara 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA₃ eklenmiştir. Daha sonra fenolik maddelerin etkisini azaltmak ve eksplant kararmasını

önlemek için farklı kimyasallarla uygulamalar yapılmıştır. Bu uygulamalar aşağıda verilmiştir:

- Besin ortamlarına 15 mM Ag NO₃ ilave edilmesi,
- Besin ortamlarına 50 µM L-Cystein ilave edilmesi,
- Eksplantları 100 µM L-Cystein çözeltisinde 15 dakika ıslatma,
- Besin ortamlarına 1 g/l aktif kömür ilave edilmesi (agar 10 g/l kullanılmış ve 8 gün karanlık inkubasyondan sonra 16/8 fotoperiyota transfer yapılmıştır).

Kültüre alınan eksplantlar 3000 lux floresan ışığı ile 16 saat fotoperiyotta ve 25±2 °C ye ayarlanmış kültür odalarında gelişmeye bırakılmışlardır.

Denemeler faktöriyel düzende tesadüf parselleri deneme desenine ve uygulamalara göre her bir ortam için 10 tekerrürlü ve 2 tekrarlı olarak kurulmuştur. Farklı konsantrasyonlardaki büyüme hormonlarının, kültüre alınan eksplantlar üzerinde;

- eksplant ve ortam kararması var veya yok şeklinde değerlendirilmiştir ve % oranı verilmiştir.
- canlılık, var veya yok şeklinde değerlendirilmiştir ve % oranı verilmiştir.
- sürgün uzunluğu , ortalama sürgün uzunluğu şeklinde değerlendirilmiştir.

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS paket programı kullanılarak ortalama değerler ve standart hatalar analiz edilmiştir.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sakız ağacına ait sürgün ucu eksplantları *in vitro* kültüre alınmadan önce farklı konsantrasyonlarda NaOCl (% 0, 10, 15, 20) içeren çözeltilerde yüzey sterilizasyonunun ardından kültüre alınmanın 10. gününden sonra eksplantlarda gözlenen enfeksiyon oranı Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1'den de anlaşılacağı gibi % 20 NaOCl konsantrasyonu eksplantlarda görülen enfeksiyon oranını, eksplantlarda % 30'a düşürmüştür. Ancak canlılık oranı % 15 NaOCl konsantrasyonunda biraz yüksek olmuştur. Olgun *Pistacia*'lar da bakteriyel ve fungal problemlerin yok edilmesi büyük bir sorundur (Bustamante-Garcia 1984; Abousalim, 1990). Barghchi ve Alderson (1983) sera da yetişen 6 aylık *Pistacia vera* fidelerinden alınan eksplantlarda % 15'lik Domestos çözeltisi ile 15 dk sterilizasyon yapmıştır. Abousalim (1990), 30 yaşlı *Pistacia vera* ile yaptığı tomurcuk eksplant çalışmalarında % 24 Chlorox 20 dk sterilizasyonda yüksek oranda canlılık elde etmiş, fakat devamında gelişme oranında düşüşler,

vitrifikasyon ve kloroziste artışlar gözlemiştir. *Pistacia vera* ile yapılan çalışmalarda Onay (1996) *P. vera* için eksplant sterilizasyonunda % 10'luk H₂O₂ uygulamasının ardından % 20 NaOCl ile 20 dk uygulamayı etkili bulmuştur. Onay (2000) bir başka çalışmasında olgun *P. vera*'larda yeni oluşan axillar tomurcuk sürgünlerinde % 20'lik NaOCl (klorin miktarı % 10-15) ile 10 dk uygulamıştır. Bu çalışmada % 15-20 NaOCl çözeltilisinde 20 dk. sterilizasyon tercih edilmiştir.

Çizelge 1. Ocak 2001 sonlarında sakız ağacı apikal sürgün ucu eksplantlarının enfeksiyon oranına NaOCl etkisi (Temel ortam MS, 1 BAP+0,5 NAA).

Table 1. The effect of NaOCl at the enfektion rate of apical shoot-tip explants of mastic tree, at the end of 2001 January (Basal medium MS, 1 BAP+0,5 NAA).

NaOCl uygulama NaOCl application (20 dk)	Eksplant kararması Explant browning (%)	Enfeksiyon oranı Infection rate (%)	Canlılık Vigorty (%)
NaOCl % 0		100,0	
NaOCl % 10	100,0	80,0	0
NaOCl % 15	75,0	50,0	33,3
NaOCl % 20	71,4	30,0	28,6

Mart 2002 ortalarında yaşlı ağaçlardan ve genç fidanlardan alınan 1,5-2 mm uzunluğundaki sürgün ucu eksplantlarından elde edilen sonuçlar Çizelge 2'de verilmiştir.

Pistacia türlerinde yapılan çalışmalarda genelde farklı BAP konsantrasyonlarında optimum sürgün gelişimi ve çoğaltımı sağlanmıştır. Çok sayıda sürgün üretimi için 6-Benzilamino purin (BAP)'li ortam, Kinetinli ortama göre daha etkili olduğu belirlenmiş ve 4 mg/l BAP'in *P. vera*'da fide eksplantlarından sürgün elde etme için optimum bulunmuştur (Barghchi ve Alderson, 1983). Martinelli (1988) 4 ay-4 yaş arası *Pistacia* materyallerini düşük BAP konsantrasyonlarında kullanmış ve *P. integerrima* için 1 mg/l BAP, *P. atlantica* için 0,7 mg/l BAP ve *P. vera* için 2 mg/l BAP değerlerini en iyi gelişme konsantrasyonları olarak bulmuştur. Abousalim (1990), sürgün oluşumu için *P. vera*'da 4 mg/l BAP ve *P. atlantica*'da ise 1 mg/l BAP değerlerinin optimum olduğunu belirtmiştir. Yine Taşkın ve ark. (1996 a) *P. vera* cv. Siirt için en iyi gelişme ve sürgün çoğaltımının 2 mg/l BAP değerlerinde gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Pontikis (1985) düşük BAP konsantrasyonunu (2,5 mg/l) *P. terebinthus*'un olgun ağaçlarından alınan sürgün uçlarında kullanmıştır. Onay (1996) *P. vera* fide materyal eksplantlarında 3 mg/l BAP konsantrasyonlarının en iyi sonucu verdiğini belirtmiştir. Aynı araştırmacı, *P. vera*'nın 30 yıllık olgun ağaçlarından aldığı aksillar tomurcuklardan sürgün çoğaltılmasında ise en iyi sonucun

ilk 30 günde 4,4 µM BAP, alt kültürlerden sonra ise 8,8 µM BAP değerlerinde meydana geldiğini rapor etmiştir (Onay, 2000). Barghchi ve Alderson (1983, 1985) 4 mg/l BAP içeren ortamlarda alt kültüre almayla *P. vera* fide materyalinde ve 1–4 yaş arası bitkilerde 35–40 sürgün elde etmişlerdir. *Pistacia vera*'da kallus kültürlerinden adventif sürgünlerin elde edilmesi, Barghchi ve Alderson (1989) tarafından cv. Ohadi'nin nodal tomurcuk eksplantlarından gerçekleştirilmiştir.

Onay (2000), MS+Gamborg vitaminleri kullanarak 4,4 µM BAP ilave ettiği ortamlarda olgun ağaç sürgün ucu eksplantlarında sürgün oluşturduğunu bildirmiştir. Onay (1996) *P. vera*'da MS ortamının sürgün sayısı ve uzunluğu açısından Gamborg B5 ortamından daha etkili olduğunu saptamıştır. Bunun yanında MS ortamında sürgün ucu nekrozisinin daha fazla olduğunu bulmuştur. Çalışmalarımızda genç bitkilerde Gamborg B5, canlılık ve nekrozis açısından ilk 10 gün içerisinde daha yüksek gerçekleşmiştir. Keza Onay (2000) askorbik asiti 50 mg/l oranında kullanarak *P. vera*'da fenolik maddeleri engelleyerek sürgün oluşturmuştur. Ancak çalışmamızda *P. lentiscus* sürgünleri alt kültürde canlılıklarını yitirmişlerdir.

Çizelge 2'de görüldüğü gibi genç bitki eksplantlarında kullanılan ortamların hemen tümünde eksplantlarda sürgün gelişimi meydana gelmiştir. Ancak düşük BAP konsantrasyonlarının yanı sıra yüksek konsantrasyonlarda da canlılık ve sürgün gelişimi olmuştur. En yüksek sürgün uzunluğu ve canlılık 2 mg/l BA içeren Gamborg B5 + Gamborg B5 vitaminleri ortamında sırasıyla 4,20±0,44 mm ve % 100,0 olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu ortamda eksplant kararması ve ortam kararması da meydana gelmemiştir. Genç bitkilerde ortam kararmasının en az düzeyde görüldüğü ortamlar ise yine Gamborg B5 + Gamborg B5 vitaminleri ortamları olmuştur. Yaşlı bitki eksplantlarında kullanılan ortamlarda ise en yüksek sürgün uzunluğu 1 mg/l BA içeren MS + MS vitaminleri ortamında 6,00±0,00 mm olarak gerçekleşmesine rağmen bu ortamda canlılığın çok düşük olduğu görülmüş en yüksek canlılık ise hormonsuz MS + Gamborg vitaminleri ortamında (% 80,0) meydana gelmiş, sürgün uzunluğu ise 1 mg/l BA içeren MS + MS vitaminleri ortamı dışında diğer ortamlarındaki tüm konsantrasyonlardan da yüksek olarak (3,75±1,59 mm), eksplant kararması ise yine düşük (% 20) olarak meydana gelmiştir. Ayrıca yaşlı bitkilerde eksplant kararması genel olarak yüksek düzeylerde görülürken, ortam kararması ise hemen bütün ortamlarda % 100 olarak gerçekleşmiştir.

Çalışmamızda farklı besin ortamlarında, eksplantlarda sürgün gelişimi yaşlı bitkilerde genç bitkilere göre daha düşük cevaplar vermiş ve canlılıkları daha az olmuştur. Bu durum genç bitki eksplantlarının *in vitro* rejenerasyonda kullanımının daha uygun olacağını göstermektedir. Yine eksplant kararması ve ortam kararmasının da yaşlı bitkilerde genç bitkilere göre daha yüksek oranda gerçekleşmesi yaşlı bitkilerde fenolik bileşiklerin daha fazla olmasından ileri gelmektedir. Çalışmada

canlı eksplantlar 10 günden sonra alt kültüre alındıktan sonra canlılıklarını kaybetmişlerdir.

Sakız ağacı ile yaptığımız ikinci çalışmada fenolik maddelerin etkisini azaltmak ve eksplant kararmasını önlemek için farklı kimyasallarla yapılan uygulamaların etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3'de görülmektedir. Çizelge 3'de görüldüğü gibi bu uygulamalardan alınan iki haftalık değerlere göre iki hafta sonunda en yüksek canlılık oranı % 50,0 ile aktif kömür içeren DKW ortamında gözlenmiştir. Aynı şekilde 15 µM AgNO₃ içeren ortamda (% 37,5) ve 100 µM L-cystein ile muamele edilen DKW ortamlarında (% 30,0) da diğer ortamlara göre yüksek gözlenmiştir. Gamborg B5 ortamında ise 50 µM L-cystein içeren ortam (% 33,3) diğer ortamlara göre daha yüksek olmuştur. Sürgün uzunluğu ise en yüksek 100 µM L-cystein uygulamasında DKW ortamında (7,33±1,33) gözlenmiştir. Uygulamalarda besin ortamlarında kararma meydana gelmiştir ve bu kimyasalların eksplantlardan meydana gelen fenolik bileşikleri azaltıcı ve dolayısıyla ortam kararmasını önleyici bir etkisi olmamıştır. Bu ortamlardaki eksplantlardan canlı olan ve gelişme gösterenler inokülasyondan iki hafta sonra alt kültüre alınmışlardır. Alt kültüre alınan eksplantlardan sadece aktif kömür ilave edilmiş MS+B5 ortamlarındaki yaklaşık bir ay canlılıklarını sürdürebilmişler ve daha sonra kararıp nekroz olmuşlardır. Diğer ortamdaki eksplantlar ise alt kültürden sonra birkaç gün içerisinde kararmışlardır. Benzer çalışmayı *P. vera* ve *P. atlantica*'da gerçekleştiren Mederos ve ark. (1999) 7 µM AgNO₃ içeren Q&L-4 ortamında *P. atlantica*'da eksplant kahverengileşmesini azalttığını sürgün gelişimi ve yüzdesini de yükselttiğini ayrıca 15,30 ve 40 µM düzeylerinde ise kahverengileşmenin yok edildiğini göstermiştir. Bunun yanı sıra bu dozlarda sürgün gelişimi ve yüzdesinin düştüğünü gözlemiştir. 50-100 µM L-cystein içeren uygulamalarda ise, *P. atlantica*'da gelişme olmaz ve eksplantlar kahverengileşirken *P. vera* da her iki konsantrasyonda da sırasıyla %41.6 ve % 25.0 sürgün yüzdesi elde etmiştir. Burada her iki bitkide ayrı reaksiyonlar göstermiştir. Yine aktif karbon uygulamasında da her iki türde de yaptığı 1,2,3 g/l aktif karbonlu ortamlarda 4 ve 8 günlük karanlık uygulamalardan sonra aydınlık ortamlara transfer ettiği zaman 1 g/l de *P. vera*'da 8 günden sonra % 41,6 sürgün yüzdesi ve 9,60 mm sürgün uzunluğu elde ederken *P. atlantica*'da % 83,3 sürgün yüzdesi ve 15,1 mm sürgün uzunluğu elde etmiştir. Ancak meydana gelen sürgünler vigor olmayıp aynı zamanda klorozis belirtileri göstermişlerdir. Ardından gümüş nitrat (AgNO₃)'lı ortamlar kullanılarak *Pistacia atlantica*'da kahverengileşme yüksek oranda azaltılmış ve daha büyük ve geniş yapraklı sürgünler elde edilmiştir. *Pistacia vera* cv. *mateur*'da ise kahverengileşmenin azalmasına rağmen sürgün oluşumu engellenmiştir.

Çizelge 2. Farklı besin ortamları ve BAP konsantrasyonlarının yaşlı ve genç *Pistacia lentiscus* L. var. chia fertlerinden alınan apikal sürgün ucu eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi.

Table 2. Effects of different media and BAP concentrations on shoot regeneration of apical shoot-tip eksplants taken from adult and juvenil *Pistacia lentiscus* L. var. chia tree.

Bitki tipi Plant type	Temel ortam bileşimi Basal medium comp.	BAP konsantras. (mg/l) BAP concentration (mg/l)	Eksplant karaması (%) Explant with browning (%)	Ortam karaması (%) Medium with browning (%)	Canlılık (%) Vigority (%)	Sürgün uzunluğu ortalaması ±SE (mm) Means of shoot length ±SE (mm)
Genç Bitki Juvenile Plant	MS orj.+ MS vitaminleri	0	62,5	87,5	37,5	3,67±0,66
		1	60,0	80,0	40,0	3,00±0,00
		2	70,0	100,0	30,0	3,00±0,00
		4	100,0	90,0	0	
	MS orj. + Gamborg vitaminleri	0	70,0	90,0	30,0	3,00±0,00
		1	50,0	70,0	50,0	3,50±0,28
		2	70,0	80,0	30,0	3,33±0,33
		4	40,0	80,0	60,0	3,00±0,00
	Gamborg B5+ Gamborg B5 vitaminleri	0	11,1	0	88,9	4,00±0,57
		1	14,3	14,3	75,0	4,00±0,63
		2	0	0	100,0	4,20±0,44
		4	0	0	100,0	4,13±0,47
	MS orj. + MS vit. + 50 mg/l ask. asit	0	20,0	80,0	80,0	4,00±0,00
		1	30,0	30,0	70,0	4,20±0,48
		2	25,0	12,5	75,0	3,00±0,63
		4	50,0	25,0	50,0	4,00±0,00
Yaşlı Bitki Adult Plant	MS orj.+ MS vitaminleri	0	44,4	100,0	55,6	3,00±0,00
		1	980,0	100,0	10,0	6,00±0,00
		2	100,0	100,0	0	
		4	100,0	100,0	0	
	MS orj. + Gamborg vitaminleri	0	20,0	80,0	80,0	3,75±1,59
		1	25,0	100,0	75,0	3,00±0,00
		2	62,5	100,0	37,5	
		4	71,4	100,0	28,6	3,50±0,50
	Gamborg B5+ Gamborg B5 vitaminleri	0	75,0	100,0	25,0	3,00±0,00
		1	75,0	100,0	25,0	
		2	100,0	100,0	0	
		4	88,9	100,0	0	
	MS orj. + MS vit. + 50 mg/l ask. asit	0	100,0	100,0	0	
		1	100,0	100,0	0	
		2	100,0	100,0	0	
		4	100,0	100,0	0	

Çizelge 3. Eylül 2002 sonlarında AgNO₃, L-Cystein ve aktif kömür içeren MS + B5 vit., Gamborg B5 ve DKW besin ortamlarının kültüre alınan yaşlı bitki apikal sürgün ucu eksplantlarına etkisi (8-16 gün sonra).

Table 3. The effect of MS + B5 vitamin, Gamborg B5 and DKW nutrient media with AgNO₃, L-Cystein and active carbon on apical 8-16 day shoot tip explants of aged plants on late September in 2002.

Hafta Week	Kimyasal bileşikler Chemical compounds	Besin ortamı Nutrient media	Eksplant kararması (%) Explant with browning (%)	Ortam kararması (%) Medium with browning (%)	Canlılık (%) Vigorty (%)	Sürgün uzunluğu ortalaması ±SE (mm) Means of shoot length ±SE (mm)
1. hafta 1 st week	15 µM Ag NO ₃	MS + B5	100,0	100,0	0	
		Vit B5	84,6	61,5	15,4	
		DKW	55,6	77,8	44,4	
	50 µM L-Cystein	MS + B5	63,6	90,9	36,4	
		Vit B5	44,4	77,8	55,6	
		DKW	66,7	88,9	33,3	
	100 µM L-Cystein	MS + B5	80,0	80,0	20,0	
		Vit B5	30,0	60,0	70,0	4,00±0,00
		DKW	70,0	100,0	30,0	3,83±0,16
	1 g/l aktif kömür	MS + B5	75,0		37,5	
		Vit B5	66,7		33,3	
		DKW	33,3		66,7	
2. hafta 2 nd week	15 µM Ag NO ₃	MS + B5	100,0	100,0	0	
		Vit B5	84,6	61,5	15,4	4,50±0,50
		DKW	62,5	75,0	37,5	3,75±0,47
	50 µM L-Cystein	MS + B5	90,9	90,9	9,1	6,00
		Vit B5	66,7	77,8	33,3	5,00
		DKW	77,8	88,9	22,2	
	100 µM L-Cystein	MS + B5	80,0	80,0	20,0	4,00±0,00
		Vit B5	100,0	42,9	28,6	5,60±0,51
		DKW	70,0	100,0	30,0	7,63±1,33
	1 g/l aktif kömür	MS + B5	71,4		42,9	3,50±0,50
		Vit B5	62,5		37,5	4,00±0,57
		DKW	50,0		50,0	4,00±0,40

Pistacia vera L.'da genç materyalin (2 yaşına kadar) tesisi, kültürün ilk safhasında şiddetli kahverengileşmeden dolayı düşük olarak gerçekleşmiştir ve eksplantın aynı ortam içerisinde temiz bölgelere transfer edilmesiyle eksplantlarda düzelme gözlenmiştir (Barghchi 1985b). Olgun meyve veren durumdaki *Pistacia vera* L. ağaçlarından alınan eksplantların kültür tesisi şiddetli kahverengileşmeden dolayı zor olduğu bildirilmiştir (Barghchi 1985a). *Pistacia vera* L. ve *Pistacia atlantica*'da yaşlı bireylerden alınan nodal eksplantların *in vitro* inisiyasyona cevap vermediği saptanmıştır (Bustamente-Garcia 1984). Çalışmalarımız sırasında yaşlı ve yaşlı ağaçlardan çoğaltılmış genç fidanlardan alınan *Pistacia lentiscus* L. var. chia eksplantları da genelde *in vitro* inisiyasyona yeterli düzeyde cevaplar vermemiştir.

ÖNERİLER

Sakız ağacı (*Pistacia lentiscus* var. chia)'nın *in vitro* çoğaltılması, sakız elde edilen ana bitkilerle aynı genetik yapıya sahip, rejenere fidelerin elde edilerek, bitkinin yok olmasının önlenmesi açısından önemlidir. *Pistacia lentiscus* var. chia da fenolik bileşikler ve kontaminasyonlar yaşlı fertlerde rejenerasyon için büyük sorun oluşturmaktadır. Modifiye temel ortamların yanında kontaminasyon ve fenolik bileşiklerin etkisini azaltacak araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle yaşlı *P. lentiscus* var. chia bitkileri üzerinde, ana bitkilerle aynı genotipte bireyler elde etmek için yeni mikroçoğaltım çalışmalarına gereksinim vardır.

LİTERATÜR LİSTESİ

- Abousalim, A. 1990. Micropropagation and Micrografting of Pistachio (*P. vera* L. and *P. atlantica* Desf). PhD Thesis, Department of Horticulturæ. Wye College, University of London, UK.
- Acar, İ. 1988. (*Pistacia lentiscus* L. var. chia) sakızı üretiminin geliştirilmesine esas olmak üzere sakızın fiziko-kimyasal yönden incelenmesi , Ormancılık Araştırma Ens. , Teknik Rap. Ser. No.35.
- Barghchi, M. and P. G. Alderson. 1983. *In vitro* propagation of *Pistacia vera* L. from seedling tissues. J. Hort. Sci. 58: 435-445.
- Barghchi, M., and P. G. Alderson. 1985. *In vitro* propagation of *Pistacia vera* L. and the commercial cultivars Ohadi and Kalleghochi. Journal of Horticultural Science, 60 (3): 423-430.

- Barghchi, M., and P. G. Alderson. 1989. Pistachio (*Pistacia vera* L.) In BAJAJ, YPS (ed), Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 5, Trees II, PP 68–98, Spring–Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Barghchi, M., and A. Martinelli. 1984. *In vitro* propagation of mature *Pistacia vera* varieties of Kerman (female) and Peter's (male) Pistachio. Abstract 75. Plant tissue Culture and its agricultural applications. 41 st. Conference in the easter school series in agricultural science. Universty of Nothingham.
- Barghchi, M. 1985 a. *In vitro* culture of mature commercial *Pistacia vera* L. cultivars. Proc.Inter. Plant Prop's, Soc., 35: 331–333.
- Barghchi, M. 1985 b. *In vitro* micropropagation *Pistacia* rootstocks cultivars. Proc.Inter. Plant Prop's, Soc., 35: 334–337.
- Baytop, T. 1984. Türkiyede Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün). İst. Üniv. Ecz. Fak. Yay. No. 3255, Ecz. Fak. No. 40, İstanbul.
- Browicz, F. A. 1987. *Pistacia lentiscus* L. var. chia (*Anacardiaceae*) on Chios island, Pl. Sys.Evol., 155: 189-195.
- Bustamante-Garcia, M. A. 1984. Micropropagation and Rejuvenation of *Pistacia* Species and Mechanism by which Light Influences Root Initiation. PhD Thesis, University of California, Davis USA.
- Davis, P. H. 1966. Flora of Turkey and East Aegean Islands. Univ. Of Edinburgh, vol. 2.
- Driver, J. A., and A. H. Kuniyuki. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. Hort Science, 19: 507-509.
- Gamborg. O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968 Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. Exp. Cell Res, 50: 151-158.
- İsfendiyaroğlu, M. 1999. Sakız ağacı'nın (*Pistacia lentiscus* var. Chia Duham.) çelikle çoğaltılması ve kök oluşumunun anatomik–fizyolojik incelenmesi üzerine araştırmalar. Ege Üniv. Fen Bil. Ens. Doktora Tezi, İzmir, Türkiye.
- 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 s.

- Karakır, N. ve M. İsfendiyaroğlu. 1993. Sakız ağacı yetiştirme tekniği. TYUAP Ege-Marmara Dilimi Bahçe Bitkileri Grubu ABAV Toplantısı, 9-11 Kasım 1993, Menemen, İzmir.
- Martinelli, A. 1988. Use of In vitro techniques for selection and cloning of different *Pistacia* species. Acta Horticulturae. 227, pp 2.
- Mederos, S. M., M. I. Trujillo, and I. Lopez. 1994. Micropropagation of Pistachio: *Pistacia vera* cv. Mateur. Plant Tissue Cult. 4 (2): 111-116.
- Mederos, S. M., M. I. Trujillo, and I. Lopez. 1997. Effects of Nutrient Media on the *In Vitro* Establishment of Shoots of *Pistacia atlantica* Desf. Seedlings. Tr. J. of Agr. and Forestry, 21: 345-348.
- Mederos, S. M., and M. I. Trujillo. 1999. Elimination of Browning Exudate and in vitro development of shoots in *Pistacia vera* L. cv. Mateur and *Pistacia atlantica* Desf. Culture. ACTA Soc. Bot. Pol., Vol. 68, No. 1: 21-24.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for Rapid Growth and Bio Assay with Tobacco Tissue Cultures. Physiol Plant., 15: 473-497.
- Onay, A., C. E. Jeffrey, and M. M. Yeoman. 1995. Somatic Embryogenesis in Cultured Immature Kernels of Pistachio, *Pistacia vera* L. Plant Cell Rep. 15: 192-195.
- Onay, A. 1996. *In vitro* organogenesis and embriyogenesis of Pistachio, *Pistacia vera* L. PhD. Thesis, University of Edinburgh, UK.
- Onay, A. 2000. Micropropagation of Pistachio From mature trees. Plant Cell, Tiss and Org. Cult 60: 159-162.
- Perikos, J. 1993. The Chios Gum Mastic, Print All Ltd., Athens Greece, 95 p.
- Pontikis, C.A. 1985. *In vitro* propagation of *Pistacia terebinthus* L. Plant Propagator 30: 14-15.
- Quoirin, M., and P. Lepoivre. 1977. Improved Medium for in vitro culture of *Prunus* sp. Acta Hort., 78: 437-442.

- Taşkın, T., D. Çobanoğlu, S. Namlı, and D. Başaran. 1996a. Production of Regenerate Seedlings with Meristem Culture Techniques in *Pistacia vera* L.cv. Siirt. Acta Bot. Ind. 24: 239-243.
- Taşkın, T., D. Çobanoğlu, G. Çolak, S. Namlı, D. Başaran, and T. Gaspar. 1996b. Plant Regeneration Through Somatic Embriyogenesis in *Pistacia vera*. Saussurea 27: 59-65.
- Whitehouse, W. E. 1957. The pistacio nut-a new crop for the western United States, Economic Botany, 11 (4): 281-321.
- Yücel, S., A. Onay, G. Çolak, and D. Başaran. 1991. The researches of obtaining from *Pistacia vera* L. apical bud nodal bud by micropropagation. Acta Horticulturae, Plant Biotechnology 289: 167-168.
- Zohary, M. 1952. Amonographical study of the genus *Pistacia*, Palestine J. Bot., Jerusalem series, 5 (4): 187-228.