

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ARABİDOPSIS THALIANA L.'DA LEVAN VE İNÜLİN TİPİ
FRUKTANLARIN KRİYOKORUYUCU ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ

İREM İLTER
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2020

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ARABİDOPSİS THALİANA L.'DA LEVAN
VE İNÜLİN TİPİ FRUKTANLARIN
KRİYOKORUYUCU ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ

İREM İLTER
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

GEBZE
2020

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE

**DETERMINATION OF CRYOPROTECTIVE
EFFECTS OF LEVAN AND INULIN TYPE
FRUCTANTS IN ARABIDOPSIS THALIANA L.**

İREM İLTER
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

GEBZE
2020



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15/01/2020 tarih ve 2020/04 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 27/01/2020 tarihinde tez savunma sınavı yapılan İrem İLTER'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ

ÜYE

: Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Veysel SÜZERER

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

Prof. Dr. Ümit DEMİR

Gebze Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Günümüzde, doğadaki biyolojik sistemlerin donma stresine karşı yarattığı tolerans mekanizmaları tarafından üretilen doğal kriyokoruyucu maddeleri taklit etmek için kriyoprezervasyon çalışmalarında vitrifikasyon solüsyonlarında sentetik kimyasallar kullanılmaktadır. En çok kullanılan PVS2 solüsyonunda %15 (v/v) bulunan dimetil sülfoksit (DMSO) sentetik kimyasalı özellikle kriyoprezervasyon uygulamasında toksisiteye neden olabildiğinden donma ve/veya çözme sonrasında canlılığı olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Literatürde bu yüzden vitrifikasyon solüsyonlarında DMSO miktarının azaltılmaya çalışıldığı solüsyonlar bulunmakla birlikte, hiçbirisi çok sayıda bitkide PVS2 kadar başarılı sonuç sağlayamamıştır. Bu sorun, doğal kriyokoruyucuların kullanımı ile aşılabilir. Bunlar arasında fruktanların, kuru ve sert iklim koşullarında bitkileri kuraklığa ve donma stresine karşı koruduğu bilinmektedir. Bu nedenle sunulan tez çalışmasının amacı, doğal kriyokoruyucu olan fruktanların bitki kriyoprezervasyonunda fideciklerin vitrifikasyonuna ve saklama sonrası canlılıklarını korumalarına olan etkilerinin belirlenmesidir. Sözkonusu amaçla model bitki olan *Arabidopsis thaliana* L. bitkisinde, levan ve inülin tipi toplam 11 fruktanın kriyokorucu potansiyelini belirlemek için 48 ve 72 saat çimlendirilen fideciklerin tek aşamalı vitrifikasyon yöntemi ile kriyoprezervasyonu yapıldı. PVS2 solüsyonunda bulunan DMSO konsantrasyonu azaltılarak, farklı miktarlarda 100-300 mg/L fruktan ilave edildi. Vitrifikasyonu takiben fidecikler, sıvı azotta donmaları ve çözünmelerini takiben kriyoprezervasyon sonrası geri kazanım için in vitro koşullarda 15 gün kültürlendi. Elde edilen sonuçlara göre denenen fruktanlar arasından 100 mg/L graminan ve %12,5 DMSO içeren solüsyonda donma ve çözme sonrası en yüksek geri kazanım görülmüştür. Bu solüsyona dehidratasyon ve donma sırasında oluşan oksidatif stresin azaltılması için antioksidan olarak vitamin C'nin eklenmesi, kriyo sonrası geri kazanılan bitkilerin morfolojik özelliklerini iyileştirmiştir. Tez kapsamında oluşturulan yeni vitrifikasyon solüsyon formülasyonunun farklı bitki türlerinin kriyoprezervasyon sonrası canlılığını artırma potansiyeli bulunmaktadır.

Anahtar kelimeler: Kriyoprezervasyon, Kriyokoruyucu, Fruktan, PVS2, Arabidopsis thaliana L.

SUMMARY

Nowadays, synthetic chemicals are used in vitrification solutions in cryopreservation studies to mimic natural cryoprotective substances which naturally produced by the biological systems to induce tolerance against freezing stress. Among them, presence of 15% (v / v) dimethyl sulfoxide (DMSO) in the most commonly used PVS2 solution can adversely affect the viability after freezing and / or thawing, as it can cause toxicity especially in cryopreservation applications. Although there are different vitrification solutions in which the amount of DMSO tried to be reduced in the literature, none have been as successful as PVS2 in many plants. This problem can be overcome by the use of natural cryoprotectants. Among these, fructans are known to protect plants against drought and freezing stress in dry and harsh climatic conditions. Therefore, the aim of this thesis is to determine the effects of various natural cryoprotectant fructans on vitrification and protection of survival in plant cryopreservation. In order to determine the cryoprotective potential of 11 levan and inulin type of fructans on cryopreservation, 48 and 72 hour- germinated seedlings of *Arabidopsis thaliana* L., which is a model plant, (that are germinated for) was cryopreserved by vitrification one-step freezing method. For this aim, DMSO concentration in the PVS2 solution is reduced while different amounts of (100-300 mg / L) fructans were incorporated to the vitrification solution. After vitrification, seedlings were freezed in liquid nitrogen, rapidly thawed and in vitro cultured for 15 days to reveal out survival after cryopreservation. According to the results, the highest recovery was observed with inclusion of 100 mg / L graminan and reduction of DMSO to 12.5% among the tested fructants. The addition of vitamin C as an antioxidant to reduce oxidative stress during dehydration and freezing to this solution improved the morphological properties of plants recovered after cryo. The new vitrification solution formulated in the frame of this thesis has potential to increase the survival of not only *A. thaliana* L., but also different plant species after cryopreservation.

Keywords: Cryopreservation, Cryoprotectant, Fructan, PVS2, *Arabidopsis thaliana* L.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans, bizler için yeni bir heyecan, başarmayı deneyeceğimiz, azmedeceğimiz yeni bir hikayeydi. Sıkı sıkı elinden tuttuğunuz o merak ve heyecanımızla hiç korkmadan bu yolda yürüdük. Gülümsemeye sığdırılmış, özveri, sabır ve anlayış dolu bir yürek varsa yanınızda yolculuğun ne kadar zor ya da uzun olduğunun bir önemi yok. Verdiği tüm emek için sevgili hocam Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Lisans staj dönemimden, yüksek lisansımın sonuna kadar tüm bilgi ve tecrübeleri benimle paylaşan, her zaman desteğini hissettiğim değerli hocam Hamit EKİNCİ'ye, tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Dr. Özlem AKKAYA, Dr. Öğr. Üyesi Mine GÜL ŞEKER'e, Prof.Dr. Sedef TUNCA GEDİK, Dr. Öğr. Üyesi Veysel SÜZERER ve Prof. Dr. Ebru TOKSOY ÖNER'e teşekkür ederim.

Sabah akşam demeden deneylerim boyunca ne zaman ihtiyacım olsa deneylerimi kendi deneyleri gibi benimseyip, özveriyle destek olan fedakar laboratuvar arkadaşlarıma en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Maddi ve manevi hiçbir destekten kaçınmayan, umutsuz olduğum her an bana sapaşlam durmayı öğreten ve sonsuz desteğiyle yanımda olan ilk öğretmenlerim annem Emine BAKŞAN ve babam Şükrü BAKŞAN'a, çalışkanlığını, duruşunu hep örnek aldığım, açtığı yollarda emin adımlarla yürümemi sağlayan abim İbrahim BAKŞAN'a bana olan güvenleri ve tüm fedakarlıkları için teşekkür ederim.

Çalışma dönemlerimde bana hep sevgiyle gelen, ben çalışırken kahveyle destek olan, daha birçok hedefe birlikte yürüyeceğimiz sırdaşım, hayat arkadaşım, biricik, fedakar eşim Ömer İLTER ve ikinci aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	4
2.2. Uzun Süreli Saklama (Kriyoprezervasyon)	5
2.2.1. Kriyokoruyucular	10
2.3. Frukta nlar	13
2.3.1. Frukta n Tipleri	16
3. MATERYAL VE METOD	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Bitki Materyali ve Frukta nlar	19
3.1.2. Kullanılan Malzemeler	19
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	20
3.2. Metod	21
3.2.1. Frukta nların Camsı Geçiş Sıcaklıklarının Hesaplanması	21
3.2.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> L. Bitkisinin İn Vitro Koşullarda Çimlendirilmesi ve Kriyoprezervasyon İçin Steril Fidelerin Elde Edilmesi	21
3.2.3. <i>Arabidopsis thaliana</i> L. Fideciklerinin (48 Saat Çimlendirilen) Vitrifikasyon Tek Aşamalı Dondurma Yöntemi İle Kriyoprezervasyonu	23

3.2.4. Verilerin Toplanması ve İstatiksel Analizler	25
4. SONUÇLAR	26
4.1 Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Çalışmaları	26
4.1.1 Frukthanların Camsı Geçiş Sıcaklığının Hesaplanması	26
4.2. 48 Saat Çimlendirilen Arabidopsis thaliana L. Fideciklerinin Vitrifikasyon Tek Aşamalı Dondurma Yöntemi İle Kriyoprezervasyonu	28
4.2.1. 100 mg/L Frukthan Konsantrasyonu Denemeleri	28
4.2.2. 300 mg/L Graminan ve Hp İnülin Frukthan Konsantrasyonu Denemeleri	32 34
4.2.3. Graminan Tipi Frukthanın 150-200 mg/L Konsantrasyondaki Denemeleri	37
4.2.4. Vitamin C İlavesi İle 100 mg/L Graminan Tipi Frukthan Denemesi	38
4.2.5. Vitrifikasyon Solüsyonundan Sukrozun Çekilmesi	40
4.3 72 saat çimlendirilen Arabidopsis thaliana L. Fideciklerinin Vitrifikasyon Tek Aşamalı Dondurma Yöntemi İle Kriyoprezervasyonu	
5. TARTIŞMA	41
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	56

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
μ l	: Mikrolitre
G	: Gram
$^{\circ}$ C	: Santigrat derece
dH ₂ O	: Distile su
DSC	: Differansial Scanning Calorimeter, Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DP	: Depolimerizasyon
EG	: Etilen Glikol
EtOH	: Etil alkol
FBS	: Fetal Bovine Serum, Fetal Sığır Serumu
Fru f	: Fruktofuranozil
HCl	: Hidroklorik asit
kDa	: Kilo dalton
M	: Molar
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Mikro RNA
MS	: Murashige Skoog
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
Ng	: Nanogram
PBS	: Phosphate buffered saline (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi)
PVS	: Plant Vitrification Solution ² , Bitki vitrifikasyon solüsyonu
ROS	: Reactive Oxygen Species, Reaktif Oksijen Türleri
Tg	: Glass Transition, Camı geçiş sıcaklığı
UV	: Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	4
2.2: Vitrifikasyon tekniği ile kriyoprezervasyon aşamaları.	8
2.3: Hücre Zarının Yapısı.	12
2.4: Fruktan-Membran İlişkisi.	15
2.5: Fruktanların Antioksidan Rolü.	16
2.6: Fruktan Tipleri.	17
3.1: Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Cihazı (DSC).	21
3.2: <i>Arabidopsis thaliana</i> L. Sterilizasyonu.	22
3.3: Kriyoprezervasyon Deney Grupları.	24
3.4: Kriyoprezervasyon Hızlı Dondurma-Çözme Aşaması.	25
4.1: Fruktanların Camsı Geçiş Sıcaklığı (Tg) Değerleri.	26
4.2: a) 100 mg/L graminana ait DSC analiz grafiği, b) 300mg/L D-glukoza ait DSC analiz grafiği.	27
4.3: Vitrifikasyon çözeltisinde bulunan DMSO miktarının (PVS2 için %15, fruktan grubu için %12,5) ve 100 mg/L fruktan konsantrasyonunun kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin canlılıklarına olan etkileri.	29
4.4: %15 DMSO bulunan PVS2 ve %12,5 DMSO + 100mg/L konsantrasyon fruktan içeren vitrifikasyon solüsyonları ile muamele edilen kontrol (a) ve kriyoprezerve edilen örneklerin (b) 15 günlük gelişim sonuçları.	30
4.5: Vitrifikasyon çözeltisinde bulunan DMSO miktarının (PVS2 için %15, fruktan grubu için %10) ve 100 mg/L fruktan konsantrasyonunun kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin canlılıklarına olan etkileri.	31
4.6: %15 DMSO bulunan PVS2 ve %10 DMSO + 100 mg/L fruktan içeren vitrifikasyon solüsyonu ile muamele edilen kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin 15 günlük gelişim sonuçları.	31
4.7: Vitrifikasyon çözeltisinde bulunan DMSO miktarının (PVS2 için %15, fruktan grubu için %12,5) ve 300 mg/L fruktan konsantrasyonunun kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin canlılıklarına olan etkileri.	32

4.8:	%15 DMSO bulunan PVS2 ve %12,5 DMSO+ 300 mg/L fruktan içeren vitrifikasyon solüsyonu ile muamele edilen kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin 15 günlük gelişim sonuçları	33
4.9:	Vitrifikasyon çözeltisinde bulunan DMSO miktarının (PVS2 için %15, fruktan grubu için %10) ve 300 mg/L fruktan konsantrasyonunun kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin canlılıklarına olan etkileri.	33
4.10:	%15 DMSO bulunan PVS2 ve %10 DMSO+ 300 mg/L fruktan içeren vitrifikasyon solüsyonu ile muamele edilen kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin 15 günlük gelişim sonuçları.	34
4.11:	Vitrifikasyon çözeltisinde bulunan DMSO miktarının (PVS2 için %15, fruktan grubu için %12,5-10) ve 150 mg/L fruktan konsantrasyonunun kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin canlılıklarına olan etkileri.	35
4.12:	%15 DMSO bulunan PVS2 ve %12,5-%10 DMSO+150 mg/L fruktan içeren vitrifikasyon solüsyonu ile muamele edilen kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin 15 günlük gelişim sonuçları.	35
4.13:	Vitrifikasyon çözeltisinde bulunan DMSO miktarının (PVS2 için %15, fruktan grubu için %12,5-10) ve 200 mg/L fruktan konsantrasyonunun kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin canlılıklarına olan etkileri.	36
4.14:	15 DMSO bulunan PVS2 ve %12,5-%10 DMSO+200 mg/L fruktan içeren vitrifikasyon solüsyonu ile muamele edilen kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin 15 günlük gelişim sonuçları.	36
4.15:	Vitrifikasyon çözeltisinde bulunan DMSO miktarının (PVS2 için %15, fruktan grubu için %12,5) ve 100 mg/L fruktan + 0.3 µM Vitamin C konsantrasyonunun kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin canlılıklarına olan etkileri.	37
4.16:	100mg/L fruktan, %12,5 DMSO ve 0.3 µM vitamin C içeren vitrifikasyon çözeltisi ile muamele edilen kontrol ve kriyoprezervasyon örneklerinin 15 günlük gelişim sonuçları.	38
4.17:	Sukroz yerine M6 levan eklenerek yapılan kriyoprezervasyon denemeleri.	38
4.18:	Farklı konsantrasyonlarda PVS2 solüsyonuna sukroz yerine eklenen M6 levan ile kontrol ve kriyo gruplarında elde edilen canlılık yüzdeleri.	39

- 4.19: Farklı konsantrasyonlarda PVS2 solüsyonuna sukroz yerine eklenen M6 levan ile kriyoprezerve edilen fideciklerin 15 günlük gelişim sonuçları. 39
- 4.20: %15 DMSO bulunan PVS2 ve %12,5 DMSO+ 100 mg/L fruktan içeren vitrifikasyon solüsyonu ile muamele edilen kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin 15 günlük gelişim sonuçları. 40

TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Kriyokoruyucu ajanlar.	11
2.2: Farklı vitrifikasyon solüsyonları.	12
3.1: <i>İn Vitro</i> Çimlendirme Aşamasında Kullanılan Kimyasallar.	19
3.2: Kriyoprezervasyon Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar.	20
3.3: Kullanılan Cihazlar.	20
3.4: Besi Ortamı.	22
3.5: Kullanılan Frukthanlar.	24

1. GİRİŞ

Doğal yaşam alanlarının tahribatı ve geleneksel ekim yöntemlerinden modern ekim yöntemlerine geçiş süreci, genetik erozyona ve önemli germplazm kayıplarına neden olabilir. Gen kaynaklarının tohum bankalarında korunması ve saklanması stratejik olarak oldukça önemlidir. *İn vitro* koruma çalışmaları, bitkilere ait gövde ucu, meristem, tohum, kallus gibi farklı doku ve organ tiplerinin her türlü zararlıdan arındırılmış bir ortamda kısa, orta ya da uzun süreli saklanmasına olanak sağlar [Engelmann et al., 2003]. Gen kaynaklarının kısa süreli korunmasını sağlayan *in vitro* teknikleri ile beraber gelen kontaminasyon problemi, somaklonal varyasyonlar görülmesi, ekonomik olarak masraflı olması gibi dezavantajları göz önünde bulundurulduğunda, günümüzde uygulanan kriyoteknolojik (uzun süreli) çalışmalar gen kaynaklarının korunmasında yerini almıştır. Kriyoprezervasyon tekniği sıvı azot içerisinde (-196 °C), gen kaynaklarının uzun süreli korunması için güvenilir ve uygun maliyetli yegane yöntemdir. Tohumlar gibi bitki materyali bu teknik sayesinde, genetik değişiklikler veya somaklonal varyasyonlar olmadan uzun süre saklanabilir [Hervani et al., 2016].

Kriyoprezervasyon tekniklerinin başarısındaki en önemli etkenlerden biri dondurma ve çözündürme işlemleri sırasında hücrelerin zarar görmesini engelleyen kriyokoruyucu solüsyonlardır [Karow, 1969]. Son 10 yılda bitki türlerinin kriyoprezervasyon yöntemi ile uzun süre saklanmasında tehlikeli buz oluşumuyla hücre ölümüne sebep olmayan camsı yapıya geçebilen vitrifikasyona dayalı kriyoprezervasyon teknolojileri geliştirilmiştir [Chen et al., 2015]. Vitrifikasyona dayalı kriyoprezervasyonda kullanılan bitki kriyokoruyucu solüsyonu olan PVS2 (Plant Vitrification Solution 2, Sakai et al., 1990) bitkilerin hayatta kalabilmesine olanak sağlamakla beraber, içerisinde bulunan dimetilsülfoksit (DMSO) toksik olması sebebiyle ozmotik hasar ve dehidratasyon stresi gibi durumlarla bitki hücrelerine zarar vermektedir. Günümüze kadar bitki vitrifikasyonu için içerisinde DMSO, sukroz, etilen glikol (EG), gliserol yüzdeleri farklı vitrifikasyon solüsyonları geliştirilmiş olsa da [Suzuki et al., 2008], kriyoprezervasyon uygulamalarında en çok kullanılan solüsyon PVS2'dir. Kriyokoruyucu solüsyonlardan kaynaklanan hasar abiyotik strese yol açmakta ve bunun sonucunda bitkide oksidatif stres görülmektedir [Benson and Bremner, 2004]. Bu nedenle, kriyokoruyucu toksisitesi, hem düşük hızda dondurma

hem de vitrifikasyon ile kriyoprezervasyonun başarısında, kriyobiyojik protokollerin kapsamı için en sınırlayıcı faktördür [Fahy, 1987].

Doğada bulunan biyolojik sistemler, donma stresine karşı tolerans mekanizmaları tarafından doğal kriyokoruyucu maddeler üretmektedir [Elliott et al., 2017]. Bitkilerde bulunan ana depolama karbonhidratlarından biri olan fruktanların [Hendry 1993], bitkileri kuru ve zorlu iklim koşullarına karşı korumanın yanında [Pommerrenig et al., 2018] membran stabilizasyonu, abiyotik stres anında radikallere karşı savunma dahil birçok işleve sahiptir [Hinch et al., 2007; Matros et al., 2015]. Kriyoprezervasyon sürecinde bitkilerde oluşan dehidratasyon, donma ve oksidatif stres nedenleriyle oluşan hasar, doğal kriyokoruyucu fruktanların vitrifikasyon solüsyonuna eklenmesi ile azaltılabilir ve dolayısıyla kriyo sonrası bitki geri kazanımı arttırılabilir.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İÇeriği

Kriyoprezervasyon sırasında hücreler çok geniş bir sıcaklık arasında işlem görmekteDirler. Kriyoprezervasyon işleminde soğuk stresiyle birlikte kriyoprezervasyon uygulamasında kullanılan kriyokoruyucu ajanların yol açtığı dehidratasyon ve oksidatif streslerden kaynaklanan hasar, kriyoprezervasyon protokollerinin başarısını ve kriyoprezerve edilen bitkilerin genetik kararlılığını kısıtlamaktadır. Hücre membranının stabilitesinin korunması kriyoprezervasyonda kilit bir noktadır ve membran etkileşimleri ile öne çıkan fruktanların bitkilerde kriyokoruyucu etkileri ve bu etkileşim mekanizmasının araştırılması ile ilgili bilgi birikimi çok sınırlıdır. Doğal kriyokoruyucu ajanlar olarak yeni bitki koruma stratejilerinin geliştirilmesinden birçok alana kadar fruktanların uygulama alanı bulması, kriyoteknolojide çok önemli bir yer bulacaktır. İnsan ve bitki genetik materyallerinin kriyo bankalarda saklanması, tüp bebek tedavileri, kök hücre transplantasyonu ve gıda dondurma işlemleri gibi öncelikli pek çok kriyoteknoloji alanında kriyokoruyucular rutin olarak kullanılmaktadırlar.

Bu tez çalışmasının amacı, model bitki olan *Arabidopsis thaliana* L. fideciklerinin tek aşamalı vitrifikasyon temelli dondurma yöntemi ile kriyoprezervasyonunda levan ve inülin tipi fruktan katkılı vitrifikasyon çözeltilerinin kullanımı ve bu fruktanların kriyoprezervasyon sonrası geri kazanım başarılarının araştırılmasıdır. 118M607 numaralı TÜBİTAK destekli yapılan bu tez çalışması, ilk defa bitki sistemlerinde hem bitkisel hem de bakteriyel kökenli fruktanların bitkilerde kriyokoruyucu ajan olarak kullanılmasını içermektedir. Bu fruktanların eklenmesi ile yeni vitrifikasyon solüsyonlarının geliştirilecek olması ve söz konusu formülasyonların bitkilerin kriyoprezervasyon sonrası geri kazanım canlılıklarını arttırma potansiyeli bulunduğundan tezin hem literatüre hem de kriyoteknolojinin kullanıldığı tüm uygulama alanlarına katkısı bulunacaktır. Ayrıca bitkilerde doğal koruyucu olarak fruktanların kullanılmasının, bitkilerin kriyoprezervasyon sonrası genetik kararlılığında önemli bir etkisi olacaktır ve kriyokoruyucu solüsyonlarda kullanılan dimetilsülfoksitin toksik etkisini azaltacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Arabidopsis thaliana* L.

Tarımsal önemi olmamasına rağmen, model bir bitki organizması olan *Arabidopsis thaliana* L., genetik ve biyokimyasal çalışmalar için çok önemli ve sentetik biyoloji şablonu olarak kullanılmaya da uygun bir organizmadır [Holland 2018]. Freidrich Laibach tarafından 1940'larda ilk defa genetik bir model olarak kullanılması önerilen [Laibach 1943], [Meyerowitz 2001] *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* L.), Brassicaceae familyası üyesi olup, angiospermler arasında en küçük genoma sahip bitki türüdür [Leutwiler et al., 1984]. Bitki başına yaklaşık 10 bin adet tohum üretmektedir [Davis, 1992]. Kısa yaşam döngüsü (yaklaşık 5-8 hafta), boyutunun küçük olması (Şekil 2.1) ve kendilenerek verimli üremesi özellikle genetik çalışmalarda *Arabidopsis*'i gözde bir bitki olarak ön plana çıkarmıştır [Koorneef and Meinke., 2010]. Ayrıca *Arabidopsis* dünyada genom sekansı tamamlanan ilk bitki olmasıyla da bilinmektedir. Bununla birlikte, *Arabidopsis* Information Resource gibi (TAIR) çevrimiçi kaynaklar bulunmaktadır [Web 1, 2017].



Şekil 2.1: *Arabidopsis thaliana* L.

2.2. Uzun Süreli Saklama (Kriyoprezervasyon)

Bitki gen bankaları, bütün ticari bitkileri ve onların uzak akrabalarını, içerdikleri değerli özellikler nedeniyle muhafaza etmektedir. Bu bankalar, biyolojik ve çevresel streslere dayanıklı yeni veya daha üretken ürünler yetiştirmek için kullanılabilirdiğinden gıda güvenliği ve tarımsal biyoçeşitlilik açısından son derece önemlidir [Kaviani, 2011]. Bitki kaynaklarının ya da tohumların kriyojenik olarak korunması, bir başka *in vitro* koruma stratejisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bitki kaynaklarının yanlış saklanması, fenotip, karyotip, biyokimyasal veya moleküler seviyede çeşitli değişikliklere neden olabilir. Kriyoprezervasyon, bitki genetik kaynaklarının, uzun süreli saklanabilmesi için en güvenilir teknik olarak tanımlanmaktadır [Sakai and Engelmann., 2007]. Bu teknik, - 196 °C'da sıvı azot içerisinde bitki metabolik faaliyetlerinin durdurulması temeline dayanmaktadır [Lambardi and De Carlo., 2003]. Hücre bölünmesi, metabolik ve biyokimyasal süreçler kriyoprezervasyon boyunca durdurulmakta ve hücreler genetik özelliklerini teorik olarak sonsuz süre koruyabilmektedir [Niino et al., 1992]. Bitki genetik kaynakları saklanırken, fenotipik ve genotipik özelliklerinin maksimum kararlılığı da sağlanmaktadır [Ashmore, 1997].

Kriyojenik saklamada kontaminasyon riski yoktur [Younis., 2012]. Ayrıca küçük alanlarda uygulanabilmesi ve ekonomik açıdan uygun olması başlıca avantajları arasında yer almaktadır [Rao, 2004]. Kriyoprezervasyon tekniğinde tohum, zigotik embriyo, nodal tomurcuklar, gövde ucu, hücre ve kallus kültürleri ve somatik embriyolar gibi çeşitli bitki kaynakları kullanılmaktadır [Helliot and de Boucaud., 1997]. Bununla birlikte daha çok kriyoprezervasyon çalışmalarında totipotensi özelliği yüksek, zararlılardan arı ve su içeriğinin az olması sebebiyle gövde uçları kullanılmaktadır [Ashmore, 1997].

Kriyoprezervasyon süreci temel olarak 5 adımdan oluşmaktadır ve bu adımların her biri kriyoprezervasyonun başarısını etkilemektedir [Razdan and Cockling., 1997]. Bu adımlar; soğutma, ön kültürleme, kriyokoruyucu maddelerle muamele, sıvı azot içerisinde saklama, çözme ve çözme sonrası muameleleri içermektedir [Moges et al., 2003].

1977 yılında iki aşamalı soğutma tekniği kullanılarak Bajaj tarafından ilk kriyoprezervasyon çalışmaları patates bitkisinde uygulanmıştır. Su içeriği, dondurma ile uyarılan dehidratasyon ile azaltılmıştır. Bitki sürgün ve aksillar tomurcukları, farklı

gliserol veya sukroz içeren çözeltiler ile muamele edilmiş ve buhar fazındaki sıvı azota ve sonrasında direkt sıvı azota daldırılarak soğutulmuştur [Kaczmarczyk et al., 2011]. Birçok bitki başarılı bir şekilde sıvı azot ile saklanabilmiştir [Engelmann 2004].

Bitki materyalinin özelliği, laboratuvar imkanları, personelin deneyimi gibi pek çok farklı faktöre bağlı olarak kriyoprezervasyonda kullanılan yöntemin başarısı değişiklik göstermektedir [Reed, 2002]. Bununla beraber kriyoprezervasyon yönteminin başarısı için en önemli faktör, kriyoprezerve edilecek materyalin fizyolojik durumunun seçimi ve hücre içerisinde oluşacak buz kristallerinin oluşumunun önlenmesidir [Wu et al., 1999], [Zhao et al., 1999]. Bu nedenle, kriyoprezervasyon için basit ve güvenilir bir yöntemin geliştirilmesi, kriyoprezerve edilmiş hücrelerin, sürgün uçlarının ve somatik embriyolarının yaygın olarak kullanılmasına imkan verecektir [Sakai, 1997].

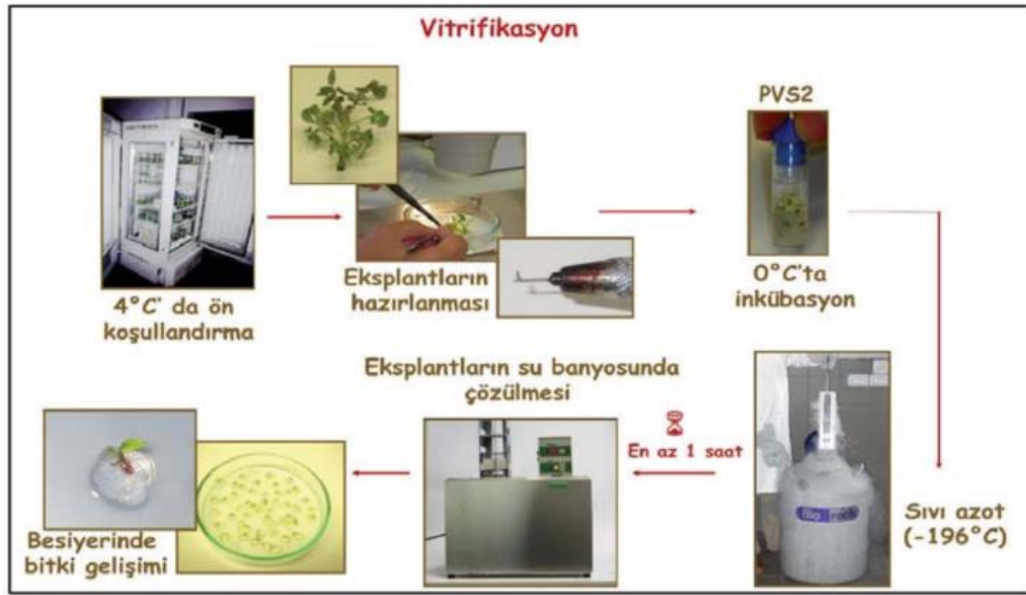
40 yılı aşkın süredir, farklı türlere ve genotiplerine uygun olan tek bir protokol ya da yöntem olmadığı için bitki gen kaynaklarının korunması için 1970'lerden 1980'lere kadar birçok kriyoprezervasyon tekniği geliştirilmiştir [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Reed, 2008], [Kaviani, 2011]. Klasik iki adımlı dondurma tekniği olan ilk protokol, doku ön muamelesi ve doku dehidratasyonu amacıyla kontrollü hızda yavaş bir şekilde soğutma ve bu işlemin sonrasında sıvı azota daldırmayı içermektedir [Ashmore, 1997]. Yavaş dondurma yönteminde eksplantlar (sürgün uçları, embriyo ve hücreler) uzun tüpler veya kriyotüp içerisinde, kriyokoruyucu solüsyonlar (DMSO, gliserol, etilen glikol ve sukroz) ile birlikte, -7°C buzdaki inkübasyona bırakılır. Sonrasında dakikada 0.3-0.5 °C olacak şekilde ayarlanabilir bir soğutucu kullanılarak sıcaklığın -40 °C'ye ulaşması sağlanır, ardından sıvı azota daldırılır [Kumu et al., 1983]. Suyun kristalleşmesi sebebiyle olan zarar, donma oranının ve ön donma sıcaklığının ayarlanması ile hücre içindeki kalan su miktarının değişmesine izin vermekte ve bu sayede azaltılabilmektedir [Villalobos and Engelmann, 1995]. Farklı bitki eksplantlarında (gövde ucu, kallus gibi) yavaş soğutma tekniği uygulanmış olup başarılı sonuçlar elde edilmiştir. [Benson, 2004; Reed and Uchendu, 2008], [Sakai, 1986]. Ancak bu teknikte soğuk stresine odaklanılmış olması ve yavaş soğutma sırasında hücrelerin maruz kaldıkları dehidratasyon stresi ve buz oluşumu nedenleriyle, hayatta kalma oranlarının düşük olması, tekniğin zaman alıcı karmaşık olması, ek olarak da pahalı bir soğutucu cihaz gerektirmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır [Sakai et al., 1990], [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997]. Bu nedenle dehidratasyon stresine önem

verilen tek aşamalı dondurma teknikleri son yıllarda geliştirilmiştir. Bitkinin türü ve genotipik farklılıkları nedeniyle bir çok farklı tek aşamalı kriyoprezervasyon tekniği kullanılmaktadır [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997]. Bu teknikler, dehidratasyon, enkapsülasyon-dehidratasyon, vitrifikasyon, enkapsülasyon-vitrifikasyon, damlacık vitrifikasyon, alüminyum kriyo-plaka, vakum infiltrasyon vitrifikasyon teknikleri olarak sıralanabilir.

Dehidratasyon fiziksel olarak bitki eksplantlarının steril silika jel üzerinde veya laminer akımlı kabin içinde steril hava akımına maruz bırakılarak fiziksel olarak su içeriklerinin azaltılmasıdır. Su içeriği görece yüksek olan tohum, zigotik ve somatik embriyoların kriyoprezervasyonunda kullanılmaktadır. Enkapsülasyon dehidratasyon yöntemi ise sentetik tohumların üretilmesi için geliştirilen ve eksplantların kalsiyum aljinat boncukları içerisine kapsüle edilmesi yöntemine dayanmaktadır [Redenbaugh et al., 1986]. Bu teknik ilk olarak armut ile patatesin kriyoprezervasyonunda kullanılmıştır [Fabre and Dereuddre, 1990]. Enkapsülasyon sonrasında eksplantlar farklı sukroz derişimlerinde (0.3 M ile 1.5 M) 1-3 gün ön kültüre alınmaktadırlar. [Ashmore, 1997], [Swan et al., 1998]. Bu işlemler eksplantlarda dehidratasyon toleransını indükler. Ön işlemden sonra eksplantlar, optimum dehidratasyon seviyelerine ulaşmak için silika jel üzerinde veya bir laminer akımlı kabin içinde eksplantların su içeriği sürekli kontrol edilerek dehidrate edilir [Dereuddre et al., 1991]. Enkapsülasyon-dehidratasyon, yüksek bir genetik kararlılık sağlaması, ucuz olması, kimyasal kriyokoruyucuların kullanılmaması, kapsülün dokuyu vitrifiye bir halde tutması avantajları arasındadır [Shibli et al., 2006], [Matsumoto, 2017]. Bununla birlikte kapsülasyonun, gelişimi geciktirmesi, iş yükü gerektirmesi ve bazen optimum desikasyonların sağlanmasının zor olması gibi dezavantajları bulunmaktadır [Benson et al., 1996b], [Benson et al., 2011a], [Lipavska and Vreugdenhil, 1996].

Kimyasal solüsyonlar kullanılarak hücrelerde oluşturulan vitrifikasyon, buz kristali oluşumunu önlemek için sıvı azotta donma ve çözülme sırasında sıvıdan amorf veya camsı faza su geçiş işlemidir [Elliot et al., 2017]. Hayvan hücrelerinin kriyoprezervasyonu için kullanılmış olan vitrifikasyon yöntemi [Fahy et al., 1987], sonrasında Sakai ve arkadaşları tarafından (1990) PVS2 vitrifikasyon solüsyonunun (% 30 gliserol, %15 etilen glikol, %15 dimetilsülfoksit (DMSO) ve 0.4 M sukroz) geliştirilmesi ile birlikte tropikal ve subtropikal türler de dahil olmak üzere birçok bitki türüne uygulanmıştır. PVS2; hücreyi camsı yapıya kavuşturarak, kayda değer bir buz oluşumu olmadan bitkinin yavaşça soğutulmasını sağlayan, dış ortamın ozmotik

potansiyelini artırarak hücre doku ve organlarını koruyan kriyokoruyucu çözeltiler [Reed, 1990], [Moges et al., 2003]. Vitrifikasyon yönteminde Şekil 2.2’de gösterildiği gibi belirli aşamalar bulunmaktadır [Ekinci ve Özden-Çiftçi, 2019]. Her aşama kriyoprezervasyonun başarısını etkilemektedir. Bitki materyali ilk olarak, sıvı azotla muamelesinden önce ozmo-koruyucu olarak görev alan ve dokuların soğuk toleransını dehidratasyona yol açarak arttıran yükleme solüsyonu ile muamele edilir [Nishizawa et al., 1993], [Sakai et al., 1991]. Ozmokoruma solüsyonundan sonra eksplantlar PVS2’ye maruz bırakılır. Bunun sebebi PVS2’nin yol açtığı zararlara ve içerdiği kimyasalara maruz kalmadan, hücreleri ozmotik olarak korumaktır. PVS2’nin toksisitesinden dolayı hücrelerin bu solüsyona maruz kalma süresi çok kısa olmalıdır. Vitrifikasyon yönteminde, metabolik aktivite minimuma indirilerek doku hasarı engellenip, genetik kararlılığın korunması sağlanır.



Şekil 2.2: Vitrifikasyon tekniği ile kriyoprezervasyon aşamaları.

Vitrifikasyon yöntemi, basit bir ekipman ve daha büyük bitki materyallerinin hızlı bir şekilde kriyoprezerve edilmesi yönüyle klasik yaklaşımlara göre daha avantajlıdır [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997] ve yaygın olarak kullanılmaktadır; çünkü uygulanması kolaydır ve birçok tür için iyi sonuç vermektedir [Wang et al., 2008].

Enkapsülasyon- vitrifikasyonda eksplantlar aljinat tanecikleri içinde kapsüle edilir ve daha sonra vitrifikasyon yöntemi ile muamele gerçekleştirilir [Matsumoto et al., 1995]. Küçük boyutlu eksplantlarda uygulamanın zorluğu ve zaman alıcı olması

sebebiyle vitrifikasyon, eksplantların enkapsüle edilmesi ile manipülasyonu daha kolay olan eksplantlar ortaya çıkartmakta [Sakai and Englemann, 2007], [Sharaf et al., 2012] ve eksplantların kriyoprotektan toksik etkisine doğrudan maruz kalmasını önlemektedir.

Damlacık vitrifikasyon Kartha ve ark. (1982) tarafından geliştirilmiş olup Leunufna ve Keller (2005) tarafından modifiye edilmiştir. Bu yöntem, eksplantların alüminyum folyo şeritler üzerinde PVS2 ile muamele edilmesine dayanmaktadır. Bu yöntemde yüksek soğuma/ısınma özelliklerine sahip alüminyum folyo şeritlerin kullanılması ve kriyokoruyucu solüsyonun küçük hacimde uygulanması, yöntemi avantajlı kılmaktadır [Keller and Dreiling, 2003]. Şimdiye kadar bu protokol başta muz olmak üzere, alev ağacı, kekik ve birçok türde başarı ile uygulanmıştır [Panis et al., 2005], [Ekinci, 2013], [Ozudogru ve Kaya, 2012].

Son zamanlarda, kriyo-plakalar (V kriyo-plaka ve D kriyo-plaka) kullanılarak yeni kriyojenik prosedürler geliştirilmiştir. V kriyo-plaka yöntemi [Yamamoto et al., 2011] kriyo-plaka üzerindeki eksplantların PVS2 vitrifikasyon dehidratasyonuna, D kriyo-plaka yöntemi ise [Niino et al., 2013] hava dehidratasyonuna dayanmaktadır. V-kriyo plaka yöntemi çilek, nane, şeker kamışı ve daha birçok bitkide uygulanmıştır [Yamamoto et al., 2012b], [Rafique et al., 2015], [Yamamoto et al., 2012a]. D-kriyo plaka yönteminde alüminyum plakalarda tutulan eksplantların kullanımı kolaydır ve çok yüksek soğutma/ısınma oranlarına sahip olmaları nedeniyle yüksek bir geri kazanım yüzdelerine sahiptirler [Niino et al., 2013]. Bu yöntem hurma ağacı, yaban mersini ve trabzon hurmasında başarıyla uygulanmıştır [Matsumoto et al., 2015], [Dhungana et al., 2015], [Salma et al., 2014].

Daws ve arkadaşlarının, 2006 yılında canlılık testinde trifenil tetrazolyum klorürün (TTC) çam bitkisi tohumlarına daha hızlı nüfuz etmesini sağlamak için kullanıldığı çalışmasından esinlenerek, Nadarajam ve Pritchard 2004 yılında vitrifikasyon çözeltisinin dokulara daha hızlı nüfuz etmesi için vakum infiltrasyon tekniğini geliştirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada, birbirinden farklı olan üç türe ait embriyo, PVS2 ile muamele edilmiştir. PVS2 ile inkübasyon süresi gerekmediğinden, embriyoların hızlı bir şekilde donmasına olanak sağlanmaktadır [Nadarajan and Pritchard 2014].

Son zamanlarda, kriyoprezervasyonun bitki türlerinin uzun süreli saklanması yanı sıra başka amaçlar için kullanılabilmesi gösterilmiştir [Wang et al., 2008], [Wang et al., 2009]. Virüslerin ortadan kaldırılması için (kriyoterapi), meristem kültürü ve

termoterapi gibi klasik virüs yok etme tekniklerinin yerine veya tamamlayıcı olarak kullanılabilceği ortaya çıkmıştır. Sürgün uçlarının kriyoterapisi ilk kez Erik Pox virüsünün ortadan kaldırılması için Prunus anaçlarında kullanılmıştır [Brison et al., 1997]. Muz, zm, patates, kayısı ve daha birçok bitki türünde kriyoterapi uygulanmıştır [Helliot et al., 2002], [Gl şeker et al., 2015].

2.2.1. Kriyokoruyucular

Kriyokoruyucu ajanlar, doku ve organları kriyojenik sıcaklıklara soğuturken ölümcül buz oluşumunu ortadan kaldırmak için kullanılır [Pegg, 2007]. Kriyokoruyucu ajanları oluşturan çeşitli kimyasalların biyokimyasal ve biyofiziksel etki biçimlerini, optimal uygulamalarını belirlemek solüsyonun geliştirilmesi için önemlidir [Polge and Smith, 1949]. Kriyoprezervasyonda en önemli etkenlerden biri olarak kriyokoruyucular gösterilebilir [Karow, 1969]. Bir kriyokoruyucuda toksisite olmaması, güvenli ve etkili olması istenen özellikler olarak söylenebilir. Memeli ve bitki hücrelerinin kriyoprezervasyonunda güvenilir toksik olmayan kriyokoruyucu ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Dimetil sülfoksit toksisitesine rağmen, tüm hücre türlerinde yaygın ve etkili olarak kullanılırken, daha az zararlı etkiye sahip olan gliserol yalnızca belirli hücre hatları üzerinde etkilidir. Bununla birlikte, Tablo 2.1'de gösterilen daha bir çok kriyokoruyucu ajan bulunmaktadır [Elliott et al., 2017].

Tablo 2.1: Kriyokoruyucu ajanlar.

Alkol ve Türevleri	Şeker ve şeker	Polimerler	Sülfoksitler ve Amidler	Aminler
Metanol ^b	Glikoz ^b	Polietilen glikol ^c	Dimetil Sülfoksit ^e	Prolin ^c
Etanol ^a	Galaktoz ^b	Polivinil	Asetamid ^b	Glutamin ^b
Gliserol ^d	Sukroz ^{a, c}	Dekstran ^c	Formamid ^b	Betain ^b
Propilen glikol ^c	Trehaloz ^c	Fikol ^c	Dimetil asetamid ^a	
Etilen	Raffinose ^c	Hidroksietil		
	Mannitol ^{a, b}	Serum proteinleri ^c (kompleks karışımı)		
	Sorbitol ^a	Süt proteinleri ^{a, b} (kompleks)		
		Peptonlar ^a		

^a Prokaryotik hücrelerde etkilidir.
^b Ökaryotik hücrelerde sınırlı derecede etkilidir.
^c Ökaryotlarda orta derecede etkilidir; genellikle kombinasyonlarla.
^d Birçok hücre tipinde çok etkilidir.
^e Son derece etkili ve tüm hücre sınıflarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Mevcut kriyoprezervasyon protokolleri memeli hücrelerinde DMSO ve FBS (Fetal Bovine Serumu)'nun birlikte kullanımını içerirken [Elliot et al., 2017], bitki kriyoprezervasyon protokollerinde PVS2 yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Memelilerde FBS prion, viral, zoonoz kontaminasyon riski taşıdığından enjeksiyon işleminin ardından organizmada immün yanıt gelişmesine neden olurken [Lange et al., 2007], DMSO mezenşimal kök hücrelerin nöronal ve osteojenik farklılaşmaya gitmesine sebep olmaktadır [Rogulska et al., 2017]. Memeli hücrelerinde dondurulmuş çözülmüş hücrelerden DMSO ve FBS'nin tamamen uzaklaştırılması pahalı ve zaman alan bir süreç olmakla beraber çok sayıda hücrenin kaybına da neden olmasından dolayı elzemdir. [Thirumala et al., 2010].

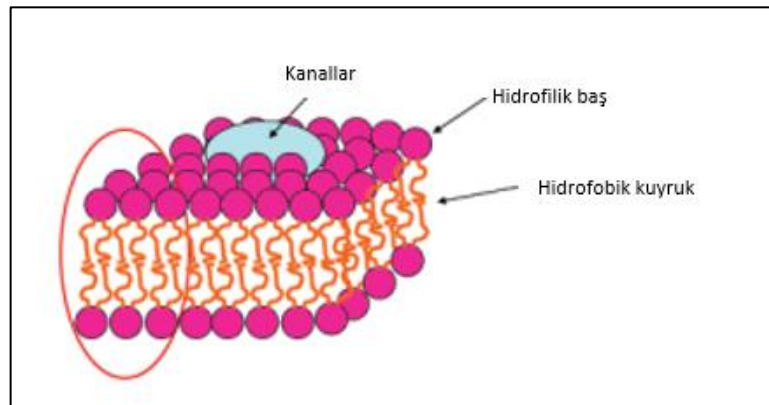
Bitkilerde ise kriyoprezervasyon sonrası rejenere olan eksplantların canlılıklarının ve genetik olarak kararlılıklarının sağlanması kriyoprezervasyonunun temel amacıdır. Kriyoprezervasyonun neden olabileceği genetik kararsızlığa

eksplantların çok düşük sıcaklıklar, yüksek osmotik basınç, dehidratasyon gibi aşırı fiziksel koşullar ve DMSO gibi toksik kriyokoruyuculara kimyasal olarak maruz kalmaları neden olmaktadır [Panis and Lambardi, 2005]. Ayrıca, doku kültürü koşullarının neden olduğu stres koşullarının da eklenmesi, kriyoprezervasyon sonrası bitki eksplantlarının canlılıklarını kaybetmesine sebep olabilir. Günümüze kadar farklı özelliklerle toksisitesi görece fazla olan DMSO'nun konsantrasyonunun azaltılmasına yönelik vitrifikasyon solüsyonları geliştirilmiştir, örn., PVS1 [Uragami et al., 1989], PVS2 [Sakai et al., 1990], PVS3 [Nishizawa et al., 1993] ve VSL [Suzuki et al., 2008], (Tablo 2.2). Ancak yine de bitki kriyoprezervasyonu için çoğunlukla kullanılan vitrifikasyon solüsyonu % 15 DMSO (v/v) içeren PVS2 dir [Kırdök, 2015].

Tablo 2.2: Farklı vitrifikasyon solüsyonları (v/v).

PVS1	PVS2	PVS3	VSL
% 30 gliserol	% 30 gliserol	% 50 gliserol	% 20 gliserol
% 15 etilen glikol	% 15 etilen glikol	MS+% 50 sukroz	% 30 etilene glikol
MS+% 5 sukroz	MS+0.4 M sukroz		MS+% 5 sukroz
% 15 DMSO	% 15 DMSO		% 10 DMSO
			10 mM CaCl ₂

Hücre zarı toksisitesi, PVS2'de bulunan DMSO ile ilişkilendirilen bir spesifik toksisitedir. Hücre zarı katmanları Şekil 2.3'te görüldüğü üzere, dış ve iç yüzeylerdeki hidrofilik baş gruplarından, membranın ortasında bulunan hidrofobik yağ asidi zincirlerinden oluşmaktadır [Ginzburg and Balijepalli, 2007].



Şekil 2.3: Hücre Zarının Yapısı.

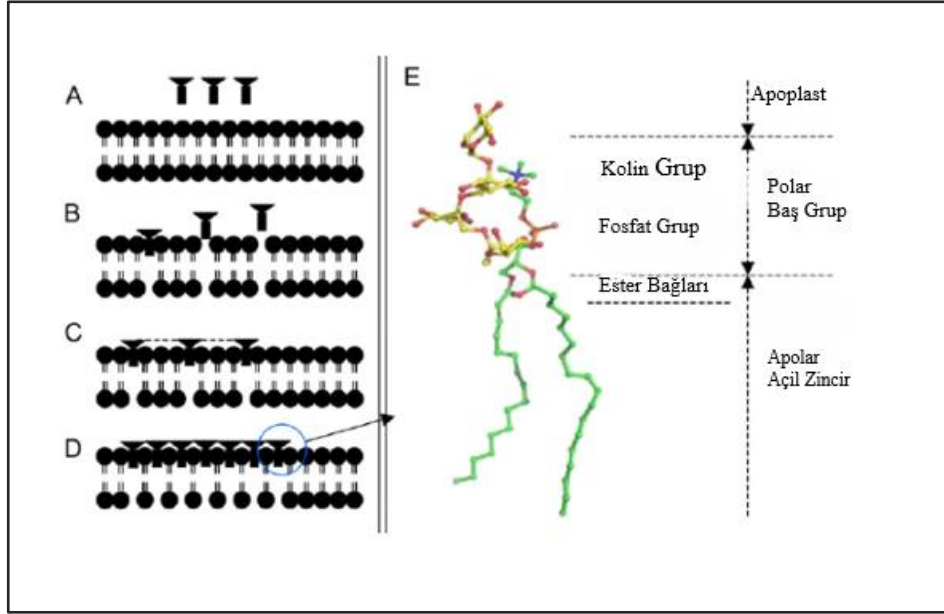
Moleküllerin hücre zarlarına nüfuz etme kabiliyeti lipofilite ile artarken, moleküler boyutun artmasıyla veya hidrojen bağları oluşturma yeteneği ile azalır. [Naccache and Sha'afi 1973]. Bir DMSO-su hidrojen bağının ömrü, bir su-su hidrojen bağının ömrünün birkaç katıdır [Bourne and Shearer 1994]. DMSO hidrojenin sülfenil (SO) oksijeni, suya, suyun kendi hidrojen moleküllerinden daha güçlü bir şekilde hidrojen bağı ile bağlanır [Kirchner and Rehier 2002]. Su ile DMSO'nun bağlanma yeteneği sıcaklık arttıkça azalır [Anchordoguy et al., 1992]. Membranlar, DMSO'dan daha fazla su ile hidratlanır ve DMSO'nun dışlanması membran arayüzünde strese neden olur [Westh, 2004]. Sıcaklığın artması ile birlikte, DMSO hücre zarının hidrofilik baş grupları etrafında lokalize olur. Bu durum DMSO'nun toksisitesini açıklamaktadır [Westh 2004], [Sum and Pablo, 2003], [Arakawa et al., 1990].

PVS2 solüsyonu ile yapılan literatürdeki çalışmalarda, 48 saat *in vitro* koşullarda çimlendirilen *Arabidopsis thaliana* L. fideciklerinin kriyoprezervasyonu sonucunda %96,8 canlılık elde edilirken, 72 saat çimlendirilen fideciklerin kriyoprezervasyonu sonrasında canlılık elde edilememiştir. Bu canlılık farkı, vitrifikasyon aşamasında kullanılan kriyokoruyucuların içeriği ve konsantrasyonunun (DMSO gibi toksik maddelerin olması) ozmotik hasar ve dehidratasyon stresi gibi abiyotik streslere yol açarak bitkilerde oksidatif strese neden olmalarıyla ilişkilendirilebilir [Ren et al., 2013]. Kriyokoruyuculardan kaynaklanan oksidatif stresi azaltmanın en etkin yolu farklı kriyokoruyucu solüsyonların geliştirilmesidir [Benson and Bremner, 2004].

2.3. Frukstanlar

Frukstanlar, doğada nişastadan sonra en yaygın bulunan makromoleküllerden biridir ve birçok işlevsel özellikleri ile de öne çıkmaktadırlar. Sukroz ve nişasta, tropik ve yarı tropikal otlarda birincil bitkisel depolama karbonhidratlarıyken, ılıman ve serin bölge otları esas olarak fruktoz polimerlerini biriktirir [French and Waterhouse, 1993]. Frukstanlar mikroorganizmalarda, bitkilerde ve daha az miktarda *Dasycladales* ve *Cladophorales*'in bazı mantarlarında ve alg türlerinde görülür. Yüksek yapıli bitkilerin % 15'inde depolanan ana enerji formlarından biri olarak kabul edilmektedir [Hendry, 1993]. Bitkilerde enerji depolanması, ozmotik dengeleyici, biyofilm oluşumu, bitki bağışıklık sistemini güçlendirici, abiyotik streslere karşı direnç mekanizmalarını tetikleyerek bitki ve mikroorganizmaların kurak şartlarda dayanıklılığını arttırmak gibi

çok farklı biyolojik sistemlerde önemli rolleri vardır. Dikotil bitkilerde fruktanlar, kökler ve yumrular gibi yeraltı depolama organlarında uzun süreli depolanan karbonhidratlar olarak birikir [Van den Ende and Van Laere, 2007]. Buğdayda yapılan bir çalışmada, buğdayın bitkisel dokularındaki en önemli yedek karbonhidratlardan biri olduğu ve buğday çekirdeği gelişiminde önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir [Pollock and Cairns 1991], [Schnyder 1993]. Fruktanlar bitki vakuolünde sentezlenir. Ayrıca giderek artan kanıtlar fruktanların apoplast, floem ve ksilem dokularında da mevcut olabileceğini göstermektedir [Mancilla-Margalli and Lopez 2006]. Fruktozil ve glikoz rezidülerinin konumu arasındaki bağlantı tipine bağlı olarak farklı fruktan molekülleri ayırt edilebilir [Lewis, 1993]. Biyosentezleri sırasında sıcaklıktan az etkilenmelerinden dolayı fruktan depolanması, bitkilere düşük sıcaklıklarda fizyolojik bir avantaj sağlamaktadırlar. Tahılların (buğday, yulaf ve arpa) kışın düşük sıcaklıklara maruz kaldığında fruktan biriktirdiği bilinmektedir [Meier and Reid 1982], [Pontis and Del Campillo 1985], [Pollock 1986], [Chatterton et al. 1989], [Prud'home et al. 1993]. Nişasta biyosentezi 10°C'nin altındaki sıcaklıklarda durma noktasına gelirken, fruktan biyosentezi sıcaklıktan daha az etkilenmektedir. Bu durum fruktan depolayabilen bitkilere düşük sıcaklıklarda fizyolojik bir avantaj sağlamaktadır [Livingston, 2009]. Çarpıcı bir şekilde, fruktan biriktiren türler soğuk ve kuru ortamda çok bulunurken tropikal ve su ortamlarında yoktur [Hendry, 1993]. Bu özelliklerinden dolayı doğal kriyokoruyucu moleküller olarak bilinmektedir [Versluys et al., 2018]. Hücre membranları ile etkileşimi sonucu bu koruma etkisinin ortaya çıktığı düşünülmüştür [Hincha et al., 2002]. Model membran çalışmaları fruktanların lipitlerle etkileşime girdiğini ortaya koymuştur [Vereyken et al., 2001], [Demel et al., 1998]. Fruktanların membranlar ile olan ilişkisi Şekil 2.4'te gösterilmiştir [Valluru and Van den Ende, 2008].

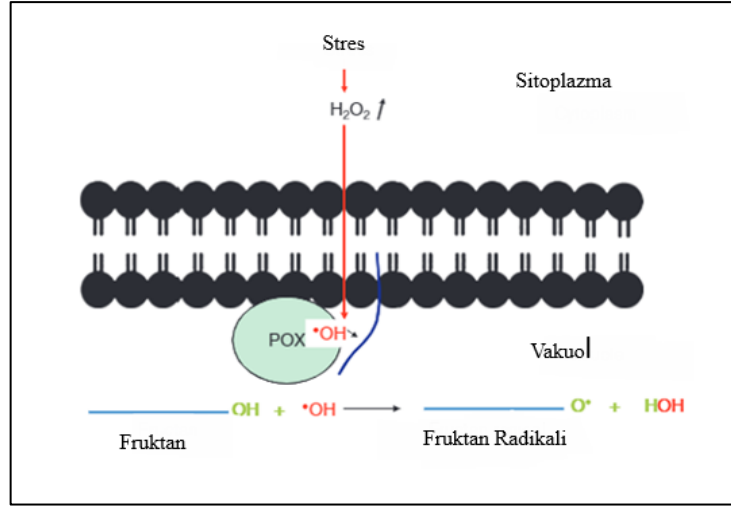


Şekil 2.4: Fruktan-Membran İlişkisi.

Şiddetli abiyotik stresler, hüresel bileşiklerde zararlı değişikliklere neden olur. Şekerler, bu zararlı değişiklikleri önleyebilen metabolitlerden biri olarak kabul edilebilir. Uzun süreli stres dönemlerinde, örneğin dehidrasyon zamanlarında bitkinin hayatta kalması fruktanlara bağlanmıştır [Pontis, 1989], [Roover et al., 2000]. Tahıllarda fruktan birikimi, büyümeye bağlı su akışlarını sağlayabilmektedir ve alternatif bir depolama şekeri olan aşırı miktarda sukrozun ozmotik problemlerini azaltabilmektedir [Peukert et al. 2014]. Abiyotik stres toleransındaki rolleri ve lipid çift katmanları ile doğrudan etkileşimleri doğrulanmıştır [Hinch et al., 2006].

Fruktanların abiyotik stres koşullarında reaktif oksijen türevlerini yakalayıp antioksidan gibi rol oynadıkları da bilinmektedir [Bolouri-Moghaddam et al., 2010], [Peshev et al., 2013]. Vakuolar bazlı fruktanlar polifenollere benzer güçlü antioksidan özelliklere sahiptir ve hidroksil radikal yakalama potansiyelleri sukroz ve monosakkarit olan glikoz ve fruktozu aşar [Peshev et al., 2013]. Vakuolar ve apoplastik fruktanların bileşimlerinin, stres altındaki bitkilerin ROS (Reactive Oxygen Species) yakalama verimliliğini etkilediği ileri sürülmektedir [Matros et al., 2015].

Fruktanlar, bitki hücrelerinin içerisindeki büyük merkezi kofulun etrafını saran zar olan tonoplastı stabilize etmek için konumlanır, bu zarların yakınındaki serbest radikalleri temizler. Bu süreçte, fruktanlar daha az zararlı fruktan radikaline dönüştürülür [Van den Ende and Valluru, 2009], [Takahama, 2004]. Bu mekanizma Şekil 2.5' te [Bolouri-Moghaddam et al., 2010] detaylı şekilde gösterilmektedir.



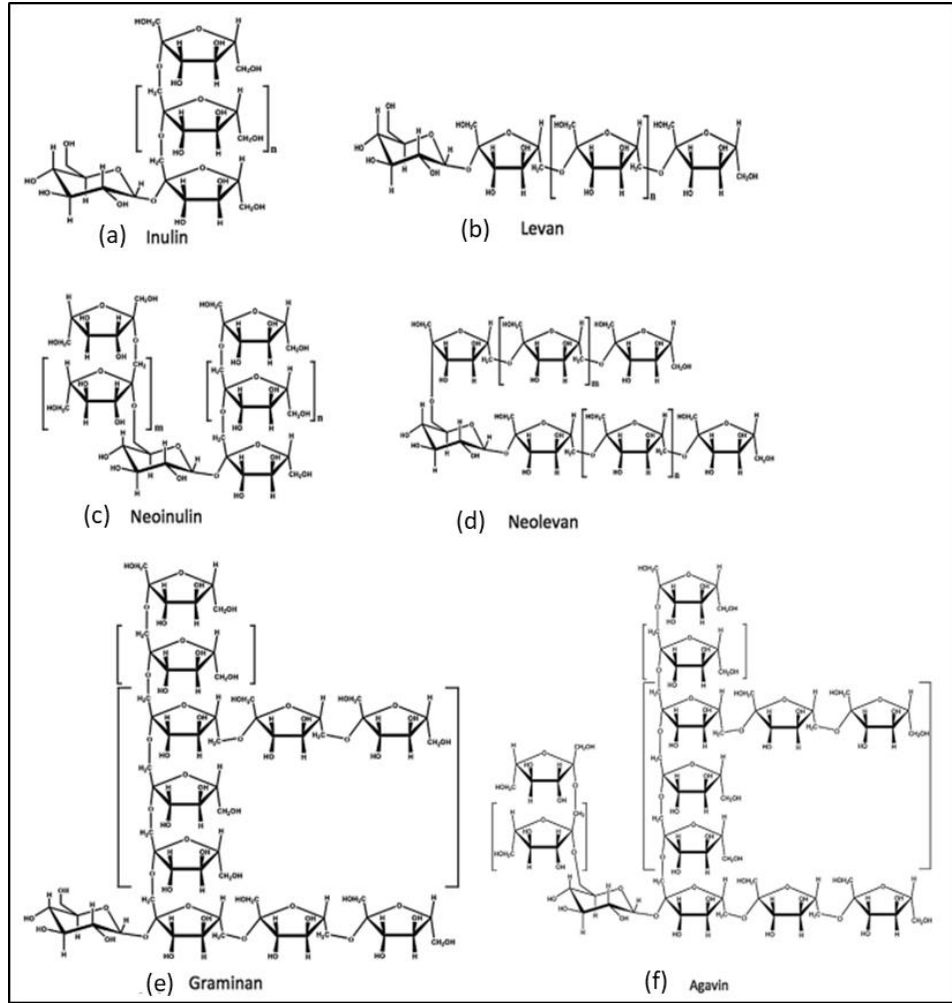
Şekil 2.5: Fruktanların Antioksidan Rolü

2.3.1. Fruktan Tipleri

Yapılarında bulunan glikosidik bağların büyük çoğunluğunu β - (2,1) ve/veya β - (2,6) fruktosil-fruktoz tipi bağların oluşturduğu karbonhidratlar olarak tanımlanırlar [Lewis, 1993]. β -(2,1) ve β -(2,6) bağlantıları hem mikrobiyal hem de bitki kaynaklı fruktanlarda meydana gelmektedir [Toksoy Öner et al., 2016], [Van den Ende, 2013]. Fruktanlar, levan ve inülin olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. [Lewis, 1993]. Levan grubu ve dallanmış levandaki fark, fruktofuranozil (Fru_f) ünitelerinin konumudur. Levan grubunun ana zincirinde (β -2,6) konumunda Fru_f üniteleri bulunurken, dallanmış levanda Fru_f üniteleri ana zincirde (β -2,1) pozisyonunda bağlanmaktadır. İnülin de ana zincire (β -2,1) bağlı Fru_f üniteleri bulunur. Yan gruplar ise (β -2,6) pozisyonunda ana zincire bağlanmaktadır Yapısında inülin (β -2,1) ve levan (β -2,6) tipi bağları eşit ağırlıkta barındıran ve 1,6-kestotetraoz birimlerinin oluşturduğu fruktanlar graminan tipi fruktandır. Agavin tipi fruktanlar ise, ana zinciri içinde glukoz bulunduran neo-serisi fruktanlar ile graminan ve yeni (neo) serisi fruktanların karışımı bir yapıya sahiptirler [Versluys et al., 2018], [Toksoy Öner et al., 2016].

Şekil 2.6'da gösterilen levan ve inülin tipi fruktanlar [Munoz Gutierrez et al., 2009] hem mikrobiyal hem de bitkisel kaynaklardan elde edilirken; graminan, neo-serisi ve agavin tipi kompleks fruktanların bilinen tek kaynağı bitkilerdir. Graminan, esas olarak monokotlarda, özellikle ot ve tahıllarda bulunur. İnülin kuşkonmaz gibi bitkilerde bulunurken, levan buğdayda bulunmaktadır [Van den Ende et al., 2004].

Graminan, levan ve neokestozdan türetilen fruktanlar, otlarda, genel olarak gövde de, yaprak kınlarında, uzun yaprak tabanlarında ve daha az ölçüde olacak şekilde yaprak uçlarında ve köklerinde kısa süreli depolama bileşikleri olarak işlev görür. Mikrobiyal ve bitkisel fruktanların en önemli farkları zincir uzunluklarıdır [Maleux and Van den Ende, 2007].



Şekil 2.6: Fruktan Tipleri. a) Inulin, b) Levan, c) Neoinulin, d) Neolevan, e) Graminan ve f) Agavin.

Farklı fruktan tiplerinde yapılan çalışmalarda, oda sıcaklığındaki fizyolojik dehidratasyon sırasındaki membran etkileşimleri lipozom modelleri ile incelenmişlerdir ve inülin ile dallanmış *Bacillus* levanının hidrofilik lipit baş grupları arasından membrana girerek likit kristalin faz geçişini sağladığı ve bu yolla membran stabilizasyonunu gerçekleştirdiği belirlenmiştir [Vereyken et al., 2003].

2005 yılında fruktanların kriyokoruyucu olarak kullanımı ilk kez literatürde yer almıştır. Yapılan çalışmada inülinin 0°C'ın altındaki sıcaklıklarda uzun süre liyofilize

edilmiş lipozomların stabilitesini sağladığı gösterilmiştir. Dekstran, sukroz ve trehaloz ile karşılaştırıldığında inülinin daha iyi etkiler gösteren bir kriyokoruyucu olduğu anlaşılmıştır [Hinrichs et al., 2005]. Diğer bir çalışmada ise inülinin sığır plazma proteinleri için glikoz ve sukrozdan daha iyi bir kriyokoruyucu olduğu gösterilmiştir [Furlan et al., 2013]. Buna ek olarak Higashiya ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (2010), Rakkyo Japon arpacık soğanından özütlenen graminan tipi fruktanların (β -2,6: β -2,1 = 3:1, 6-100 kDa) hücrel kriyokoruyucu etkileri gösterilmiştir. Japon arpacık soğanından kolayca elde edilebilmesi, bol miktarda bulunması ve yüksek çözünürlüğünden dolayı graminan tipi bu fruktan seçilmiştir. Bu çalışmada fare hibridoma 2E3 hattı PBS (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi), %10 DMSO ve 100 mg/L rakkyo fruktanı içeren kriyokoruyucu içerisinde dondurulan hücrelerin canlılığının kontrole göre üç kat daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Sonrasında Ogawa ve arkadaşları 2014 yılında yaptıkları çalışmada, graminan tipi bir fruktan olan rakkyo fruktanı ile düşük ağırlıklı inülin (1.4 kDa), yüksek ağırlıklı inülin (162 kDa) ve levan tipi fruktanların donma stresine karşı yetenekleri karşılaştırılmıştır. Rakkyo fruktanı ve düşük ağırlıklı inülin PBS içerisinde kolayca çözünürken, yüksek ağırlıklı inülin ve levanın çözünürlüğünün daha düşük olması nedeniyle bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda fruktan kullanılmıştır. Rakkyo fruktanda korunan 2E3-O hücrelerinin yaşayabilirliği % 97.1 ile en yüksek iken, %92.4 ile düşük ağırlıklı inülinin, en yakın sonucu verdiği belirlenmiştir. Mikroskop altında, rakkyo fruktanı içeren solüsyondaki hücreler ve FBS-DMSO içeren solüsyonda korunan hücreler arasında morfolojik bir fark belirlenmemiştir. Bu sonuçlar, rakkyo fruktanın, hücreleri donma stresine karşı koruyabildiğini ve bunu diğer fruktan türlerinden daha yüksek yapabilme yeteneği olduğunu göstermiştir. Diğer bir çalışmada ise graminan fruktanı DMSO ile birlikte rekombinant antikor üreticisi Çin hamster ovarium fibroblast hücre hattı (CHO-DP12) ve insan hepatoma hücre hattı (HepG2) gibi memeli hücre hatlarında kriyokoruyucu olarak kullanıldığında bu hücrelerin metabolik aktivitelerini koruduğu gözlemlenmiştir. Rakkyo fruktan-DMSO'da korunan CHO-DP12 hücrelerinin yaşama kabiliyeti, çözünmesi sonrası FBS-DMSO'da korunanlara benzer tespit edilmiş, Rakkyo fruktan ve DMSO'da korunan HepG2 hücrelerinin canlılığı, yaşayabilir hücre sayısı, albümin salgılanması miktarı ve mRNA ekspresyonu, FBS-DMSO' da korunanlara benzerdir. DMSO gibi diğer kriyoprotektanlarla birleştirildiğinde rakkyo fruktanın, FBS'ye alternatif bir kriyoprotektan olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [Ogawa ve et al., 2014].

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali ve Fruktañlar

Tez çalışmasında model bitki olan *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 tohumları, Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne ait serada yetiştirilen bitkilerden elde edilmiştir. Kriyoprezervasyon çalışmalarında kullanılmak üzere tohumlar, *in vitro* koşullarda yarı-güçlü MS (Murashige ve Skoog, Duchefa) ortamında gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan fruktanlar ise, Marmara Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü Öğretim Üyesi ve aynı zamanda bu tezin desteklediği 118M607 nolu Tübitak projesinin yürütücüsü Prof. Dr. Ebru TOKSOY ÖNER'den temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Malzemeler

A. thaliana L. Col-0 tohumlarının *in vitro* koşullarda çimlendirilmesi ve kriyoprezervasyon çalışmalarında eklenen kimyasallara ait bilgiler Tablo 3.1 ve Tablo 3.2 de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: *İn Vitro* Çimlendirme Aşamasında Kullanılan Kimyasallar.

<i>A. thaliana</i> L. Col-0 Besi Yeri İçerikleri		
Kimyasal Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
MS	Duchefa	M022
Gelrite	Duchefa	G1101
Sukroz	Duchefa	S0809

Tablo 3.2: Kriyoprezervasyon Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog No
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Merck	K33960252
Gliserol	Merck	1.04093.2500
Sukroz	Merck	1.07651.1000
Etilen Glikol	Merck	K34762849
Sıvı Azot	Messer	-

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Tez kapsamında kullanılan tüm cihazlar Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3: Kullanılan Cihazlar.

Cihaz Adı	Cihazın Modeli	Firma
Hassas terazi	TP3030	Denver Instrument
Otoklav	HV-110L	Hirayama
Etüv	DIN 12880	Binder
Bitki büyütme odası	RivaCold	Genpa Mühendislik
pH metre	pH209	Hanna Instrument
Manyetik karıştırıcı	MR3001	Heidolph
Sterilizatör	Steri 350	Swiss Made
Laminar akımlı kabin	Cleanair	PMU Company
İklimlendirme dolabı	WTC	Binder
Derin dondurucu (-20 °C)	GS26DN13NE	Simens
Buzdolabı (4 °C)	RG 1380	İndesit
SA tankı	ARPEGE 40	Dmc-airliquide
Sıcak su banyosu	D-77960	Julabo
Vorteks	AC230	VNR International
Mikrodalga fırın	MW71E	Samsung
Otomatik pipet	3862243	Eppendorf Research
DSC (Diferansiyel taramalı kalorimetre)	Exstar DSC- 7020	Seiko

3.2. Metot

3.2.1. Frukta nların Camsı Geçiş Sıcaklıklarının Hesaplanması

Hücrelerarası camsı geçiş sıcaklığının (T_g) hesaplanması GTÜ, MBG bölümü, Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarında bulunan DSC 7020 Exstar cihazı ile gerçekleştirildi. 11 tane fruktan solüsyonu, 10 mg/ml'den, 0.5 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.1 mg/ml olmak üzere PBS (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi) ile sulandırıldı. Solüsyonlar, metal kaplardan taşmayacak (5 µl) şekilde pipet yardımı ile eklendi. Hassas terazide yapılan tartım sonucu bulunan miktar, miligram cinsinden parametre olarak yazıldı. Metal kaplar içerisinde bulunan solüsyonlar Perkin Elmer pensesi ile sıkıştırıldıktan sonra cihaza uygun şekilde yerleştirildi (Şekil 3.1). Kontrol olarak içerisinde solüsyon bulunmayan metal tavalar kullanıldı. Örnekler 25 °C'den başlayıp, -150 °C'ye kadar soğutuldu, dakikada 10 °C düşürüldü. -150 °C'ye geldikten sonra tekrar 20 °C' ye yükseltildi.



Şekil 3.1: Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Cihazı (DSC).

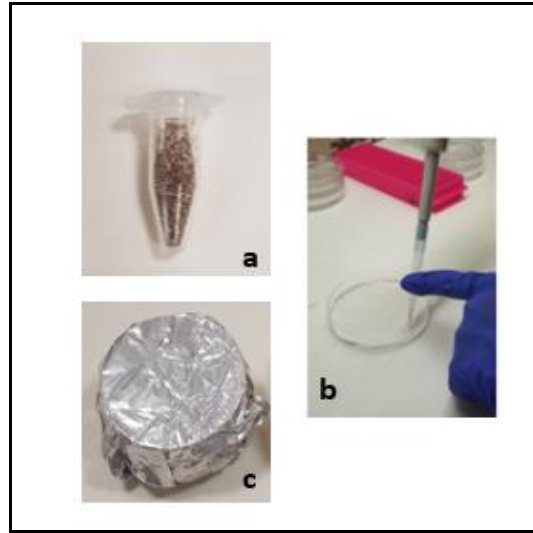
3.2.2. *Arabidopsis thaliana* L. Bitkisinin *İn Vitro* Koşullarda Çimlendirilmesi ve Kriyoprezervasyon İçin Steril Fidelerin Elde Edilmesi

A. thaliana L. (Col-0), tohumlarının yüzey sterilizasyonu, %70 EtOH solüsyonu ile 2 dakika ve ardından %15 NaOCl ile 10 dakika çalkalanması ile yapılmıştır. Tohumlar 3 kere dH₂O ile yıkanmıştır. Tohumların daha sonra bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen yarı-güçlü hazır MS0 besi ortamına (Duchefa, Tablo 3.4) %0.02 agaroz ile pipet yardımıyla (Şekil 3.2) aktarımı yapılmıştır.

Tablo 3.4: Besi Ortamı.

BESİ ORTAMI	1 LİTRE
^{1/2} MS	4,405 gr
Sukroz	20 gr
Gelrite	3 gr
pH	5.8

Tüm tohumlar, çimlenmenin senkronizasyonu için alüminyum folyo ile sarılarak 48 saat 4°C’de tutulmuştur. Daha sonra bitki büyütme odası koşullarında 8/16 saat fotoperiyot olacak şekilde 22±2°C sıcaklıkta, 4000 lux ışık şiddetinde 48 ve 72 saat boyunca çimlendirme için aktarılmıştır.



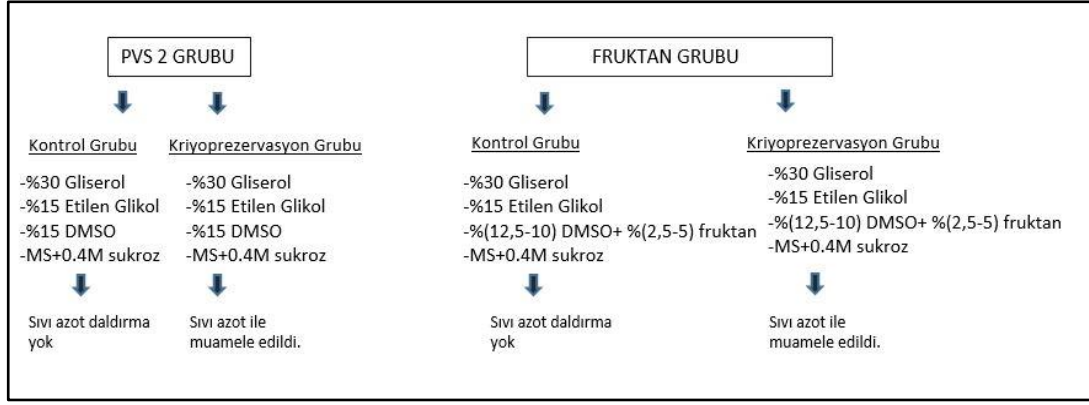
Şekil 3.2: *A. thaliana* L. sterilizasyonu. a) *A. thaliana* (Col-0) tohumları. b) Yarı-güçlü MS0 katı besiyerine ekim. c) senkronize olması için 4°C’ye aktarılan tohumlar.

3.2.3. *Arabidopsis thaliana* L. Fideciklerinin (48 Saat Çimlendirilen) Vitrifikasyon Tek Aşamalı Dondurma Yöntemi İle Kriyoprezervasyonu

Bitki büyütme odası koşullarında 48 saat çimlendirilen fideciklerin kriyoprezervasyonu, Wang ve He (2009) tarafından belirtilen kriyoprezervasyon yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Kriyoprezervasyon protokolünde bulunan bütün solüsyonlar, her deney öncesi taze olarak hazırlanmış ve otoklav ile steril edilmiştir. Solüsyonlar, otoklav sonrası 4°C'de muhafaza edilmiştir

Kriyoprezervasyon aşağıdaki basamaklara uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir:

- Ozmokoruma: 48 saat çimlendirilen fidecikler, 1 ml kriyokoruyucu solüsyonu (2 M gliserol ve 0.4 M sukroz içeren sıvı MS besiyeri) ile 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Vitrifikasyon: Yükleme solüsyonu, yoğun derişimli vitrifikasyon solüsyonu (PVS2; 0.4M sukroz içeren MS besiyeri içinde %30 (v/v) gliserol, %15 (v/v) etilen glikol ve %5 (v/v) DMSO) ile yer değiştirildi ve fidecikler PVS2 solüsyonunda 0°C'da 50 dakika inkübe edildi. PVS2 ile muamele edilen gruplar (Şekil 3.3), fruktan grubu ile muamele edilen grubun kontrolü olarak kabul edildi. Fruktan grubu ise, PVS2 solüsyon içeriğine ek olarak, farklı (0-300mg/L) konsantrasyonlarda fruktan içeren solüsyonlar ile muamele edildi. PVS2 içerisindeki DMSO (%15), %2,5 - %5 oranında azaltılarak yerine fruktan eklendi. PVS2 ve fruktan gruplarındaki vitrifikasyon solüsyonunun, kriyoprezervasyon sonrası fideciklerin canlılık yüzdelerine olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla sıvı azot ile muamele edilen grup kriyoprezervasyon grubu, sıvı azot ile muamele edilmeyen grup ise kontrol grubu olarak adlandırıldı. Tüm deney grupları, vitrifikasyon solüsyonu ile 50 dakika 0°C' de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, kriyoprezervasyon grupları sıvı azot ile muamele edilirken, sıvı azota daldırılmayan kontrol gruplarında doğrudan yıkama aşamasına geçildi.



Şekil 3.3: Kriyoprezervasyon Deney Grupları.

Vitrifikasyon solüsyonunda tez kapsamında kullanılan fruktanlar Tablo 3.5’de gösterilmiştir. Tez kapsamındaki fruktan gruplarına ek olarak, dH₂O ve PBS’nin de canlılık üzerine etkisi belirlenmiştir.

Tablo 3.5: Kullanılan Fruktanlar

Kullanılan Fruktanlar		
Fruktoz	P95 İnülin	Joanlevan
HL 60	Agavins	Graminan
Sukroz	Hp İnülin	Sinerji İnülin
D-Glukoz	M6 Levan	

- Hızlı dondurma ve çözme: Vitrikiye edilen kriyoprezervasyon gruplarındaki fidecikler, hızla doğrudan sıvı azota daldırıldı ve en az 1 saat sıvı azotta bekletildi. Sıvı azotta dondurulan örnekler, daha sonra 40°C’ da su banyosunda 1 dakika ara ara sallayarak çözüldü (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Eksplantların hızlı dondurulması ve çözülmesi. a) Hızlı dondurma aşaması, b) Sıvı azot sonrası çözme aşaması.

- Yıkama: Tüm gruplar, MS+1.2 M sukroz içeren yıkama solüsyonu ile 40 dakika (her 10 dakikada bir solüsyon tazelenerek) muamele edildi.
- Geri kazanım: Fidecikler %3 şeker ve %0.9 agar içeren MS besi ortamında bitki büyütme odası koşullarında 8/16 saat fotoperiyot olacak şekilde $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta çimlenmeleri için (denemeler 20 fidecik olacak şekilde) aktarıldı ve canlılıkları yüzde olarak 15 günlük gelişimlerini takiben hesaplandı. Besin ortamları her deney öncesi taze olarak hazırlandı.

3.2.4. Verilerin Toplanması ve İstatiksel Analizler

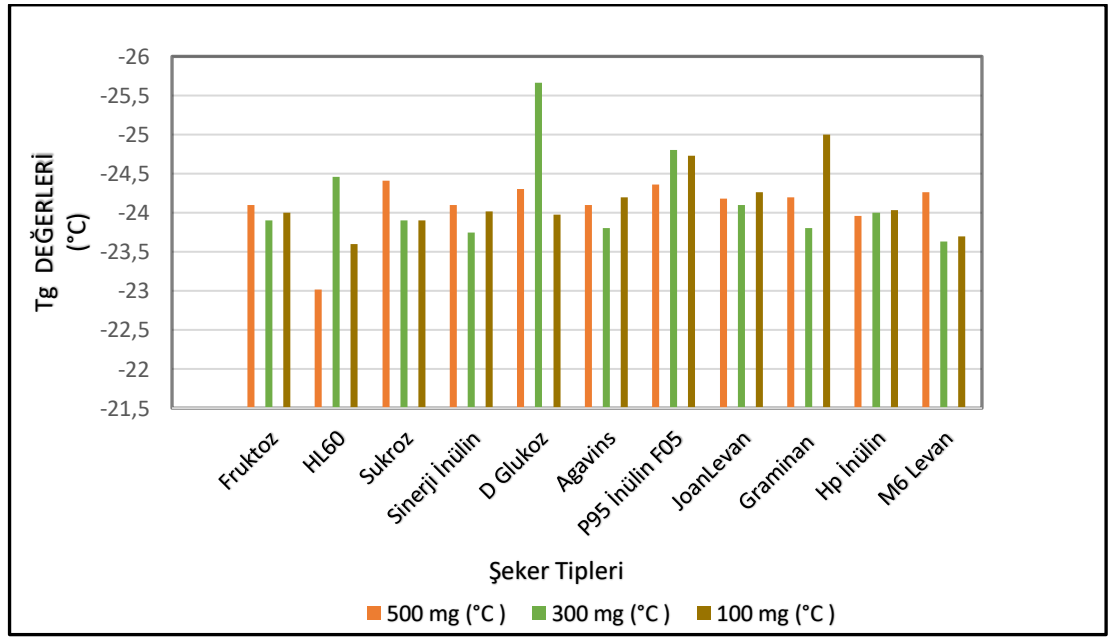
Kontrol ve kriyoprezerve edilen fideciklerin canlılıkları (sağlıklı gövdecik oluşumu) 15 günlük gelişimlerini takiben hesaplandı. Denemeler, en az 20 fidecik kullanılarak yapıldı ve denemeler en az 2 kez tekrar edildi. İstatistiksel analizler LSD çoklu karşılaştırma testi ile GraphPad Prism 6.0 yazılımı kullanılarak yapıldı.

4. SONUÇLAR

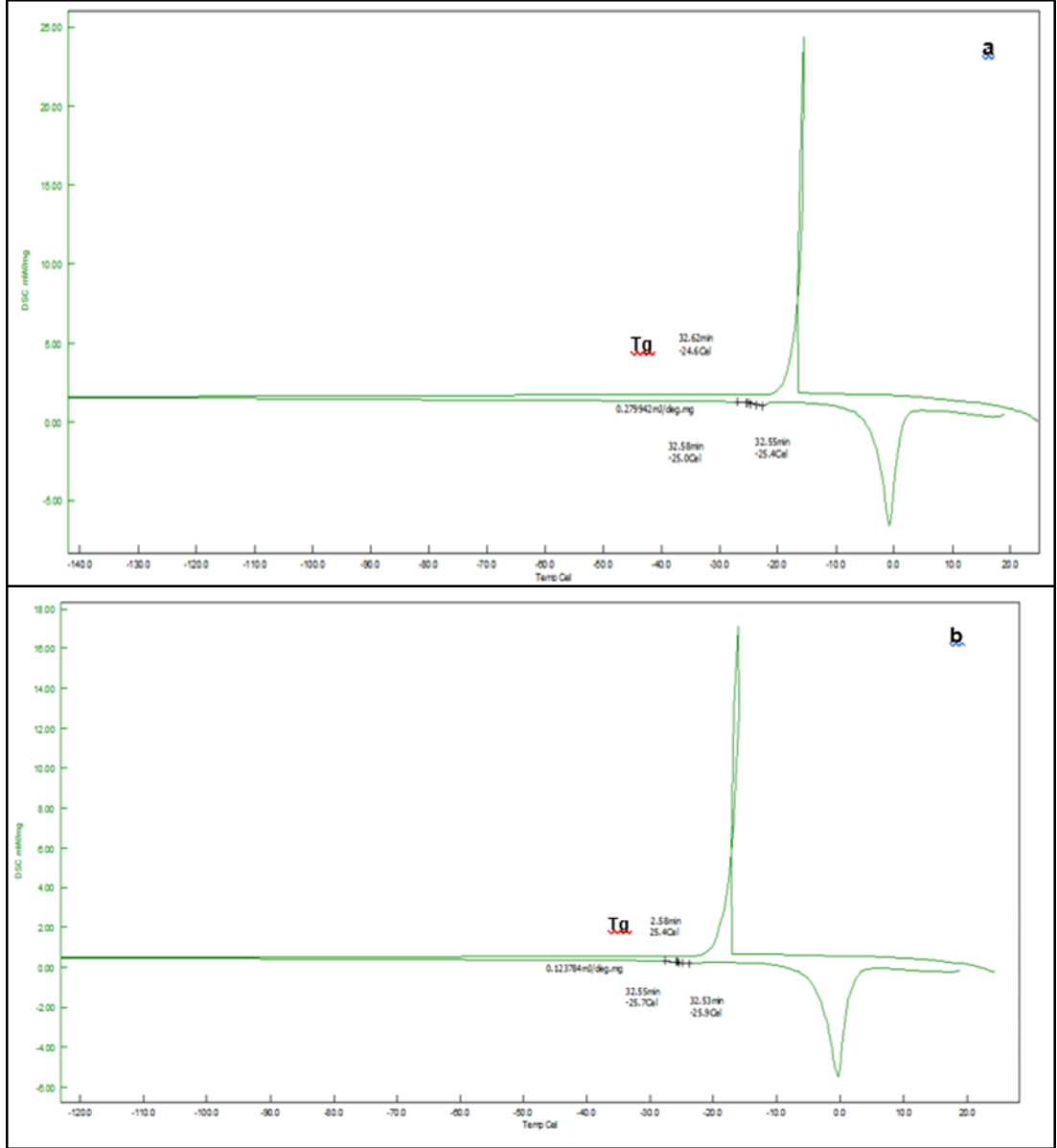
4.1. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Çalışmaları

4.1.1. Fruktanların Camsı Geçiş Sıcaklığının Hesaplanması

Tüm analizler sonucu, denenen farklı fruktanların Tg değerleri -23°C ile $-25,6^{\circ}\text{C}$ arasında değişmekle birlikte (Şekil 4.1), sırasıyla 300 mg/L D-glukoz ve 100 mg/L graminanda görece en düşük Tg değerleri elde edilmiştir. DSC cihazından alınan graminana ve D-glukoza ait Tg değerlerini gösteren ısı akış DSC analiz şekilleri sırasıyla Şekil 4.2a ve 4.2b’de sunulmuştur.



Şekil 4.1: Fruktanların Camsı Geçiş Sıcaklığı (Tg) Değerleri.



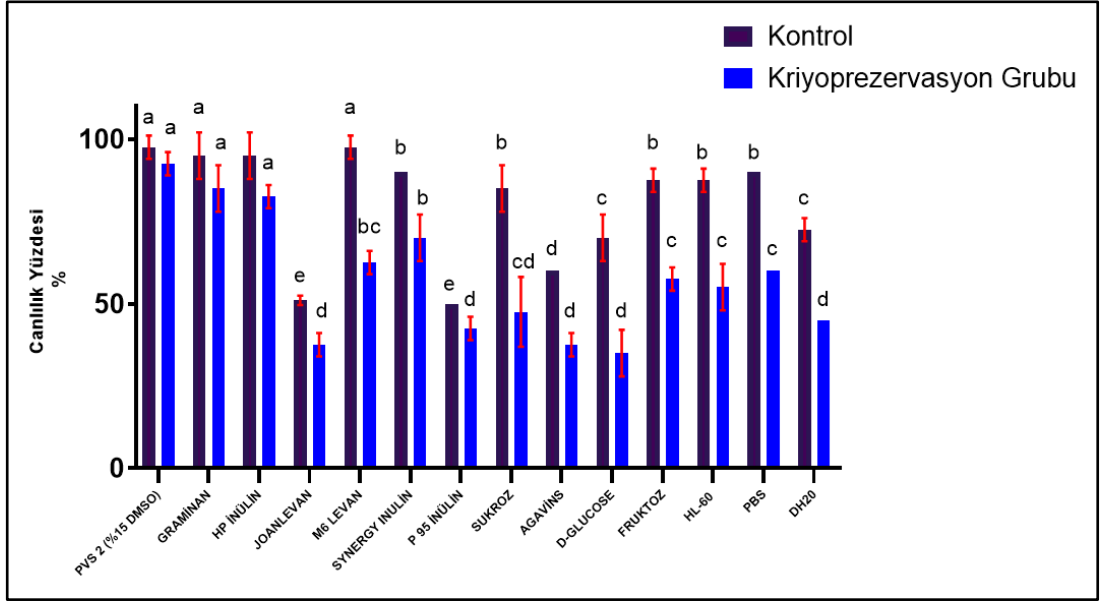
Şekil 4.2: a) 100 mg/L graminana ait DSC analiz grafiği, b) 300mg/L D-glukoza ait DSC analiz grafiği.

4.2. 48 Saat Çimlendirilen *Arabidopsis thaliana* L. Fideciklerinin Vitrifikasyon Tek Aşamalı Dondurma Yöntemi İle Kriyoprezervasyonu

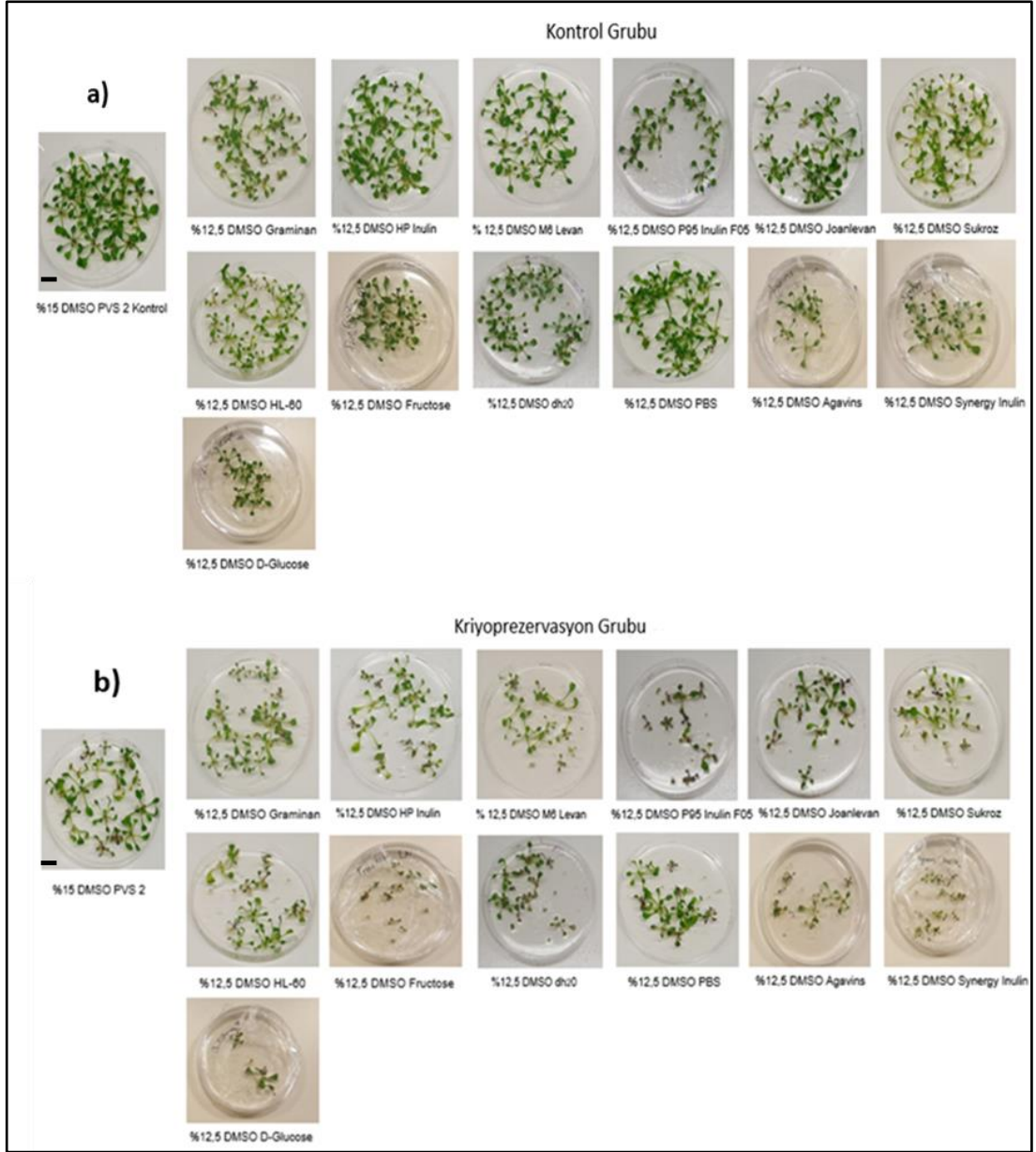
4.2.1. 100 mg/L Frukta n Konsantrasyonu Denemeleri

İlk denemeler, DSC cihazından alınan veriler sonucunda grafiklerin anlamlı bir sonuç vermemesi dolayısıyla tüm fruktan tiplerinde gerçekleştirilmiştir ve 100 mg/L fruktan konsantrasyonu içeren vitrifikasyon solüsyonları ile yapılmıştır. PVS2 solüsyonu içerisindeki DMSO oranı (%15), fruktan gruplarında ise %2.5 azaltılmış ve yerine fruktan solüsyonu eklenmiştir. Tüm fruktan gruplarında, 15 günlük gelişimleri sonucu canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır. 11 fruktan tipi, buna ek olarak dH₂O ve PBS denemelerinde elde edilen veriler sonucunda 48 saat çimlendirilen kontrol gruplarında PVS2 ile graminan, Hp inülin, M6 levan ve sinerji inülin ile muamele edilen fideciklerin canlılıkları arasında istatistiksel fark hesaplanmazken, özellikle joanlevan ve P95 inülin ile muamele edilen fideciklerde en düşük canlılık yüzdeleri tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Kriyoprezerve edilen örneklerde ise en yüksek canlılık yüzdesi (%90) PVS2 ile elde edilmiştir. Bununla birlikte vitrifikasyon solüsyonuna 100 mg/L graminan ve hp inülin eklenen örneklerde, sırasıyla %85, %80 canlılık görülmektedir. Dolayısıyla PVS2 solüsyonunda DMSO miktarının %12,5'e azaltılması ve 100 mg/L graminan ve inülin eklenmesi ile elde edilen canlılık yüzdesi PVS2 ile elde edilen sonuç ile karşılaştırıldığında istatistiksel bir fark görülmemektedir. Denenen diğer fruktan tiplerinde ise kriyo sonrası canlılıklar azalmış ve en düşük canlılık joanlevan, P95 inülin, agavin, D-glukoz ve dH₂O ile hazırlanan vitrifikasyon solüsyonları ile muamele sonrası elde edilmiştir. Ayrıca diğer fruktanlar ile karşılaştırıldığında graminan ve hp inülinin bulunduğu vitrifikasyon solüsyonlarında gelişen bitkilerde, kök gelişimi, bitki gövde oluşumu bakımından özellikle kriyoprezervasyon gruplarında olumlu sonuçlar gözlenmiştir (Şekil 4.4).

Bu sonuçlar, *A. thaliana* L. fideciklerinin kriyoprezervasyonu için graminan ve hp inülin ile hazırlanacak vitrifikasyon solüsyonlarının daha uygun olduğunu gösterdiğinden diğer konsantrasyon denemeleri, bu 2 fruktan tipi ile denenmiştir.

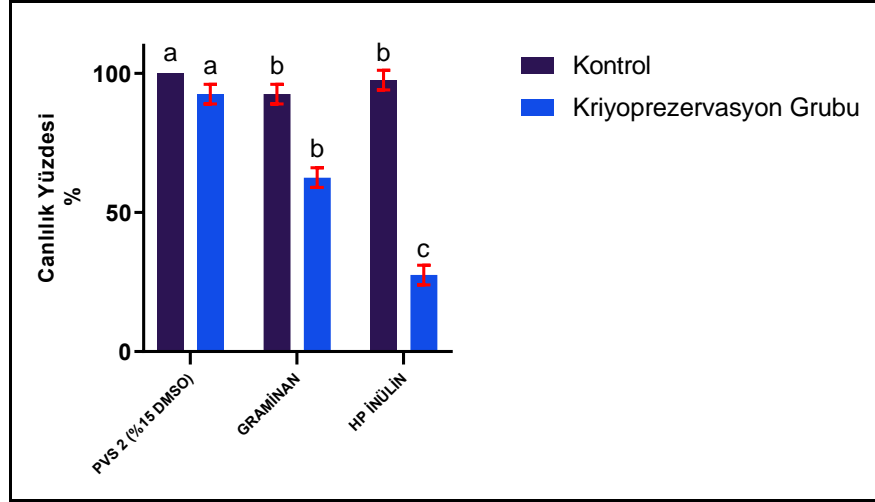


Şekil 4.3: Vitrifikasyon çözeltisinde bulunan DMSO miktarının (PVS2 için %15, fruktan grubu için %12,5) ve 100 mg/L fruktan konsantrasyonunun kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin canlılıklarına olan etkileri.

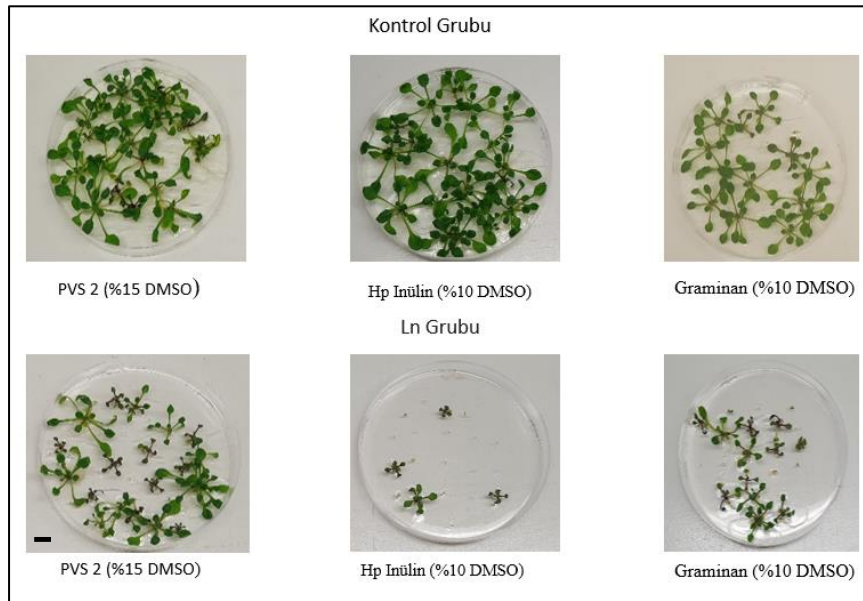


Şekil 4.4: % 15 DMSO bulunan PVS2 ve % 12,5 DMSO + 100 mg/L konsantrasyon fruktan içeren vitrifikasyon solüsyonları ile muamele edilen kontrol (a) ve kriyoprezerve edilen örneklerin (b) 15 günlük gelişim sonuçları. (Siyah bar: 1.8 cm)

Graminan ve Hp inülin fruktan tiplerinde DMSO oranı %10'a düşürüldü ve fruktan oranı %5 arttırıldı. DMSO miktarı azaltıldığında hem kontrol hem de kriyoprezerve edilen örneklerin canlılık yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar saptanmış, bitkilerin morfolojik özellikleri (yaprak özellikleri, kökleri) ve çimlenmeleri %12,5 DMSO bulunan solüsyona oranla olumsuz etkilenmiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



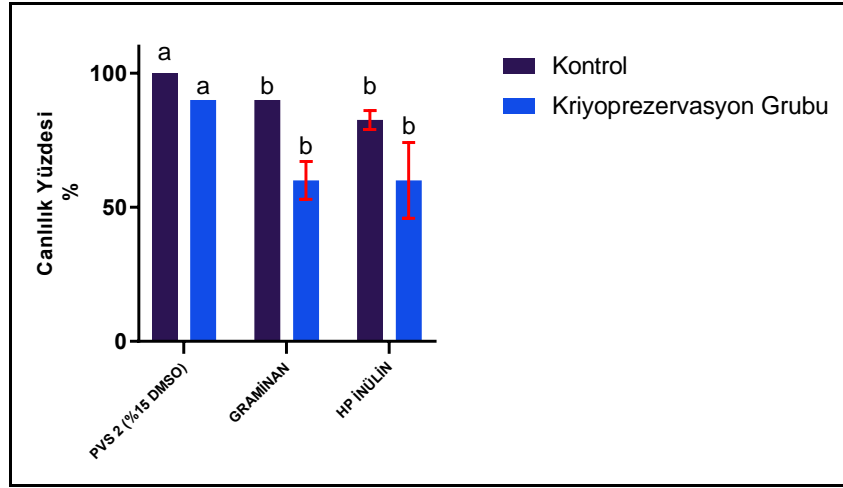
Şekil 4.5: Vitrifikasyon çözeltisinde bulunan DMSO miktarının (PVS2 için %15, fruktan grubu için %10) ve 100 mg/L fruktan konsantrasyonunun kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin canlılıklarına olan etkileri.



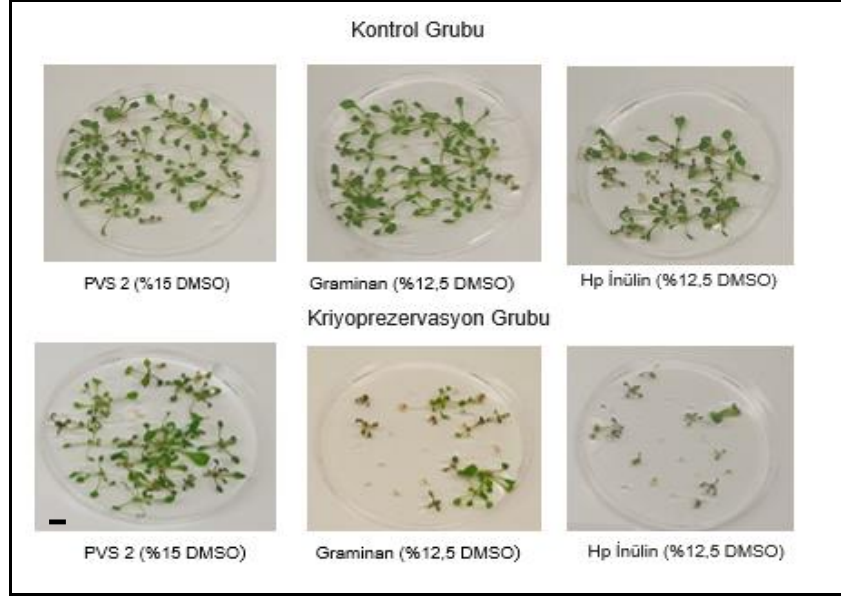
Şekil 4.6: %15 DMSO bulunan PVS2 ve %10 DMSO + 100mg/L fruktan içeren vitrifikasyon solüsyonu ile muamele edilen kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin 15 günlük gelişim sonuçları. (Siyah bar: 1cm)

4.2.2. 300 mg/L Graminan ve Hp İnülin Fruktan Konsantrasyonu Denemeleri

Graminan ve hp inülin fruktanlarında konsantrasyondaki artışın 48 saat çimlendirilen *Arabidopsis thaliana* L. fideciklerinin canlılık yüzdesine etkisinin belirlenmesi amacıyla vitrifikasyon solüsyonuna söz konusu fruktanlar 300mg/L eklendi. Her iki fruktan tipinde de ilk olarak DMSO miktarı %12,5'e düşürülmüştür. 15 günlük kültür sonrasında hem kontrol hem kriyoprezerve edilen fideciklerin canlılıklarında azalma görülmüştür (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8). Buna ek olarak, denenen fruktanlar arasında da fideciklerin canlılık yüzdeleri bakımından istatistiksel fark yoktur.

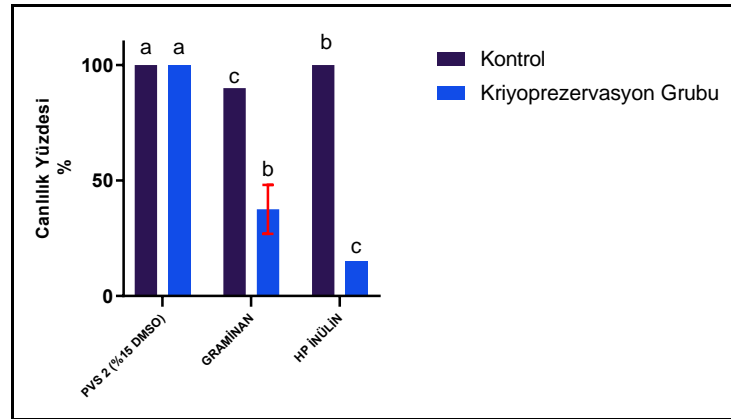


Şekil 4.7: Vitrifikasyon çözeltisinde bulunan DMSO miktarının (PVS2 için %15, fruktan grubu için %12,5) ve 300 mg/L fruktan konsantrasyonunun kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin canlılıklarına olan etkileri.

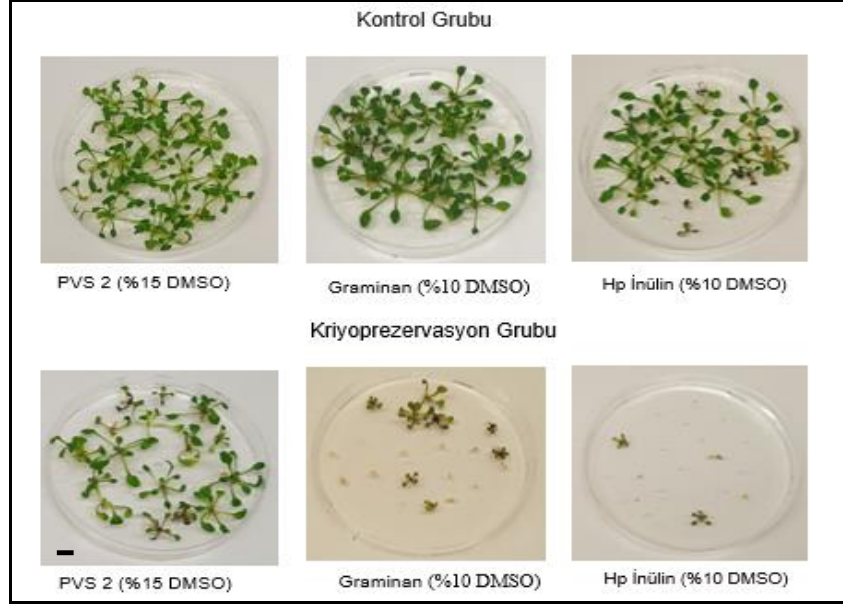


Şekil 4.8: % 15 DMSO bulunan PVS2 ve % 12,5 DMSO+ 300 mg/L fruktan içeren vitrifikasyon solüsyonu ile muamele edilen kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin 15 günlük gelişim sonuçları. (Siyah bar: 1cm)

300 mg/L konsantrasyonda %12,5 DMSO miktarı denendikten sonra, aynı konsantrasyonun %10 DMSO miktarına bakıldı. 300 mg/L konsantrasyondaki sonuçlar incelendiğinde, her iki fruktan tipinde de konsantrasyonun 300 mg/L'ye çıkarılması, fideliklerin canlılık yüzdelerini azaltmıştır. İki fruktan tipi kendi arasında değerlendirildiğinde ise graminan tipi fruktanın, 100 mg/L ve 300 mg/L'deki canlılık yüzdeleri kontrol grubu için daha düşük ancak kriyoprezerve edilen grup için ise hp inüline göre daha yüksek sonuçlar vermiştir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).



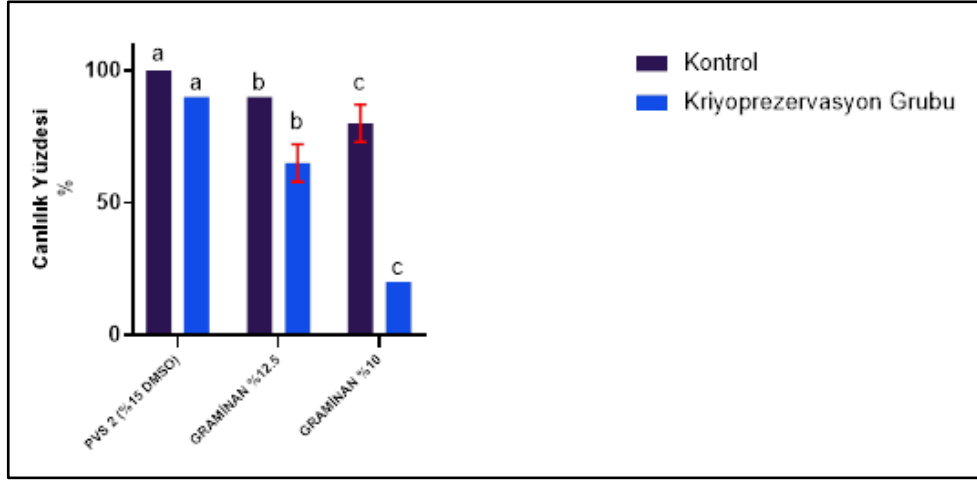
Şekil 4.9: Vitrifikasyon çözeltisinde bulunan DMSO miktarının (PVS2 için %15, fruktan grubu için %10) ve 300 mg/L fruktan konsantrasyonunun kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin canlılıklarına olan etkileri.



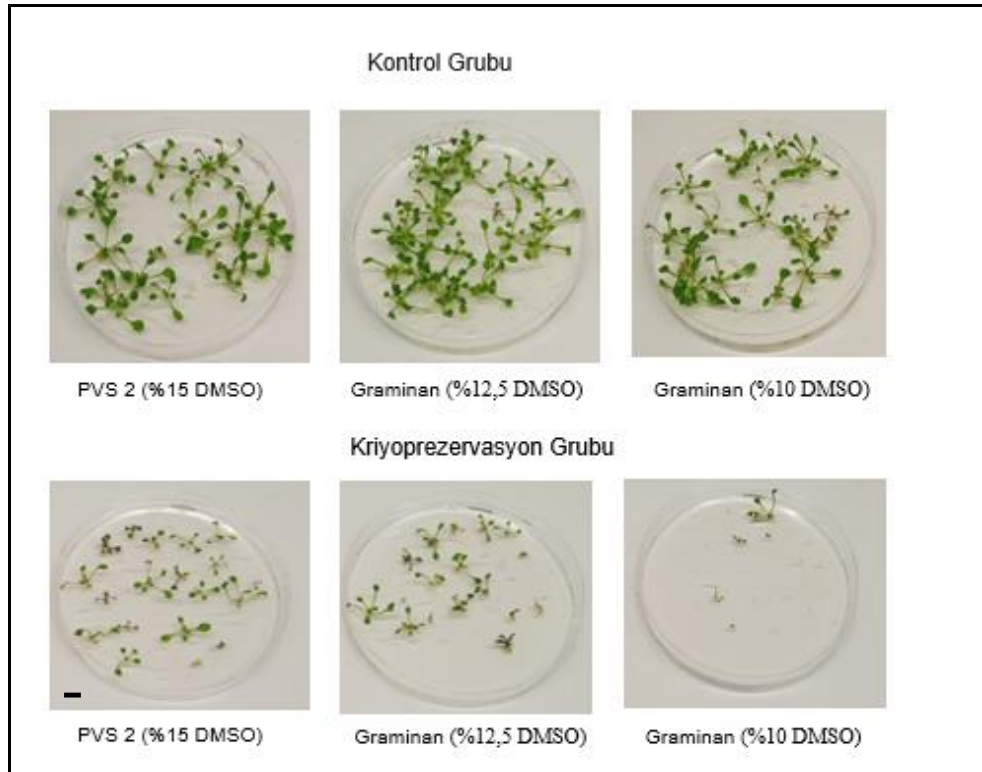
Şekil 4.10: %15 DMSO bulunan PVS2 ve %10 DMSO+ 300mg/L fruktan içeren vitrifikasyon solüsyonu ile muamele edilen kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin 15 günlük gelişim sonuçları. (Siyah bar: 1cm)

4.2.3. Graminan Tipi Fruktanın 150-200 mg/L Konsantrasyondaki Denemeleri

Graminan tipi fruktan vitrifikasyon solüsyonuna 150 mg/L olarak eklendiğinde DMSO miktarı sırasıyla %12,5-%10'a düşürüldü. Denenen her iki konsantrasyonda da hem kontrol hem de kriyoprezervasyon örneklerinde canlılık yüzdeleri ve bitki gelişimleri PVS2 solüsyonuna göre azalmakla birlikte, 300mg/L konsantrasyona göre daha olumlu sonuç vermiştir (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12). Bununla birlikte kriyoprezervasyon örneklerinde en düşük canlılık DMSO miktarının %10'a düşürülmesi sonucunda elde edilmiştir.

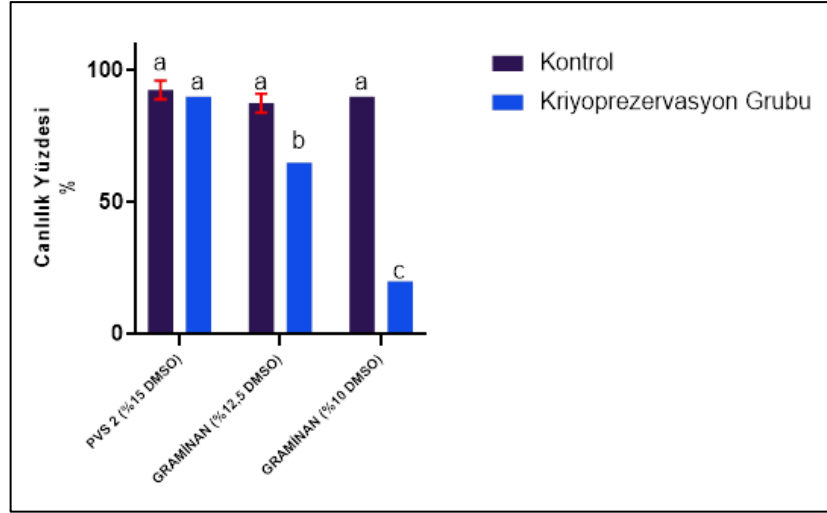


Şekil 4.11: Vitrifikasyon çözeltisinde bulunan DMSO miktarının (PVS2 için %15, fruktan grubu için %12,5-10) ve 150mg/L fruktan konsantrasyonunun kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin canlılıklarına olan etkileri.

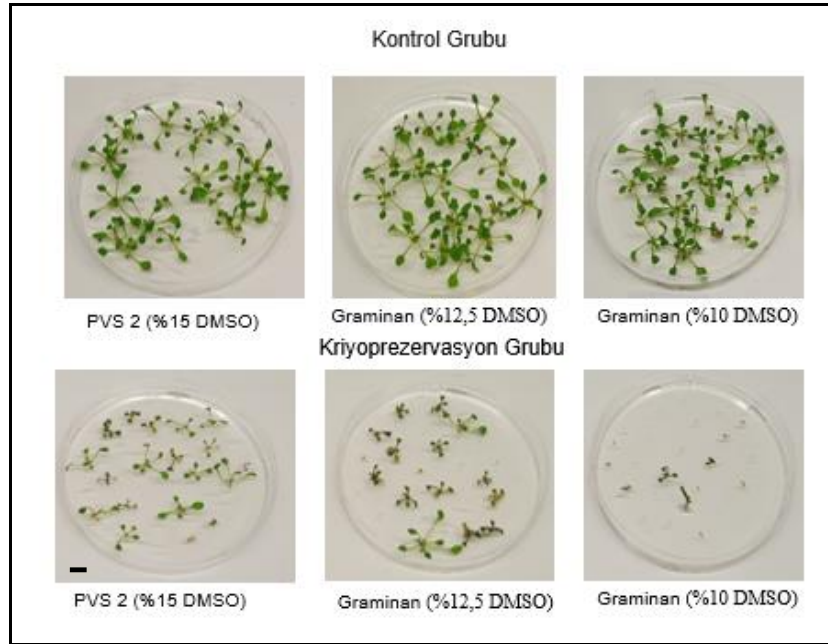


Şekil 4.12: %15 DMSO bulunan PVS2 ve %12,5-%10 DMSO+150mg/L fruktan içeren vitrifikasyon solüsyonu ile muamele edilen kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin 15 günlük gelişim sonuçları. (Siyah bar: 0.98 cm)

200 mg/L'deki denemelerde ise 300 mg/L'ye göre daha iyi sonuçlar elde edilirken, 100 mg/L ve 150 mg/L'deki denemelere göre daha olumsuz sonuçlar görülmüştür (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).



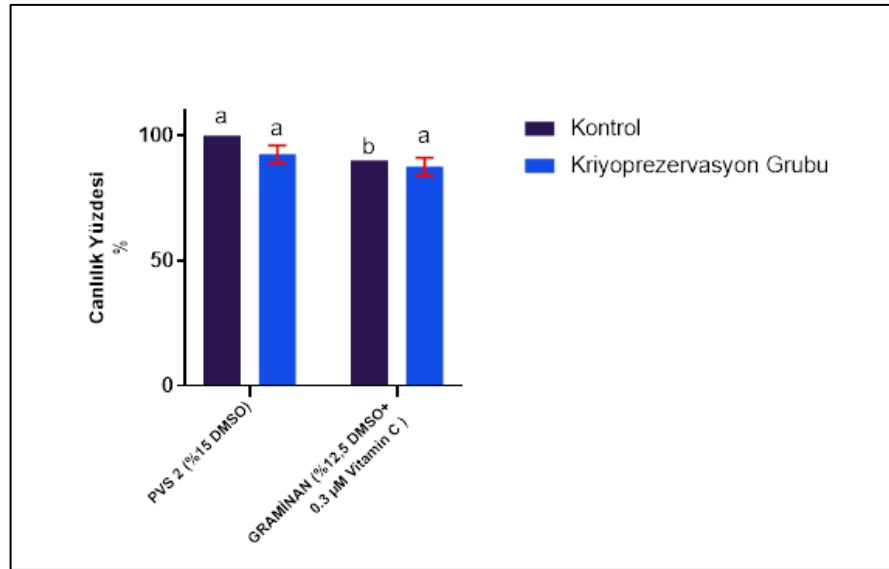
Şekil 4.13: Vitrifikasyon çözeltisinde bulunan DMSO miktarının (PVS2 için %15, fruktan grubu için %12,5-10) ve 200 mg/L fruktan konsantrasyonunun kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin canlılıklarına olan etkileri.



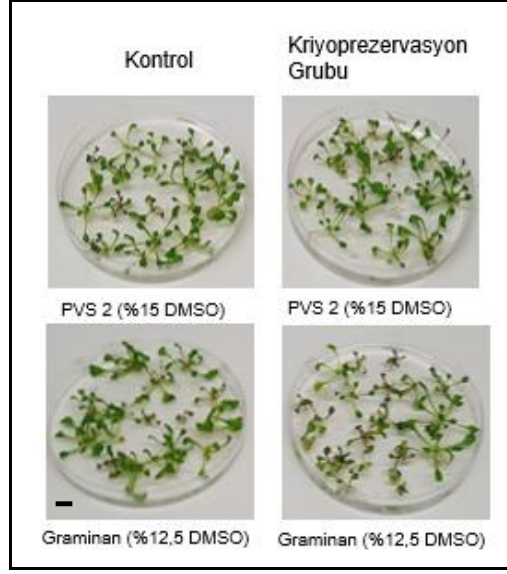
Şekil 4.14: % 15 DMSO bulunan PVS2 ve % 12,5-% 10 DMSO+200 mg/L fruktan içeren vitrifikasyon solüsyonu ile muamele edilen kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin 15 günlük gelişim sonuçları. (Siyah bar:1 cm)

4.2.4. Vitamin C İlavesi İle 100 mg/L Graminan Tipi Fruktan Denemesi

Bitkilerin kriyoprezervasyon süreci sonucunda oluşan oksidatif stresi azaltabilmek için, 100 mg/L graminan tipi fruktan ve %12,5 DMSO içeren vitrifikasyon solüsyonuna antioksidan olarak 0.3 μ M [Subramaniam et al., 2019] askorbik asit (vitamin C) eklendi. 100 mg/L konsantrasyonda da olduğu şekilde canlılık (%85) elde edilirken, fideciklerin vitamin C (Şekil 4.15) ile muamelesi sonucunda kök gelişimleri ve gövde oluşumlarında morfolojik olarak iyileşmeler (örneğin, yapraklar daha koyu renkli) gözlemlenmiştir (Şekil 4.16).



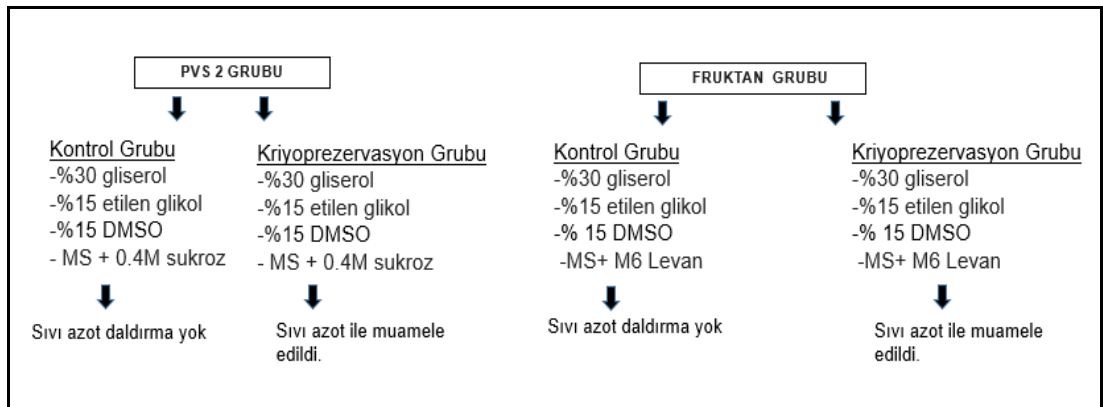
Şekil 4.15: Vitrifikasyon çözeltisinde bulunan DMSO miktarının (PVS2 için %15, fruktan grubu için %12,5) ve 100 mg/L fruktan + 0.3 μ M Vitamin C konsantrasyonunun kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin canlılıklarına olan etkileri.



Şekil 4.16: 100mg/L fruktan, %12,5 DMSO ve 0.3 µM vitamin C içeren vitrifikasyon çözeltisi ile muamele edilen kontrol ve kriyoprezervasyon örneklerinin 15 günlük gelişim sonuçları. (Siyah bar: 1.3 cm)

4.2.5. Vitrifikasyon Solüsyonundan Sukrozun Çekilmesi

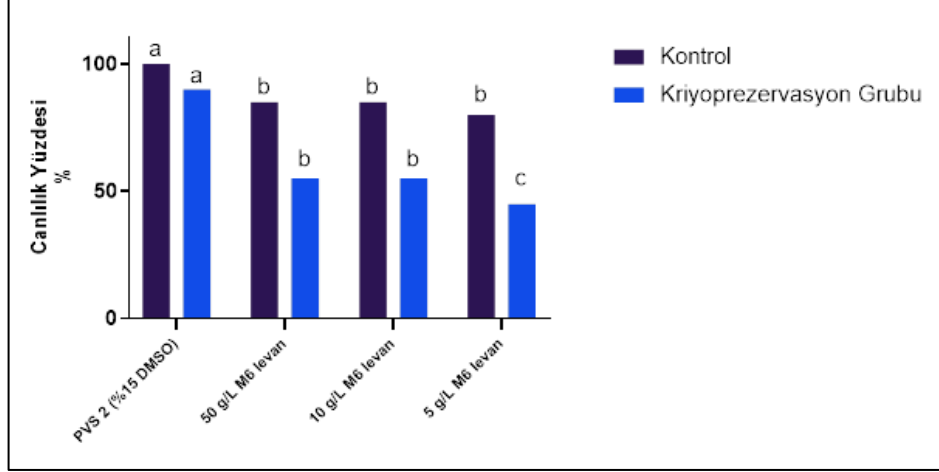
Tez kapsamında, graminan miktarının yetersiz olması sebebiyle elimizde toz olarak bol miktarda bulunan M6 Levan fruktanının, PVS2 içerisinde bulunan 0.4 M sukroz yerine eklenme denemesi yapıldı. Bu denemede DMSO (%15) miktarı sabit tutuldu (Şekil 4.17).



Şekil 4.17: Sukroz yerine M6 levan eklenerek yapılan kriyoprezervasyon denemeleri.

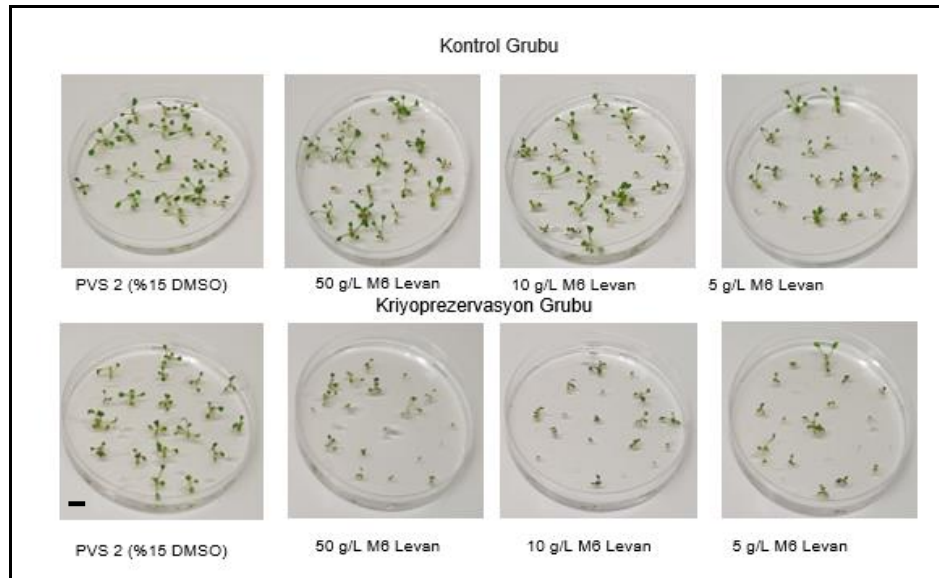
Vitrifikasyon solüsyonuna eklenen 5 g/L, 10 g/L ve 50 g/L M6 levanda özellikle kriyoprezervasyon sonrası en yüksek canlılık oranı (%55) söz konusu fruktanın

denenen en yüksek konsantrasyonunda (50 g/L) elde edilmekle birlikte, bu canlılık istatistiksel olarak sukroz içeren PVS2 ile sağlanan sonuçlara göre düşüktür (Şekil 4.18).



Şekil 4.18: Farklı konsantrasyonlarda PVS2 solüsyonuna sukroz yerine eklenen M6 levan ile kontrol ve kriyo gruplarında elde edilen canlılık yüzdeleri.

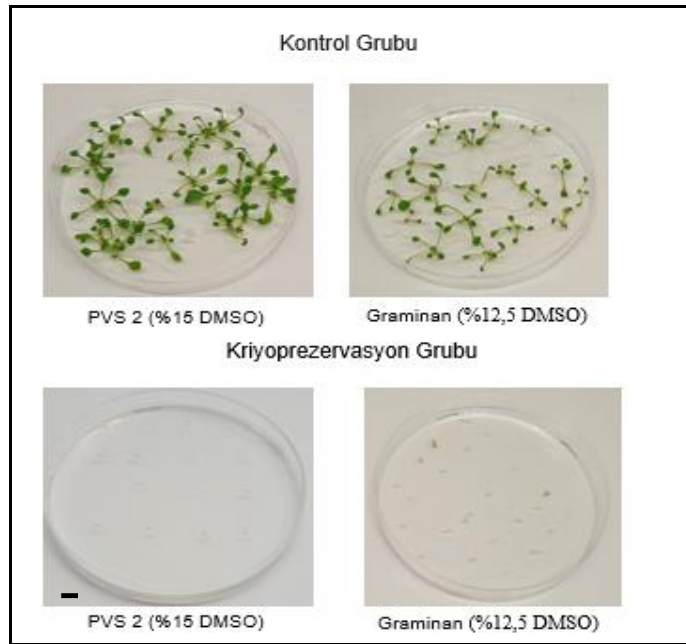
Ayrıca, PVS2 solüsyonuna 50 g/L eklenen M6 levan ile kriyoprezerve edilen fideciklerden ancak 4 tanesinde kök oluşumu görülmesi (Şekil 4.19), vitrifikasyon solüsyonunda muhakkak sukrozun bulunması gerektiğini de göstermektedir.



Şekil 4.19: Farklı konsantrasyonlarda PVS2 solüsyonuna sukroz yerine eklenen M6 levan ile kriyoprezerve edilen fideciklerin 15 günlük gelişim sonuçları. (Siyah bar: 1cm)

4.3. 72 saat çimlendirilen *Arabidopsis thaliana* L. Fideciklerinin Vitrifikasyon Tek Aşamalı Dondurma Yöntemi İle Kriyoprezervasyonu

Literatürdeki PVS2 ile yapılan çalışmalarda, 72 saat çimlendirme sonrasında bitkilerde canlılık gözlenmediği bilinmektedir [Ren et al., 2013]. Literatürdeki bu çalışma, çimlenme süresi arttıkça bitkinin kriyoprezervasyon sonrası canlılığının oksidatif stres nedeniyle oluşan lipid peroksidasyonuna bağlı olarak düştüğünü göstermiştir. 48 saat çimlendirme sonucu elde edilen verilerden alınan sonuca göre belirlediğimiz en iyi konsantrasyon olan 100 mg/L graminan fruktan solüsyonu 72 saat çimlendirilen fideciklere uygulandı. 100 mg/L 72 saat konsantrasyon ve %12,5 DMSO içeren graminan tipi fruktan solüsyonu ile muamele edilen 72 saatlik fideciklerin kriyoprezervasyon sonrası 15 günlük *in vitro* koşullarda kültürlenmesini takiben sonrasında herhangi bir canlılık gözlenmemiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: %15 DMSO bulunan PVS2 ve %12,5 DMSO+ 100mg/L fruktan içeren vitrifikasyon solüsyonu ile muamele edilen kontrol ve kriyoprezerve edilen örneklerin 15 günlük gelişim sonuçları. (Siyah bar: 0,83 cm)

5. TARTIŞMA

Bitki genetik kaynakları, tarımsal biyoçeşitlilik için son derece önemlidir. [Kaviani, 2011]. Kriyoprezervasyon sayesinde bitki genetik materyali uzun süreli, güvenilir bir şekilde saklanabilmektedir. Hiçbir biyolojik örnek ölümsüz olmasa da, sıvı azot depolamasındaki örnekler teorik olarak sınırsız ömre (ad infinitum) sahiptir [Li and Pritchard 2009]. Bununla birlikte, kriyoprezervasyonun başarısı büyük ölçüde optimize edilmiş protokollere ve bunların nasıl uygulandığına bağlıdır [Reed, 2001]. Protokoller, büyüme öncesi koşulları, kullanılan bitki materyalinin türünü, ön muameleleri, kriyokoruyucuları, soğutma, yeniden ısınma, yeniden büyüme koşullarını ve prosedürlerini belirtebilir. Ancak bu protokollerin başarısı, her bitki türüne hatta genotipine göre değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenliğin sebeplerinden bir tanesi de vitrifikasyon çözeltilerinde kullanılan kriyokoruyucuların varlığıdır. Kriyokoruyucu çözeltiler, hücre içi ve dışı su seviyelerini ayarlayarak hücreyi ölümcül buz kristallerinden korumak ve dehidratasyon-donma süresince hücresel yapıların ve özellikle membran stabilizasyonunda rol almak gibi önemli görevleri bulunmaktadır [Volk and Walters, 2006]. Bu nedenle kriyokoruyucu çözeltilerde, toksik bir kimyasalın bulunmaması, kriyosonrası canlılık ve genetik kararlılık için önemli bir faktördür. Kriyokoruyucuların toksisiteyi, konsantrasyona ve zamana bağlı olarak toksisite göstermektedir.

Memeli ve bitki hücrelerinde uygulanan protokollerde kullanılan DMSO, toksik etkisi nedeniyle hücreleri olumsuz etkileyebilmektedir. Hem Fahy (1986) hem de Cañavate ve Lubian (1994) yaptığı çalışmalarda DMSO konsantrasyonu vitrifikasyon solüsyonunda arttığında toksik etkiler artmıştır. Bununla birlikte, PVS2 kullanılarak damlacıkla vitrifikasyon ile muz meristemleri, yam bitkisi, erik, badem de dahil olmak üzere çeşitli bitki materyallerine başarıyla adapte edilmiş olsa da [Boucaud et al., 2002], vanilya gibi bazı bitki türlerinde ön koşullandırma olsa dahi sürgün uçlarının soğutma öncesi hasar gördüğü bildirilmiştir [Sakai, 2004]. Yine de PVS 2 süs bitkileri de dahil birçok bitki türünün kriyoprezervasyonu için en sık kullanılan kriyokoruyucudur [Kırdök, 2015].

Vitrifikasyon çözeltilerinin spesifikliğinin ve süresinin, kriyoprezervasyon sonrası canlılığa ve kararlılığa etkisini belirlemek amacıyla farklı PVS solüsyon formülasyonları önerilmiştir. Örneğin, sarımsak sürgün uçları ile yapılan çalışmada

yüksek sağkalım elde etmek için PVS3 vitrifikasyon çözeltisi ile eksplantlar 150 dakika dehidrate edilmiştir. Dehidratasyon süresinin optimizasyonu canlılığı olumlu yönde etkilemiştir. Yine kasımpatı ve sarımsak türlerinin damlacık vitrifikasyon temelli kriyoprezervasyonunda PVS3'ün (%92) uygulanması, PVS 2'ye (%75) göre daha iyi sonuçlar vermiştir [Kim et al., 2009]. PVS 2 çözeltisine kıyasla bazı türlerde PVS1 (acı ot) [Suzuki et al., 2008], PVS 3 (sarımsak, ananas) [Martinez-Montero et al., 2005] ve VSL (acı ot) [Suzuki et al., 2008] kullanılarak görece daha iyi veya karşılaştırılabilir sürgün geri kazanım oranları elde edilebilse de, alev ağacı bitkisinde yapılan bir çalışmada [Ozden Tokatli and Akdemir., 2010] sürgün uçlarının vitrifikasyonu ile elde edilen sonuçlar, PVS2'nin denenen diğer vitrifikasyon solüsyonları (PVS1, PVS3 ve VSL) arasında en uygun vitrifikasyon çözeltisi olduğunu göstermiştir. Ancak halen daha PVS2 ile kriyoprezervasyon sonrası özellikle odunsu türlerde [örneğin antepfıstığı (%13,6), Akdemir et al., 2012] görece düşük (%40'ın altı) canlılık elde edilmesi DMSO miktarının azaltıldığı alternatif vitrifikasyon solüsyonlarının oluşturulmasına gereksinim bulunmaktadır.

DMSO miktarının vitrifikasyon solüsyonundan tamamen çıkartıldığı ve galaktoz, sukroz ve trehaloz gibi şekerlerin, hem kültür ortamında hem de eklendiği durumlarda yapılan çalışmalarda, DMSO içermeyen ortamlardaki kriyoprezervasyon sonrası hücrelerde %50 den fazla canlılık ve metabolik aktivite sağlanmıştır [Petrenko et al., 2014]. Blanch ve arkadaşlarının (2017), marulda yaptıkları çalışmada, su eksikliği ile fruktan arasında bağlantı olduğunu belirlemişlerdir. Bitkilere uygulanan orta seviye su eksikliği, fruktan (nistoz ve kestopentoz) üretimini arttırmış ve muhtemel bu artış bitkilerde düşük sıcaklıklara karşı direnci arttırmıştır.

Tez kapsamında, literatürde Ren ve arkadaşları (2013) tarafından tanımlanan vitrifikasyon temelli yöntemi kullanılarak *A. thaliana* (Col-0) fidelerinin kriyoprezervasyonu gerçekleştirilmiştir. Kriyokoruyucu solüsyona yönelik yapılan iyileştirmeler sonucunda, Ren ve arkadaşları (2013) tarafından elde edilen 48 saatlik fideciklerde kriyoprezervasyon sonrası %96,8 canlılık yüzdesine en yakın sonucu bu tez kapsamında denenen graminan tipi fruktan %85-90 oranında sağlanmıştır. Kriyoprezerve edilen örneklerde ise PVS2 ile graminan ve hp inülin ile muamele edilen fideciklerin canlılıklarında istatistiksel fark görülmemesi bu iki fruktan tipinin 100 mg/L konsantrasyonda vitrifikasyon solüsyonunda kullanımı ile DMSO miktarının azaltılabileceğini (%2,5) önermektedir. Graminan ekleyerek vitrifiye ve kriyoprezerve edilen bitkiler, morfolojik açıdan da kontrol bitkilerine benzer

özelliklere sahiptir. Graminan ile elde edilen bu sonuç, memeli hücrelerinde rakkyo fruktanının (graminan) FBS' ye benzer şekilde umut vadeden bir kriyokoruyucu olarak kullanılmasını önerdiği şekilde, bitki eksplantlarının kriyoprezervasyonu için de bu fruktanın vitrifikasyon solüsyonunda kullanılabileceğini ve bitki hücrelerini dehidratasyon ve donma stresine karşı koruduğunu göstermektedir. Nitekim Tanaka ve arkadaşlarının yaptığı güncel bir çalışmada (2019), arpacık soğanı sürgün uçlarının v- kriyo-plaka yöntemi kullanılarak kriyoprezervasyonunda %100 başarı elde edilmesi hem uygulanan yöntemin bitkileri ultra hızlı soğutması hem de arpacık soğanındaki graminan içeriğinin yüksek olmasına bağlanmıştır.

Graminan tipi fruktana ek olarak PVS2 solüsyonuna ilave edilen vitamin C, bitkilerin canlılık yüzdelerinden çok morfolojisini daha olumlu etkilemiştir. Bununla birlikte Ren ve arkadaşlarıyla (2013) çalışmalarına benzer şekilde 72 saat çimlendirilen *A. thaliana* L. fideciklerinin graminan içeren vitrifikasyon solüsyonu ile kriyoprezervasyonu sonrasında canlılık elde edilememiştir. Vitrifikasyon solüsyonuna graminan eklenmesi ile yine de canlılık oranının değişmemesi, bitkinin çimlenme süresi arttıkça lipid peroksidasyonunun artmasının [Ren et al.,2013] yanı sıra daha fazla gelişmesine bağlı olarak farklı genlerin aktivasyonunun etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, *A. thaliana* L. bitkisinde çimlenme periyodunun uzaması ile kriyoprezervasyon sonrası canlılık oranının negatif ilişkili olduğunu göstermektedir.

Tez kapsamında yapılan diğer bir çalışmada, vitrifikasyon solüsyonundan 0.4 M sukroz yerine, 50 g/L konsantrasyonda M6 levan tipi fruktanın eklenmesi ile %55 canlılık elde edilmiştir. Bununla birlikte sukroz içeren PVS2 solüsyonunda kriyoprezervasyon sonrası canlılığın (%90), sukroz yerine M6 levan içeren vitrifikasyon solüsyonuna göre yüksek olması (%55) sukrozun vitrifikasyon solüsyonunda muhakkak bulunması gerektiğini göstermiştir. Yine de bu çalışmanın graminan tipi fruktan ile denenmesi önerilmektedir. Karbon kaynağının değişmesi, büyüme oranı üzerinde çok dikkate değer bir etkiye sahip olabilir.

Sonuç olarak, memeli hücreleri için potansiyel bir kriyokoruyucu olarak önerilen fruktan, ilk defa model bitki *Arabidopsis thaliana* L.'nın in vitro fideciklerinin vitrifikasyon tek aşamalı dondurma tekniğiyle kriyoprezervasyonu için kullanılmıştır. Elde edilen tüm sonuçlar özellikle graminan tip fruktanın bitki hücrelerinde yeni vitrifikasyon solüsyonlarının formülasyonlarında başarılı bir şekilde kullanılabilceğini önermektedir.

KAYNAKLAR

- Akdemir H., Süzerer V., Tilkat, E., Yildirim H., Onay A., Çiftçi Y. O. (2012), “In vitro conservation and cryopreservation of mature pistachio (*Pistacia vera* L.) germplasm”, *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22(1), 43–51.
- Anchordoguy T.J., Carpenter J.F., Crowe J.H., Crowe L.M., (1992), “Temperature-dependent perturbation of phospholipid bilayers by dimethylsulfoxide”, *Biochim Biophys Acta* 1104,117–122.
- Arakawa T., Carpenter J.F., Yoshiko A.K., Crowe J.H., (1990), “The basis of toxicity of certain cryoprotectants: A hypothesis”, *Cryobiology*, 27,401–415.
- Ashmore S.E., (1997), “Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation of plant genetic resources”, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Benson E. E., Bremner D. H., (2004), “Oxidative stress in the frozen plant: a free radical point of view”, *Boca Raton*, 14, 206–241.
- Benson E. E. (2004) “Cryoconserving algal and plant diversity: historical perspective and future challenges”, In: *Life in the Frozen State*, 299–328.
- Benson, E. E., Harding, K., Debouck, D., Dumet, D., Escobar, R. Mafla, G. (2011), “Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops. Part II. Status of in vitro conservation technologies for: Andean root and tuber crops, cassava, Musa, potato, sweet potato and yam”, *Bioversity International*, Rome, IT.
- Benson E. E., Reed B. M., Brennan R., Clacher K. A., Ross D. A., (1996b), “Use of thermal analysis in the evaluation of cryopreservation protocols for *Ribes nigrum* L. Germplasm”, *CryoLetters*, 17, 347-362.
- Blanch, M., Dolores Alvarez, M., Sanchez-Ballesta, M. T., Escribano, M. I., Merodio, C., (2017), “Water relations, short-chain oligosaccharides and rheological properties in lettuces subjected to limited water supply and low temperature stress”, *Scientia Horticulturae*, 225, 726–735.
- Bolouri-Moghaddam M. R., Le Roy K., Xiang L., Rolland F., Van Den Ende W. (2010), “Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells” *FEBS J.* 277, 2022–2037.
- Boucaud M. T., Brison M.; Helliot B., Hervé-Paulus V, (2002), “Cryopreservation of *Prunus*”. In: Towill L. E. Bajaj Y. P. S. (eds) *Biotechnology in agriculture and forestry. Cryopreservation of plant germplasm II*, vol 50. Springer, Heidelberg, 288–311.
- Bourne W.M., Shearer D.R., Nelson L.R., (1994), “Human corneal endothelial tolerance to glycerol, dimethylsulfoxide, 1,2- propanediol, and 2,3-butanediol”, *Cryobiology*, 31,1–9

Brison M., De Boucaud M. T., Pierronnet A., Dosba F. (1997), "Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv. Prunus rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus", *Plant Science*, 123,189–196.

Canavate J.P., Lubian L.M., (1994), "Tolerance of six marine microalgae to the cryoprotectants dimethyl sulfoxide and methanol", *J. Phycol.* 30, 559 – 565.

Chatterton N. J ., Harrison P. A., Bennett J. H., Asay, K. H. (1989). Carbohydrate partitioning in accessions of Gramineae grown under warm and cool temperatures. *J. Plant Physiol.* 134,169-79.

Chen G., Ren L., Zhang J., Reed B.M., Zhang D., Shen X., (2015), "Cryopreservation affects ROS-induced oxidative stress and antioxidant response in Arabidopsis seedlings", *Cryobiology* (70), 38-47.

Davis K.R. (1992), "Arabidopsis thaliana as a model host for studying plant-pathogen interactions. In: *Molecular signals in plant-microbe communication*", Eds. DPS Verma. CRC Pres, Boca Raton,393-406.

De Roover J., Vandenbranden K., Van Laere, A., Van den Ende, W. (2000), "Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose:sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.)", *Planta*, 210,808-814.

Demel R.A., Dorrepaal E., Ebskamp M.J.M., Smeeckens J.C.M., de Kruijff B., (1998), "Fructans interact strongly with model membranes", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1375, 36–42.

Dereuddre J., Blandin S., Hassen N., (1991), "Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen. 1. Effects of preculture", *CryoLetters*, 12,125-134.

Dhungana S.A., Kunitake H., Niino T., Yamamoto S., Fukui K. and Matsumoto T., (2015), "Cryopreservation of blueberry (*Vaccinium* L.) shoot tips by D cryo-plate method", 2, 363, *Hort. Res. (Japan)* 14.

Efendi D., Litz R. E., (2003), "Cryopreservation of avocado", *Proceedings V World Avocado Congress*, 111– 114, Malaga, Spain, 19–24 October.

Ekinci H, (2013), "Alev ağacı (*Photinia x fraseri* Dress.) bitkisinin kriyoprezervasyonu ve kriyoprezerve edilen bitkilerin genetik kararlılıklarının moleküler belirteçler ile incelenmesi", Yüksek Lisans tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.

Ekinci H., Özden-Çiftçi Y., (2019), "Bitki Biyoteknolojisinde Güncel Yaklaşımlar (Bölüm 8)", 9786052823040. Palme Yayın Evi.

Elliot G. D., Wang, S., Fuller, B. J. (2017), "Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures", *Cryobiology*, 76,74-91.

Engelmann F (2004), “ Plant cryopreservation: progress and prospects”, *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40,427–433.

Engelmann F., Engels J., Dulloo E., (2003), “The development of complementary strategies for the conservation and use of plant genetic resources”, IPGRI Office for South Asia, New Delhi, India / NBPGR, New Delhi, India.

Fabre J., Dereuddre J., (1990), “Encapsulationdehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips”, *CryoLetters*, 11,413-426

Fahy G. M., Levy, D. I. & Ali, S. E. (1987), “Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions”, *Cryobiology*, 24, 196–213.

Fahy G.M., (1986), “The relevance of cryoprotectant ‘toxicity’ to cryobiology”, *Cryobiology* 23, 1 – 13.

French A.D., Waterhouse A.L., (1993), “Chemical structure and characteristics”, In: Suzuki M, Chatterton NJ (eds) *Science and technology of fructans*. CRC Press, Boca Raton, 41–81.

Gaudet, D. A., & Laroche, A. (1997), “Winter survival of cereals parasitized by snow mold”, In H. Li, & T. H. H. Chen (Eds.), *Plant cold hardiness*. Boston, MA, Springer 331–342.

Ginzburg V., Balijepalli S. (2007), “Modeling the Thermodynamics of the Interaction of Nanoparticles with Cell Membranes”, *Nano Letters* 7,12 3716-3722.

Gül Şeker Mine, Süzerer Veysel, Elibüyük İbrahim Özer, Özden Çiftçi Yelda (2015), “In Vitro Elimination of PPV from Infected Apricot Shoot Tips via Chemotherapy and Cryotherapy”, *International Journal of Agriculture and Biology*, 17(5), 1065-1070.

Helliot B, Panis B, Poumay Y, Swenen R, Lepoivre P, Frison E. (2002), “Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.) ”. *Plant Cell Rep*,20,1117–22.

Helliot C., de Boucaud M. T., (1997), “Effect of various parameters on the survival of cryopreserved *Prunus ferlenain in vitro* plantlets shoot tips”, *CryoLetters*, 18, 133-142.

Hendry G. A. F., Wallace, R. K. (1993), “The origin, distribution and evolutionary significance of fructans”, In M. Suzuki, J. N. Chatterton (Eds.), *Science and Technology of Fructans*. Boca Raton, Florida: CRC Pres, 120–141.

Hendry G. A. F., (1993), “Evolutionary origins and natural functions of fructans A climatological, biogeographic and mechanistic appraisal”, *New Phytologist*, 123, 3–14.

Hervani D., Efendi D., Suhartanto M.R., Purwoko B.S., (2016), “Cryopreservation for long-term plant germplasm storage”, In: Efendi D,

Maharijaya A (eds). Proceeding International Seminar on Tropical Horticulture Pusat Kajian Hortikultura Tropika-LPPM IPB, Bogor. Indonesian.

Higashiya H., Kobayashi K., Terada, S., (2010), "Fructan as a Novel Effective Factor for Mammalian Cell Culture", Editor: Noll T., Cells and Culture, ESACT Proceedings, Springer, Dordrecht, 4.

Hincha D. K., Zuther E., Hellwege E. M., Heyer A. G. (2002), "Specific effects of fructo- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying", *Glycobiology*, 12, 103–110.

Hincha D.K., Livingston D.P., Premakumar R., Zuther E., Obel N., Cacela C., Heyer A.G., (2007), "Fructans from oat and rye: Composition and effects on membrane stability during drying", *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 1611-1619.

Hincha D.K., Popova A.V., Cacela C., (2006), "Effects of sugars on the stability and structure of lipid membranes during drying", *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes* 3,189-217.

Hinrichs W.L.J., Sanders N.N., de Smedt S.C., Demeester J., Frijlink H.W., (2005), "Inulin is a promising cryo and lyoprotectant for PEGylated lipoplexes.", *J Controlled Release* 103,465–479.

Holland C.K., M. Jez J., (2018), "Arabidopsis: the original plant chassis organism", *Plant Cell Reports*, 37,1359–1366.

Kaczmarczyk A., Rokka V.-M., Keller E.R.J., (2011), "Potato shoot tip cryopreservation", a review. *Potato Research*, 54,45-79.

Karow Jr., A.M. (1969), "Cryoprotectants-a new class of drugs", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 21, 209-223.

Kartha K. K, Leung N. L., Mrognski L. A., (1982), "In vitro growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of Cassava (*Manihot esculenta*Crantz)", *Plant physiology*, 107, 133–140.

Kaviani B., (2011), "Conservation of plant genetic resources by cryopreservation", *Australian Journal of Crop Science*, 5, 778-800.

Keller E. R. J., Dreiling M. (2003), "Potato cryopreservation in Germany using the droplet method for the establishment of a new large collection", *Acta Hort.* 623, 193–200.

Kırdök E., Ekinci H., Çiftçi Y. Ö., (2015). "Cryopreservation of Somatic Embryos of Ornamental Plants. Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications", 121–139.

Kim H.H., Lee Y.G., Shin D.J., Kim T., Cho E.G., Engelmann F., (2009), "Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures", *CryoLetters*. 30, 320-334.

- Kirchner B., Reiher M. (2002), “The secret of dimethyl sulfoxide-water mixtures. A quantum chemical study of 1DMSO-nwater clusters.”, *J Am Chem Soc*, 124,6206–6215.
- Koornneef, M., Meinke, D. (2010)., “The development of Arabidopsis as a model plant”, *The Plant Journal*, 61(6), 909–921.
- Kozai T, (1991), “Photoautotrophic micropropagation”, *In Vitro*, 27,47-51.
- Kramer U. (2015), “Planting molecular functions in an ecological context with Arabidopsis thaliana”, *eLife*, 4.
- Kumu Y., Harada T., Yakuwa T. (1983), “Development of a whole plant from a shoot tip of *Asparagus officinalis* L. frozen down to -196 °C”, *Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University*, 61, 285-394.
- Laibach F (1943), “*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. als objekt fur genetische und entwicklungsphysiologische untersuchungen”, *Bot Archiv* 44,439–45.
- Lambardi M., De Carlo A., (2003), “Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees”, *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, Kluwer Ac. Pub., Dordrecht, 815- 840.
- Lange C., Cakiroglu F., Spiess A.N., Cappallo-Obermann, H., Dierlamm, J., Zander, A.R., (2007), “Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerativemedicine”, *Journal of Cellular Physiology*, 213, 18–26.
- Leunufna S., Keller E. R. J., (2005), “Cryopreservation of yams using vitrification modified by including droplet method effects of cold acclimation and sucrose”, *CryoLetters*, 26, 93-102.
- Leutwiler L.S., Houghevans B.R., Meyerowitz E.M. (1984), “The DNA of *Arabidopsis thaliana*”, *Mol. Gen. Genet.* 194, 15–23.
- Lewis D. L. (1993), “Nomenclature and diagrammatic representation of oligomeric fructans – a paper for discussion”, *New Phytologist*, 124, 583-594.
- Lipavska H. & Vreugdenhil D., (1996), “Uptake of mannitol from media by in vitro grown plants”, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 45, 103-107.
- Li D.-Z., Pritchard, H. W., (2009), “The science and economics of ex situ plant conservation”, *Trends in Plant Science*, 14(11), 614–621.
- Livingston D. P. III, Hinch, D. K., Heyer A. G., (2009), “Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 2007–2023.

Maleux, K., Van den Ende W., (2007), “Levans in excised leaves of *Dactylis glomerata*: Effects of light, sugars, temperature and senescence”, *Journal of Plant Biology*, 50(6), 671–680.

Mancilla-Margalli, N. A., Lopez, M. G., (2006), “Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliirion* species”, *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 54, 7832–7839.

Martinez-Montero, M. E., Martínez, J., Engelmann, F., Gonzalez-Arno, M. T., (2005), “Cryopreservation Of Pineapple (*Ananas Comosus* (L.) Merr) Apices And Calluses”. *Acta Horticulturae*, (666), 127–131.

Matros, A., Peshev, D., Peukert, M., Mock, H.P., Van den Ende, W., (2015), “Sugars as hydroxyl scavengers: proof-of-concept by studying the fate of sucralose in *Arabidopsis*”, *Plant J.* 2015 Jun,82(5),822-39.

Matsumoto T., Sakai A., (1995), “An approach to enhance dehydration tolerance of alginate-coated dried meristems cooled to -196°C ”, *CryoLetters*, 16,299-306.

Matsumoto T., Yamamoto S., Fukui K., Rafique T., Engelmann F. and Niino T., (2015), “Cryopreservation of persimmon shoot tips from dormant buds using the D cryo-plate technique”, *The Hort. J.* 84,106–110.

Matsumoto, T., (2017), “Cryopreservation of plant genetic resources: conventional and new methods”, *Reviews in Agricultural Science*, 5, 13-20.

Matsumoto T., Sakai, A., Yamada K., (1994), “Cryopreservation of in vitro grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration”, *Plant Cell Rep.* 13,442–446.

Meier H., Reid, J. S. G. (1982). “Reserve polysaccharides other than starch in higher plants”, In *Encyclopedia of Plant Physiology*,13,418-71.

Meyerowitz EM (2001), “Prehistory and history of *Arabidopsis* research”, *Plant Physiol* 125,15–19.

Moges A. D., Karam N. S., Shibli R. A., (2003), “Slow growth in vitro preservation of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl) shoot tips”, *Advanced HortScience*, 17, 1-8.

Munoz-Gutierrez, I., Rodriguez-Alegría, M.E., López-Munguía, A., (2009), “Kinetic behaviour and specificity of β -fructosidases in the hydrolysis of plant and microbial fructans”, *Process Biochem.* 44, 891–898.

Naccache P., Sha’afi R.I., (1973), “Patterns of nonelectrolyte permeability in human red blood cell membrane”, *J Gen Physio*, 62,714–736

Nadarajan, J. & Pritchard, H. W., (2014), “Biophysical Characteristics of Successful Oilseed Embryo Cryoprotection and Cryopreservation Using Vacuum Infiltration Vitrification: An Innovation in Plant Cell Preservation”, *Plos One*, 9(5), 1-11.

Niino T., Yamamoto S., Fukui K., Martinez C.R. C., Arizaga M. V., Matsumoto T. Engelmann, F., (2013), “Dehydration improves cryopreservation of mat rush (*Juncus decipiens* Nakai) basal stem buds on cryo-plate”, *CryoLetters*, 34, 549-560.

Niino T., Sakai A., Yakuwa H., Nojiri K., (1992), “Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot of apple and pear by vitrification”, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28, 261-266.

Nishizawa S., Sakai A., Amano Y., Matsuzawa T., (1992), “Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by a simple freezing method”, *CryoLetters*, 13,379-388.

Ogawa A., Mizui S., Chida Y., Shimizu M., Terada S., Ohura T., Kobayash, K., Yasukawa S., Moriyama N., (2014), “Rakkyo fructan as a cryoprotectant for serum-free cryopreservation of mammalian cells”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(1), 101 – 106.

Ozden Tokatli Y., Akdemir H. (2010), “Cryopreservation of fraser Photinia (*Photinia X fraseri* Dress.) via vitrification-based one-step freezing techniques”, *CryoLetters*, 31, 40-49.

Ozudogru, E. A., Kaya E., (2012), “Cryopreservation of *Thymus cariensis* and *T. vulgaris* shoot tips: comparison of three vitrification-based methods”, *CryoLetters*, 33(5), 363-375.

Panis B., Lambardi M., (2005), “Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees)”, *Turin*, 61–78.

Panis B., Piette B., Swennen R., (2005), “Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*”, *Plant Science*, 168, 45-55

Pegg D.E, (2007), “Principles of cryopreservation”, *Methods Mol Biol*;368,39–57.

Peshev D., Vergauwen R., Moglia A., Hideg E., Van den Ende W., (2013), “Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: Arole for fructans”, *Journal of Experimental Botany*, 64(4), 1025–1038.

Petrenko Y.A., Rogulska O.Y., Mutsenko V.V., Petrenko A.Y., (2014), “A sugar pretreatment as a new approach to the DMSO- and xeno-free cryopreservation of human mesenchymal stromal cells”, *CryoLetters* 35,239–246.

Peukert M., Thiel J., Peshev D., Weschke W., Van den Ende W., Mock H.P., Matros, A. (2014), “Spatio-temporal dynamics of fructan metabolism in developing barley grains”, *Plant Cell* 26, 3728-3744.

Polge C., Smith A.U., Parkes A.S., (1949), “Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures“, *Nature*, 164,666.

Pollock C. J, 1986, "Fructans and the metabolism of sucrose in higher plants", *New Phytol.* 104, 1-24.

Pollock C.J., Cairns A.J. (1991), "Fructan metabolism in grasses and cereals", *Annu. Rev. Plant Physiol.* 42, 77–101.

Pommerrenig B., Ludewig F., Cvetkovic J., Trentmann O., Klemens P. A., Neuhaus, H. E., (2018), "In concert: orchestrated changes in carbohydrate homeostasis are critical for plant abiotic stress tolerance", *Plant and Cell Physiology*, 037.

Pontis H. G., del Campillo E. (1985). "Fructans, In *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants*", ed. P. M. Dey, R. A. Dixon., 205-27. New York, Academic.

Pontis H.G., (1989), "Fructans and cold stress" , *J. Plant Physiol.* 134,148-150.

Prud' Home M.P., Castal F., Belanger G., Boucaud, J. (1993). "Temperature effects on partitioning of ¹⁴C assimilates in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb) ", *New Phytologist* 123,255-261.

Rafique T, Yamamoto S, Fukui K, Mahmood Z and Niino T (2015), "Cryopreservation of sugarcane using the V cryo-plate technique", *CryoLett.* 36, 51-59.

Rajasekharan, P. E. & Sahijram, L. (2015), "In vitro conservation of plant germplasm", In *Plant biology and biotechnology*, 417-443.

Rao N.K., (2004), "Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology", *African Journal of Biotechnology*, 3 (2),136-145.

Razdan M. K., Cockling E. C., (1997), "Biotechnology in conservation of genetic resources", Science Publishers, 1-25.

Redenbaugh K., Paasch B., Nichol J., Kessler M., Viss P., Walker K., (1986), "Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos", *Bio/Technology*, 4,797-801.

Reed B.M., (2002), "Implementing Cryopreservation for Long-Term Germplasm Preservation in Vegetatively Propagated Species", (Ed. L.E. Towill, Y.P.S. Bajaj), *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 50, Cryopreservation of Plant Germplasm II. Springer, 22-33.

Reed B.M., Uchendu E., (2008), "Controlled rate cooling", (Ed. B.M. Reed), *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, Springer, USA, 77-92.

Reed BM (2001). "Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants". *CryoLetters* 22,97–104.

Reed B. M., (2008), "Plant cryopreservation: A practical guide", *USDA-ARS National Clonal Germplasm Repository*,3(11), 33-410.

Reed B., (1990), "Survival of in vitro-grown apical meristems of *Pyrus* following cryopreservation", *Horticultural Science*, 25, 111-113.

Ren L., Zhang D., Jiang X., Gai Y., Wang W., Reed B.M. 2013, "Peroxidation due to cryoprotectant treatment is a vital factor for cell survival in *Arabidopsis* cryopreservation", *Plant Science* 212,37-47.

Furlán, L. T., Rodríguez, J. L., Padilla, A. P., Campderrós, M. E., Zaritzky, N. E. (2013). "Calorimetric Study of Inulin as Cryo- and Lyoprotector of Bovine Plasma Proteins, Applications of Calorimetry in a Wide Context- Differential Scanning Calorimetry", *Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry*, Editor: Dr. Amal Ali Elkordy, In Tech.

Rogulska O., Petrenko Y., Petrenko A. (2017), "DMSO-free cryopreservation of adipose-derived mesenchymal stromal cells: expansion medium affects post-thaw survival", *Cytotechnology*, 69(2), 265-276.

Sakai A., Engelmann F. (2007), "Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet vitrification: A review", *CryoLetters*, 28, 151-172.

Sakai A., Kobayash, S., Oiyama I., (1990), "Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.var. Tanaka) by vitrification", *Plant Cell Reports*,9, 30-33.

Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I., (1991), "Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange *Citrus sinensis* var. *brasiliensis tanaka* cooled to -196 °C", *Journal of Plant Physiology*, 137, 465–470.

Sakai A., (1986), "Cryopreservation of germplasm of woody plants", (Ed. Y.P.S. Bajaj), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 1,113-129.

Sakai A., (1997) "Conservation of Plant Genetic Resources In Vitro", (eds) Razdan MK and Cocking EC, *Science Publishers*, New Hampshire, 53-66..

Sakai A. (2004), "Plant cryopreservation". In: Fuller B. J. Lane N. Benson E. E. CRC, Boca Raton, 329–345.

Salma M., Fki L., Engelmann-Sylvestre I., Niino T. and Engelmann F. (2014), "Comparison of droplet-vitrification and D-cryoplate for cryopreservation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) polyembryonic masses", *Sci. Hort.* 179,91-97.

Schnyder H. (1993), "The role of carbohydrate storage and redistribution in the source–sink relations of wheat and barley during grain filling a review", *New Phytol.* 123,233–245.

Sharaf S.A., Shibli R.A., Kasrawi M.A., Baghdadi S.H., (2012), "Cryopreservation of wild Shih (*Artemisia herba-alba* Asso.) shoot-tips by encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 108, 437-444.

Shibli R., Shatnawi M., Subaih, W., Ajlouni M., (2006), "In vitro conservation and cryopreservation of plant genetic resources: A review", *World Journal of Agricultural Sciences*, 2, 372-382.

Staritsky G., Zandvoort E.A., (1985), "In vitro propagation and genetic conservation of tropical woody crops", *Acta Botanica Neerlandica*, 34,238.

Subramaniam Sreeramanan, "Cryopreservation of *Rosa hybrida* cv. Helmut Schmidt by PVS2 vitrification method using in vitro fragmented explants (IFEs).", *BioRxiv* (2019), 567255.

Sum A.K., de Pablo J.J., (2003), "Molecular simulation study on the influence of dimethylsulfoxide on the structure of phospholipid bilayers", *Biophys J*, 85,3636–3645.

Suzuki M., Tandon P., Ishikawa M. Toyomasu T., (2008), "Development of a new vitrification solution, VSL, and its application to the cryopreservation of gentian axillary buds", *Plant Biotechnology Reports*, 2, 123–131.

Suzuki M, Tandon P, Ishikawa M & Toyomasu T (2008) *Plant Biotechnol Rep*. 2, 123-131.

Swan T. W., Deakin E. A., Hunjan G., Souch G. R., Spencer M. E., Stafford A. M., Lynch P. T. (1998), "Cryopreservation of cell suspensions of *Polygonum aviculare* using traditional controlled rate freezing and encapsulation-dehydration protocols, a comparison of post-thaw cell recovery", *CryoLetters*, 19, 237-248.

Takahama U., (2004), "Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolics substrates by peroxidase: physiological significance of the oxidation reactions", *Phytochem* 3, 207–219.

Tanaka D., Sakuma Y., Yamamoto S., Matsumoto T., Niino, T. (2019), "Development of the V cryo-plate method for cryopreservation of in vitro rakkyo" (*Allium chinense* G. Don). *Acta Horticulturae*, (1234), 287–292.

Thirumala, S., Gimble, J.M., Devireddy, R.V. (2010), "Cryopreservation of stromal vascular fraction of adipose tissue in a serum-free freezing medium", *J Tissue Eng Regen Med*, 4, 224–232.

Toksoy Öner E., Hernández J., Combie J. (2016), "Review of levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects", *Biotechnology Advances*, 34, 827–844.

Uragami, A., Sakai, A., Nagai, M., Takahashi, T. (1989), "Survival of cultured cells and somatic embryos of (*Asparagus officinalis*) cryopreserved by vitrification", *Plant Cell Reports*, 8, 418-421.

Valluru R., Van den Ende W., (2008), "Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects", *Journal of Experimental Botany*, 59,11,2905–2916, 2008.

Van den Ende W, De Coninck B, Van Laere A., (2004), “Plant fructan exohydrolases: a role in signaling and defense? ”, *Trends Plant Sci.* 9:,523–528.

Van den Ende W. & Valluru R. (2009), “Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging?”, *J Exp Bot* 60, 9–18.

Van den Ende W. (2013), “Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides”, *Frontiers in Plant Science*, 4, 247.

Van den Ende W., Van Laere A., (2007), “Fructans in dicotyledonous plants: occurrence and metabolism. In: Shiomi N, Benkeblia N, Onodera S, eds. *Recent advances in fructo-oligosaccharides research*”, Trivandrum, India: Research Signpost, 1–14.

Vereyken I. J., van Kuik J. A., Evers T. H., Rijken P. J., de Kruijff B., (2003), “Structural Requirements of the Fructan-Lipid Interaction”, *Biophysical Journal*, 84(5), 3147–3154.

Vereyken I.J., Chupin V. Demel R.A., Smeekens S.C.M., DeKruijff, B., (2001), “Fructans insert between the headgroups of phospholipids”, *Biochim. Biophys. Acta* 1510,307- 320.

VersluysM., Kirtel O., Toksoy Öner E., Van den Ende W., (2018), “The Fructan Syndrome: Evolutionary Aspects and Common Themes Among Plants and Microbes”, *Plant Cell and Environment*, 41(1), 16-38.

Villalobos, V. M., Engelmann, F., (1995), “Ex situ conservation of plant germplasm using biotechnology”, *World Journal of Microbiology Biotechnology* 11, 375–382.

Volk G. M., Walters C., (2006), “Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection”, *Cryobiology*, 52, 48-61.

Wang Q., Valkonen P.T., (2009), “Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method”, *Trends in Plant Science*, 14 (3),119-122.

Wang Q. C., Cuellar W. J., Rajamäk M. L., Hiraka, Y., Valkonen J. P. T. (2008), “Combined thermo therapy and cryotherapy for virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips to efficient production of virus-free plants”, *Molecular Plant Pathology*, 9,237–250.

Web 1, (2017), <http://www.arabidopsis.org/index.jsp>, (Erişim tarihi: 20/04/2019).

Westh P., (2004), “Preferential interaction of dimethyl sulfoxide and phosphatidyl choline membranes”, *Biochim Biophys Acta*, 1664,217–223.

Wu Y., Engelmann F., Zhao Y., Zhou M., Chen S. (1999), “Cryopreservation of apple shoot tips: importance of cryopreservation techniques and conditioning of donor plants”, *Cryoletters*, 20, 121-130.

Yamamoto S, Fukui K, Rafique T, Khan NI, Martinez CRC, Sekizawa K, Matsumoto T and Niino T (2012b), "Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of strawberry by the vitrification method using aluminium cryo-plates", *Plant Gen. Res, Charac. and Uti.* 10, 14-19.

Yamamoto S, Rafique T, Fukui K, Sekizawa K and Niino T (2012a), "V-Cryo-plate procedure as an effective protocol for cryobanks: Case study of mint cryopreservation", *CryoLett.* 33,12-23.

Yamamoto, S. I., Rafique, T., Priyantha, W. S., Fukui, K., Matsumoto, T. & Niino, T. (2011), "Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates", *CryoLetters*, 32(3), 256-265.

Younis L. S., (2012), "In vitro multiplication and conservation of *Acheillea fragrantissima* Foorssk", SCH. BIP. M. Sc.Thesis. The university of Jordan, Amman, Jordan.

Zhao Y., Wu Y., Engelmann F., Zhou M., Chen S., (1999), "Cryopreservation of apple shoot tips by encapsulation-dehydration: Effect of preculture, dehydration and freezing procedure on shoot regeneration", *Cryoletters*, 20, 103-108.

ÖZGEÇMİŞ

İrem BAKŞAN İLTER, 29 Eylül 1994'de Edirne'de doğdu. 2013 yılında Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2017 yılında tamamladıktan sonra aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen Yüksek Lisans eğitimine devam etmektedir.