

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALEV AĞACI (*Photinia X fraseri* Dress.) BİTKİSİNİN
KRİYOPREZERVASYONU VE KRİYOPREZERVE EDİLEN
BİTKİLERİN GENETİK KARARLILIKLARININ MOLEKÜLER
BELİRTEÇLER İLE İNCELENMESİ

MUHAMMED HAMİT EKİNCİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2013

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALEV AĞACI (*Photinia X fraseri* Dress.)
BİTKİSİNİN KRİYOPREZERVASYONU VE
KRİYOPREZERVE EDİLEN BİTKİLERİN
GENETİK KARARLILIKLARININ
MOLEKÜLER BELİRTEÇLER İLE
İNCELENMESİ

MUHAMMED HAMİT EKİNCİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DOÇ. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

GEBZE

2013



**GEBZE YÜKSEK
TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...17.06.2013..... tarih ve ...2013./...32..... sayılı kararıyla oluşturulan
jüri tarafından ...29.../...08.../...2013... tarihinde tez savunma sınavı yapılan
Muhammed Hamit Ekinci.....'nin tez çalışması
Moleküler Biyoloji ve Genetik.....Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak
kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

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

ÜYE

: Doç. Dr. Yıldız AYDIN

ÜYE

: Doç. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

ONAY

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Etkileyici yaprak renkleri ile her dem yeşil olan alev ağacı (*Photinia X fraseri* Dress.) ticari öneme sahip odunsu bir süs bitkisidir. Geleneksel olarak vejetatif üretimi sırasında köklenme gibi bazı sorunlarla karşılaşılması nedeniyle bitki doku kültürü gibi biyoteknolojik yöntemler türün çoğaltılmasında tamamlayıcı bir strateji olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra ticari önemi sebebiyle türün orta ve uzun süreli (kriyoprezervasyon) korunması da son zamanlarda önem kazanmıştır. Ancak, alev ağacının kriyoprezervasyon sonrasında ana bitki ve kriyoprezerve edilen bireyler arasında genetik varyasyon oluşma riski, kriyoprezervasyon sonrasında türün genetik kararlılıklarının da belirlenmesi gerekliliğini ortaya çıkartmaktadır. Bu nedenle, tez kapsamında kriyoprezervasyonun soğuğa alıştırma basamağının optimize edilmesinin yanı sıra alev ağacının kriyoprezerve edilen gövde uçlarından gelişen bitkilerin genetik kararlılıkları da retrotranspozona dayalı iki farklı (IRAP ve REMAP) moleküler belirteç kullanılarak irdelendi. IRAP analizlerinde ana bitki ve klonları arasında % 52.1 ortalama polimorfizm (ortalama PIC değeri 0.307); REMAP analizlerinde ise % 47.2 ortalama polimorfizm (ortalama PIC değeri 0.353) elde edildi. İki farklı moleküler belirtecin kullanımıyla elde edilen sonuçlara göre uygulanan kriyoprezervasyon protokolünün sıvı azot sonrası gelişen bitkilerde kabul edilebilir bir varyasyona (PIC değeri < 0.5) neden olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Alev Ağacı; Retrotranspozonlara Dayalı Moleküler Belirteçler; Genetik Kararlılık; IRAP; REMAP.

SUMMARY

Fraser photinia (*Photinia X fraseri* Dress.) with its impressive leaf colour is an evergreen woody ornamental plant that has commercial importance. Due to the rooting problems faced in its traditional vegetative propagation of the species, biotechnological methods such as plant tissue culture is used as a complementary strategy to propagation. Moreover, medium and long-term (cryopreservation) preservation of the species also gained importance recently as photinia has economic importance. However, occurrence of risk of possible genetic variation between the mother plant and cryopreserved individuals after cryopreservation, reveals the necessity of assessment of genetic stability of the long-term preserved species. Therefore, genetic stability of the plantlets proliferated from cryopreserved fraser photinia shoot tips was assessed by two retrotransposon-based molecular markers (IRAP and REMAP) in addition to the optimization of cold hardening stage of the cryopreservation in the frame of this thesis. 52.1 % of mean polymorphism (mean PIC value is 0.307) was found between mother plant and clones by IRAP analysis while 47.2 % of mean polymorphism (mean PIC value is 0.353) was detected via REMAP. According to the results of observed with these two marker systems, applied cryopreservation protocol caused an acceptable level of polymorphism (PIC value < 0.5) in the plantlets proliferated after liquid nitrogen.

Keywords: Fraser Photinia; Retrotransposon-based Molecular Markers; Genetic Stability; IRAP; REMAP.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sırasında her ihtiyaç duyduğum anda, engin bilgisini ve her türlü maddi manevi desteğini esirgemeyen, akademik duruşu ile ufkumu açan ve bana ilham veren sevgili hocam, Doç. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez kapsamında yaptığım moleküler analizleri, pratikte öğrenmemde çok büyük katkısı olan, bilgi ve deneyimlerini paylaşmaktan kaçınmayan Dr. Mine GÜL ŞEKER'e teşekkür ederim.

GYTE MBG Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'na ilk geldiğim andan itibaren, gerek derslerim, gerekse deneylerim sırasında bilgisini ve tecrübesini esirgemeyen Veysel SÜZERER'e ve Dr. P. Hülya AKDEMİR KOÇ'a teşekkür ederim.

GYTE MBG Bitki Biyoteknolojisi Ekibi'ne, Uzm. Dr. Ergun KAYA, Arş. Gör. Emrah KIRDÖK, Arş. Gör. İbrahim KOÇ ve Arş. Gör. Doğa GÜMÜŞEL KAYIHAN'a yardımları için teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim sırasında tanıştığım ve her türlü desteklerini fazlasıyla hissettiğim GYTE MBG Bölümü Lisanüstü öğrencileri Ceyhun ÖZTÜRK, Şerif YILMAZ, Taner ŞAR ve Ebru TURHANLAR'a ayrıca teşekkür ederim.

Dostluklarını tarif edemediğim ve varlıkları ile kendimi şanslı hissettiğim iki insan, GYTE MBG Bölümü Arş. Gör. Irmak ŞAH ve Arş. Gör. Serda KAYMAN'a çok teşekkür ederim.

Bölümümüze modern bir bina kazandırılmasında önemli bir rolü olan GYTE MBG Bölümü Eski Başkanı merhum Prof. Dr. Fusun GÜMÜŞEL'e teşekkür ederim.

Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya ve ayrıca GYTE MBG Öğretim Üyeleri, Doktora ve Yüksek Lisans Öğrencilerine teşekkür ederim.

Tez teslim sürecinde karşılaştığım tüm sorunlar ile yakından ilgilenen ve çözüm üreten GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Sekreteri Neriman UĞUZ'a teşekkür ederim.

İdealist, eğitmen bir babanın vasiyetini yerine getirmek için ömrünü çocuklarının eğitimlerine adayan ve bu uğurda hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, hayatımda değer verilecek herşeyin üzerinde tuttuğum biricik anneme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. ALEV AĞACININ (<i>Photinia X fraseri</i> Dress) KÖKENİ ve GELENEKSEL YÖNTEMLER ile ÇOĞALTIMI	3
3. ALEV AĞACININ BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE <i>IN VITRO</i> ÇOĞALTIMI	6
4. BİTKİLERİ KORUMA STRATEJİLERİ	9
4.1. <i>In Situ</i> Koruma Yöntemleri	9
4.2. <i>Ex Situ</i> Koruma Yöntemleri	9
5. ALEV AĞACI BİTKİSİNİN <i>IN VITRO</i> KORUNMASI	10
5.1. Orta Süreli Saklama	10
5.2. Uzun Süreli Saklama (Kriyoprezervasyon)	12
6. GENETİK KARARLILIK	19
6.1. Retrotranspozonlar ve Retrotranspozonlara Dayalı Belirteçler	21
7. MATERYAL ve YÖNTEMLER	24
7.1. Materyal	24
7.1.1. Bitki Materyali	24
7.1.2. Kullanılan Malzemeler	24
7.1.3. Kullanılan Cihazlar	28
7.2. Yöntemler	29
7.2.1. Besi Ortamı	29
7.2.2. Alev Ağacının Kriyoprezervasyonu	31

7.2.3. Termal Analizler (DSC, Diferansiyel Tarama Kalorimetresi)	35
7.2.4. Kriyoprezervasyon Verilerinin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizleri	35
7.2.5. Moleküler Analizler	36
7.2.5.1. CTAB Yöntemi ile Genomik DNA İzolasyonu	37
7.2.5.2. IRAP Analizleri	39
7.2.5.3. REMAP Analizleri	40
7.2.5.4. Agaroz Jel Elektroforezi	42
7.2.5.5. IRAP ve REMAP Verilerinin Değerlendirilmesi	43
8. BULGULAR	44
8.1. Kriyoprezervasyon Çalışmaları	44
8.2. Termal Analizler	46
8.3. Moleküler Analizler	50
8.3.1. Genomik DNA İzolasyonu	50
8.3.2. IRAP Analizleri	51
8.3.3. REMAP Analizleri	64
8.3.4. IRAP ve REMAP Verilerinin Değerlendirilmesi	78
9. TARTIŞMA	79
9.1. Kriyoprezervasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi	79
9.2. Kriyoprezerve Edilen Alev Ağacının Genetik Kararlılıklarının İrdelenmesi için Yapılan IRAP ve REMAP-PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	82
10. SONUÇ	85
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	101

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
$^{\circ}\text{C}$	: Derece Santigrat
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
\$	: Amerikan Doları
%	: Yüzde
$\leq$	: Küçük Eşit
λ	: <i>HindIII</i> Marker
χ^2	: Ki Kare Testi
f_i	: Bir Bandın Varolma Sıklığı
Ca-aljinat	: Kalsiyum Aljinat
Ca(NO ₃)	: Kalsiyum Nitrat
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
CCC	: 2- kloroetil trimetilamonyum klorid
CoCl ₂	: Kobalt klorür
CuSO ₄	: Bakır sülfat
dH ₂ O	: Distile Su
FeSO ₄	: Demir Sülfat
GA ₃	: Gibberilik Asit
H ₃ BO ₃	: Borik Asit
HCl	: Hidroklorik Asit
KH ₂ PO ₄	: Potasyum Fosfat
KI	: Potasyum İyodür
KNO ₃	: Potasyum Nitrat
MgSO ₄	: Magnezyum Sülfat
MnSO ₄	: Mangan Sülfat
Na-aljinat	: Sodyum Aljinat
Na ₂ EDTA	: Sodyum Etilendiamintetraasetik Asit
Na ₂ MoO ₄	: Molibdik Asit

NaCl	: Sodyum Klorür
NH ₄ NO ₃	: Amonyum Nitrat
ZnSO ₄	: Çinko Sülfat
ABA	: Absisik Asit
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism, Çoğaltılmış Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi
Ana	: Ana Materyal
BA	: Benziladenin
bç	: Baz Çifti
CH	: Cold Hardening, Soğuğa Alıştırma
cm	: Santimetre
CTAB	: Setil Trimetil Amonyum Bromid
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DSC	: Differansial Scanning Calorimeter, Diferansiyel Taramalı Kalorimerte
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EG	: Etilen Glikol
gDNA	: Genomik DNA
GOK	: Gövde Oluşturma Kapasitesi
GYTE	: Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü
IBA	: 3-indol Bütrik Asit
IRAP	: Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism, Retrotranspozonlar Arası Çoğaltılmış Polimorfizm
ISSR	: Inter-Simple Sequence Repeat, Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm
IUCN	: International Union for Conservation of Nature, Uluslararası Doğayı Koruma Derneği
kb	: Kilo Baz
LTR	: Long Terminal Repeat, Uzun Uç Tekrarları
M	: 1kb + 100bp Marker
MS	: Murashige ve Skoog Besi Ortamı

mW	: Milivat
ng	: Nanogram
PC	: Pre-culture, Ön Kùltür
PEG	: Polietilen Glikol
PG	: Floroglukinol
PGPR	: Plant Growth Promoting Rhizobacteria, Bitki Büyümesini Teşvik Edici Rizobakteriler
PIC	: Polymorphism Information Content, Polimorfizm Bilgi İçeriği
PV	: PVS2 ile İnkübasyon
PVP	: Polivinil Prolidon
PVS2	: Plant Vitrifikaşon Soluşon ² , Bitki Vitrifikaşon Çözeltisi ²
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QL	: Quoirin ve Lepoivre Besi Ortamı
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA, Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
REMAP	: Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism, Retrotranspozon Mikrosatellit Çoğaltılmış Polimorfizm
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism, Restriksiyon Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi
rpm	: Revolutions Per Minute, Dakikada Dönüş Hızı
S.B.Y.K	: Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı
SA	: Sıvı Azot
SSR	: Simple Sequence Repeat, Basit Tekrarlı Diziler
TAE	: Tris-Asetik asit-EDTA
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
WPM	: Woody Plant Medium, Odunsu Bitkilerin Çoğaltım Besi Ortamı

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: <i>Photinia</i> (Alev ağacı) süs bitkisinin genel görünümü.	3
2.2: a) Gövde ucunda oluşan kırmızı yapraklar, b) Alev ağacında bahar aylarında oluşan beyaz çiçekler.	4
5.1: Damlacık vitrifikasyon yönteminde kullanılan PVS2 ve gövde uçlarını içeren alüminyum folyolar.	15
6.1: LTR transpozonun organizasyonu. PBS ve PPT; Ters transkriptaz enzimi tarafından, replikasyon için gerekli primer bağlanma bölgeleri.	21
6.2: Retrotranspozonlara dayalı moleküler belirteç teknikleri, a) IRAP yöntemi, b) REMAP yöntemi.	22
7.1: Damlacık vitrifikasyon / tek aşamalı dondurma yöntemi ile 4 veya 6 hafta 4 °C'ta soğuğa alıştırılan alev ağacına ait gövdelerden elde edilen gövde uçlarının kriyoprezervasyon basamakları, a) 0.5 M sukroz içeren MS besiortamında karanlıkta 3 gün inkübe edilen gövde uçları, b) PVS2 çözeltisinin steril folyolar üzerine damlatılması, c) Her bir PVS2 damlasının üzerine 1 gövde ucunun aktarılması, d ve e) 0°C'ta folyoların farklı zaman aralıklarında inkübasyonu, f) İnkübasyonun ardından SA'ya aktarılmayan kontrol grubuna ait gövde uçlarının 1.2 M sukroz içeren MS besiortamında çözülmesi, g) 30 dakika inkübasyonun ardından kontrol grubuna ait gövde uçlarının 1 mg l ⁻¹ BA içeren QL besiortamına aktarılması, h) PVS2 ile farklı zaman aralıklarında inkübasyonun ardından, folyoların yerleştirileceği kriyoviallerin SA ile doldurulması, ı) SA dolu kriyoviallere üzerinde PVS2 damlacıkları içinde gövde uçları bulunan folyoların aktarılması (SA grubu), j) Kriyoviallerin büyük kriyokutucuklara aktarılıp, doğrudan SA tankına aktarılması, k) En az 1 saat süreyle SA tankında tutulan kriyoviallerin laminar akımlı kabinde kapaklarının açılarak, tekrar SA ile doldurulması ve sırasıyla 1.2 M sukroz içeren MS besiortamında 30 dk çözülmesi (f) ve çözünen gövde uçlarının proliferasyon besiortamına aktarımı, (g).	34

8.1: 4 veya 6 hafta 4 °C'ta soğuğa alıştırılıp kriyoprezerve edilen gövde uçlarının canlılık ve proliferasyon görüntüleri, a) 4 hafta kontrol grubu, b) 4 hafta SA grubu, c) 6 hafta kontrol grubu, d) 6 hafta SA grubu, a ve b için siyah bar 0.74 cm, c ve d için ise 0.73 cm.	45
8.2: Standart büyüme koşullarından alınan kontrol grubuna ait gövde uçlarının termal geçişlerinin DSC taraması görüntüsü.	46
8.3: Standart büyüme koşullarından alınarak 4 hafta 4 °C'ta soğuğa alıştırılan uçlarının termal geçişlerinin DSC taraması görüntüsü.	47
8.4: 4 hafta 4 °C'ta soğuğa alıştırma aşamasını takiben 0.5 M sukroz içeren MS besi ortamında ön kültüre alınan gövde uçların termal geçişlerinin DSC taraması görüntüsü.	47
8.5: Ön kültür aşamasından sonra 120 dk PVS2 çözeltisinde inkübe edildikten sonra alınan gövde uçlarının termal geçişlerinin DSC taraması görüntüsü.	48
8.6: Standart büyüme koşullarından alınarak 6 hafta 4 °C'ta soğuğa alıştırılan gövde uçlarının termal geçişlerinin DSC taraması görüntüsü.	48
8.7: 6 hafta 4 °C'ta soğuğa alıştırma aşamasını takiben 0.5 M sukroz içeren MS besi ortamında ön kültüre alınan gövde uçların termal geçişlerinin DSC taraması görüntüsü.	49
8.8: Ön kültür aşamasından sonra 120 dk PVS2 çözeltisinde inkübe edildikten sonra alınan gövde uçlarının termal geçişlerinin DSC taraması görüntüsü.	49
8.9: Alev ağacı ana bitkisine ve 6 hafta soğuğa alıştırmayı takiben kriyoprezervasyon sürecinde alınan kontrol bitkilerine ait gDNA'ların jel görüntüsü.	51
8.10: LTR-1 primeri ile elde edilen IRAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).	52
8.11: LTR-2 primeri ile elde edilen IRAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).	53
8.12: LTR-3 primeri ile elde edilen IRAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).	54
8.13: LTR-4 primeri ile elde edilen IRAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).	55
8.14: LTR-5 primeri ile elde edilen IRAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).	56
8.15: LTR-6 primeri ile elde edilen IRAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).	57
8.16: LTR-7 primeri ile elde edilen IRAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).	58
8.17: LTR-8 primeri ile elde edilen IRAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).	59

8.18: LTR-9 primeri ile elde edilen IRAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).	60
8.19: LTR-10 primeri ile elde edilen IRAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).	61
8.20: Alev ağacı ve 12 klonundan, 10 IRAP primeri ile elde edilen 192 banttandır UPGMA analizi ile oluşturulan dendogram.	64
8.21: REMAP-1 primeri ile elde edilen REMAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).	65
8.22: REMAP-2 primeri ile elde edilen REMAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).	66
8.23: REMAP-3 primeri ile elde edilen REMAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).	67
8.24: REMAP-4 primeri ile elde edilen REMAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).	68
8.25: REMAP-5 primeri ile elde edilen REMAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).	69
8.26: REMAP-6 primeri ile elde edilen REMAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).	70
8.27: REMAP-7 primeri ile elde edilen REMAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).	71
8.28: REMAP-8 primeri ile elde edilen REMAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).	72
8.29: REMAP-9 primeri ile elde edilen REMAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).	73
8.30: REMAP-10 primeri ile elde edilen REMAP profilleri (% 1.5'lu agaroz jel).	74
8.31: Alev ağacı ve 12 klonundan, 10 REMAP primeri ile elde edilen 216 banttandır UPGMA analizi ile oluşturulan dendogram.	77

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Alev ağacı bitkisinin mikroçoğaltımı konusunda yapılan çalışmalar.	8
5.1: Alev ağacı bitkisinin <i>in vitro</i> korunması konusunda yapılan çalışmalar.	18
7.1: Doku kültüründe kullanılan bileşenler.	25
7.2: Kriyoprezervasyon çalışmalarında kullanılan bileşenler.	26
7.3: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan bileşenler.	26
7.4: PZR reaksiyonlarında ve agaroz jelin hazırlanıp görüntülenmesinde kullanılan bileşenler.	27
7.5: Tez kapsamında kullanılan cihazlar.	28
7.6: QL ve MS besi ortamı stok çözeltilerinin içerikleri (1L).	30
7.7: 1 mg l ⁻¹ BA içeren QL besi ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler (1 L).	31
7.8: 0.5 M sukroz içeren MS besi ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler (1 L).	32
7.9: PVS2 hazırlanmasında kullanılan bileşenler (200 mL).	33
7.10: 1.2 M sukroz içeren MS besi ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler (1 L).	33
7.11: CTAB çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan bileşenler. (1L)	38
7.12: IRAP analizlerinde kullanılan primerlerin baz dizileri.	40
7.13: REMAP analizlerinde seçilen ISSR primerlerin baz dizileri.	40
7.14: REMAP için primer kombinasyonları.	41
8.1: 4 hafta 4 °C'ta veya 6 hafta 4 °C'ta soğuga alıştırılıp kriyoprezerve edilen gövde uçlarının canlılık ve proliferasyon oranlarının istatistiksel analiz sonuçları.	44
8.2: Alev ağacı ana bitkisine ve 6 hafta soğuga alıştırmayı takiben kriyoprezervasyon sürecinde alınan kontrol bitkilerine ait gDNA'ların spektrofotometrik ölçüm sonuçları.	50
8.3: LTR-1 primeri ile elde edilen bant sonuçları.	52
8.4: LTR-2 primeri ile elde edilen bant sonuçları.	53
8.5: LTR-3 primeri ile elde edilen bant sonuçları.	54

8.6: LTR-4 primeri ile elde edilen bant sonuçları.	55
8.7: LTR-5 primeri ile elde edilen bant sonuçları.	56
8.8: LTR-6 primeri ile elde edilen bant sonuçları.	57
8.9: LTR-7 primeri ile elde edilen bant sonuçları.	58
8.10: LTR-8 primeri ile elde edilen bant sonuçları.	59
8.11: LTR-9 primeri ile elde edilen bant sonuçları.	60
8.12: LTR-10 primeri ile elde edilen bant sonuçları.	61
8.13: Alev ağacı klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan IRAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilir bant ve polimorfik bant sayısı ve yüzdesi.	62
8.14: Alev ağacı ana materyali ile klonları arasında IRAP analizi ile elde edilen benzerlik matriksi.	63
8.15: REMAP-1 primeri ile elde edilen bant sonuçları.	65
8.16: REMAP-2 primeri ile elde edilen bant sonuçları.	66
8.17: REMAP-3 primeri ile elde edilen bant sonuçları.	67
8.18: REMAP-4 primeri ile elde edilen bant sonuçları.	68
8.19: REMAP-5 primeri ile elde edilen bant sonuçları.	69
8.20: REMAP-6 primeri ile elde edilen bant sonuçları.	70
8.21: REMAP-7 primeri ile elde edilen bant sonuçları.	71
8.22: REMAP-8 primeri ile elde edilen bant sonuçları.	72
8.23: REMAP-9 primeri ile elde edilen bant sonuçları.	73
8.24: REMAP-10 primeri ile elde edilen bant sonuçları.	74
8.25: Alev ağacı klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan REMAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilir bant ve polimorfik bant sayısı ve yüzdesi.	75
8.26: Alev ağacı ana materyali ile klonları arasında REMAP analizi ile elde edilen benzerlik matriksi.	76
8.27: IRAP ve REMAP analizlerindeki kriyoprezervasyonun çeşitli basamaklarındaki kontrol bireylerin benzerlik ortalamaları.	78

1. GİRİŞ

Genel bir kavram olan süs bitkileri; kesme çiçekler, iç mekan (saksı-salon) süs bitkileri, dış mekan süs bitkileri ve doğal çiçek soğanları (geofitler) olmak üzere dört alt grupta incelenmektedir. Bazı ülkelerde (Kolombiya, İsrail, Kenya, Ekvator vs.) süs bitkileri, özellikle de kesme çiçekler, geleneksel ana ihraç ürünleri arasına girmiştir. Rabo Bank / Hollanda'nın tahminlerine göre dünyada süs bitkileri ticaret hacmi 50 milyar \$ civarındadır.

Süs bitkilerinin üretimi, hem dünyada hem de Türkiye'de önemli bir sektördür. Gelişmiş ülkelerin yanında, uygun ekoloji ve ucuz iş gücü olanaklarını süs bitkileri üretiminde kullanan gelişmekte olan bazı Afrika, Asya ve Güney Amerika ülkeleri de bu şekilde önemli ölçüde ihracat geliri elde etmektedirler.

Ekonomik değerinin yüksek olmasından dolayı süs bitkileri üzerine birçok araştırma yapılmıştır. Geleneksel olarak çeliklenme ile çoğalan alev ağacı gibi süs bitkilerinin kitle üretimi günümüzde *in vitro* doku kültürleri sayesinde gerçekleşmektedir.

Doku kültürü teknikleri kullanılarak bitki genetik kaynaklarının korunması son yıllarda muazzam bir gelişme göstermiş [Neitzsche, 1983], [Moges et al., 2003] ve gövde uçlarının ya da meristemlerinin bitki uluslararası germplazm koruma laboratuvarlarında *in vitro* koşullarda saklanması sağlamıştır.

In vitro kültür temelli biyoteknolojik yöntemler ve doku kültürü yöntemleri, bitki ıslahına, kitle çoğaltımına ve özellikle vejetatif olarak çoğalan bitki germplazmalarının korunmasına olanak sağlar [Negash et al., 2001]. *In vitro* yöntemlerle genetik çeşitliliğin korunması ve kullanımı, geleneksel yöntemlerin uygulanmasının zor olduğu veya saklanması pahalı veya riskli olan tohumların *in situ* veya *ex situ* korunmasına tamamlayıcı bir yaklaşımdır [Negash et al., 2001]. *In vitro* koruma çalışmaları, bitkilere ait eksplantların patojensiz bir ortamda orta ya da uzun süreli saklanması sağlamaktadır [Engelmann et al., 2003]. Bu nedenle, tez kapsamında alev ağacı bitkisine ait germplazmanın uzun süreli saklanması için kriyoprezervasyon tekniği kullanılmış ve saklama sonrası korunan materyalin genetik kararlılığı retrotranspozonlara dayalı moleküler belirteçler ile irdelenmiştir.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Geleneksel olarak vejetatif çoğaltılması zor olan odunsu bitkilerin çoğunda olduğu gibi alev ağacında da doku kültürü koşullarında geliştirilecek protokoller, türün hem çoğaltım potansiyelini artırmakta hem de *in vitro* korunmasına olanak sağlamaktadır. Özellikle ticari açıdan dünyada ve Türkiye’de süs bitkilerinin yüksek piyasa değerine sahip olması ve gen kaynaklarının korunması için bu bitkilerin kriyoprezervasyonu önemlidir [Keller et al., 2008]. Korunan süs bitkilerinin kriyoprezervasyon sonrası genetik kararlılıklarını da korumaları gerekmektedir. Bu nedenle, sunulan tez çalışmasında, GYTE Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarında *in vitro* koşullarda çoğaltılmış olan alev ağacı (*Photinia X fraseri* Dress.) bitkisinin gövde uçları kullanılarak bu bitkinin kriyoprezervasyonunun, Ozden Tokatlı ve Akdemir (2010) tarafından geliştirilmiş olan protokol (damlacık vitrifikasyon tekniği) ile tekrar yapılması ve kriyoprezervasyon sonrasında elde edilen bitkiciklerden genomik DNA izolasyonu yapılarak, retrotranspozonlara dayalı moleküler belirteçler (IRAP ve REMAP) yardımıyla, oluşabilecek olası somaklonal varyasyonların belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tez kapsamında, alev ağacı bitkisinin damlacık vitrifikasyon yöntemi ile kriyoprezervasyonunu takiben yapılan moleküler analizler ile saklanan materyalin genetik kararlılığın irdelenmesi, optimize edilen yöntemle alev ağacına ait germplazmanın uzun süreli saklanmasına katkı sağlayacaktır. Bu nedenle tezin içeriğini, alev ağacı bitkisine ait germplazmanın uzun süreli korunması için kriyoprezervasyon tekniğinin optimizasyonu ve bu tekniğin saklanan materyalde genetik değişiklikliğe yol açıp açmadığının retrotranspozonlara dayalı 2 moleküler belirteç kullanılarak irdelenmesi oluşturmaktadır.

2. ALEV AĞACININ (*Photinia X fraseri* DRESS.) KÖKENİ ve GELENEKSEL YÖNTEMLER ile ÇOĞALTIMI

Japonya kökenli *Photinia glabra* ve Çin kökenli *Photinia serrulata* arasındaki hibritleşme ile meydana gelmiş ve *Rosaceae* ailesinin bir üyesi olan alev ağacı (*Photinia X fraseri* Dress.) her dem yeşil, 3-5 metreye kadar uzayabilen, odunsu bir süs bitkisidir [Larraburu et al., 2007], (Şekil 2.1).

Photinia genusu; özellikle endemik türlerin de içinde bulunduğu 43 türü Çin’de olmak üzere yaklaşık 60 kadar türle Asya, Meksika ve Çin’de yayılım göstermektedir. Bu türlerden, yaprakları bronz-kırmızı renkte olan *P. glabra* 3-4 metreye kadar, *P. serrulata* ise ortalama 6-9 metre uzayabilmektedir. Yaprakları açık yeşil-bronz renkte olan *P. fraseri* hem *P. serrulata*’ya hem de *P. glabra*’ya oranla daha geniş yapraklı bir bitkidir. *P. fraseri* ’nin fidecilikte çokça tercih edilen bir süs bitkisi olmasının nedeni, etkileyici yaprak özellikleri, renkleri ve hızlı büyüme özelliğidir [Kane, 1987].



Şekil 2.1: *Photinia* (Alev ağacı) süs bitkisinin genel görünümü.

Sahip olduğu yoğun kırmızı renk nedeniyle en uçtaki yapraklar oldukça dikkat çekicidir (Şekil 2.2a). Alev ağacının uzun, düz ve parlak olan yaprakları soğuk koşullara dirençlidir. Çiçeklenme, büyük terminal kümecikler halinde, bahar aylarında gerçekleşmektedir [Brickell, 1996], (Şekil 2.2b). Çiçekler 2-3 hafta dalları süslemektedir. Sonbaharda ise baharda açan çiçeklerin yerine kırmızı renkli meyveler görülmektedir [Lingdi and Spongberg, 2003]. Yeni çıkan yapraklar açık

kırmızı renklidir ve yapraklar bu kırmızı rengi, yeşil renge dönünceye kadar 2-4 hafta korumaktadır [Slater et al., 2007].



Şekil 2.2: a) Gövde ucunda oluşan kırmızı yapraklar, b) Alev ağacında bahar aylarında oluşan beyaz çiçekler.

Alev ağacı, yol kenarlarında, park ve bahçelerde, çit ya da süs bitkisi olarak kullanılmaktadır. Zayıf drenaja, hava kirliliğine, kurak topraklara sahip şehir alanlarında bile yetişebilen bir ağaçtır [Gilman and Watson, 1994]. Etkileyici yaprakları ve olumsuz çevre koşullarına olan direnci nedeniyle türün ekonomik ve çevresel değeri artmaktadır [Deng et al., 2004]. Bu nedenle, son zamanlarda ülkemizde de özellikle park ve bahçelerde süs bitkisi olarak kullanılmaktadır.

Yapılan araştırmalar, alev ağacının ağır metal kirliliği olan topraklarda da gayet iyi büyüme gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Bazı araştırmacılar türün ağır metal absorbe etme özelliğinin ileride yapılacak çalışmalarla araştırılabileceğini belirtmişlerdir [Yang et al., 2004].

Alev ağacı (*Photinia fraseri*) bitkisi dış mekan süs bitkileri arasına girmektedir. Dış mekan süs bitkileri genellikle park ve bahçelerin düzenlenmesinde, rekreasyon sahalarında, karayolu ve metropollerin ağaçlandırılmalarında kullanılan odunsu ve otsu bitkilerdir [S.B.Y.K Planı, 2001].

Odunsu bitkilerin üretilmesinde, özellikle köklenmenin zor olduğu türlerde çeliklerin köklenmesi ile ilgili sorunların giderilmesinde, hastalıklara dirençli türlerin çoğaltılmasında ve genetik aktarım çalışmaları için hedef materyalin sağlanmasında bitki doku kültürü teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır [Merkle and Dean, 2000], [von Aderkas and Bonga, 2000]. Özellikle ticari öneme sahip olan vejetatif veya generatif olarak üretilen odunsu süs bitkileri, yukarıda sayılan kullanım

alanlarına ek olarak, hızlı klonal üretim, patojenlerin eliminasyonu ve hibrit bitkilerin klonlanması amacıyla da *in vitro* teknikler ile üretilmektedir. Dünyanın birçok yerinde, bahçe bitkilerinin mikroçoğaltımı için ticari amaçlı laboratuvarlar kurulmuştur [Akin-Idowu, 2009].

3. ALEV AĞACININ BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE *IN VITRO* ÇOĞALTIMI

Vejetatif üretimde karşılaşılan, yukarıda da değinilen zorlukların aşılmasında birçok türde, bitki doku kültürü tekniklerinden yararlanılmaktadır [Kane et al, 1987], [Larraburu et al., 2007].

İlk uygulaması Harberlandt (1902) tarafından gerçekleştirilen bitki doku kültürü, aseptik koşullar altında bitkinin hücre, doku ve organ gibi çeşitli kısımlarından uygun ışık ve sıcaklık şartlarında, besi ortamında yeni bitki kısımları ve bitkisel ürünler elde edilmesidir [Thorpe, 2007]. Bitki doku kültürü uygulamalarına, mikroçoğaltım, somatik embriyogenesis, organogenesis, somaklonal varyasyon, somatik hibridizasyon, ikincil ürün üretimi, gen kaynaklarının muhafazası örnek verilebilir. Bitki doku kültürü teknikleri, geleneksel çoğaltımda (aşılama ve çelikleme) karşılaşılan zorlukların giderilmesi için de kullanılmaktadır [Cheong, 2012].

Alev ağacının *in vivo* köklenmesinde karşılaşılan sorunlar nedeniyle son zamanlarda köklenmenin iyileştirilmesine yönelik *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Bu bağlamda yüksek derişimde oksin (IBA; 3-indol bütrit asit) kullanılarak *in vitro* çoğaltılan gövdelerin uyarılması, floroglukinol (PG) gibi fenolik bileşenlerin besi ortamına eklenmesi [Ramirez-Malagón et al., 1997] veya bitkilerin köklenmesini teşvik eden ve bitkinin rizosferinde kolonize olan rizobakterilerin (PGPR; Bitki büyümesini teşvik edici rizobakteriler) besi ortamına eklenmesi [Larraburu et al., 2007] ve sıvı kültürlerin, mikroçoğaltım iyileştirilmesi için kullanımı [Akbulak, 2011] gibi çalışmalar yapılmıştır.

Fenolik bileşenlerin bitki gelişimine hem uyarıcı hem de baskılayıcı etkileri olduğu bilinmektedir. Alev ağacı gibi *Rosaceae* ailesinin bir üyesi olan elma (*Malus domestica* Borth.) bitkisinde ve farklı bitki türlerinde, PG fenolik bileşeninin, kök oluşumunu teşvik ettiği rapor edilmiştir [Hammatt and Grant, 1993]. Bu nedenle, Ramirez-Malagón ve arkadaşları (1997) tarafından PG fenolik bileşeninin alev ağacı bitkisinin köklendirilmesine etkisinin incelenmesi için yapılan çalışmada, çeşitli derişimlerde (4.4, 13.3, 22.2 veya 44.4 μ M) 6-benziladenin (BA) içeren MS [Murashige and Skoog, 1962] besi ortamına PG (634.4 μ M) eklenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre gövde çoğaltımının uyarılmasını en iyi sağlayan besi ortamının PG içermeyen 44.4 μ M BA ile desteklenmiş MS besi ortamı olduğu rapor edilmiştir. En

iyi köklenme ise gövdelerin 442.9 μM IBA'nın 6 gün uygulanmasından sonra 634.4 μM PG içeren besi ortamına aktarılması ile elde edilmiştir. Fenolik bileşenlerin kültür ortamına katılmasına ek olarak, *in vitro* koşullarda kültüre alınan bitkilerde köklenmenin ve büyümenin teşvik edilmesi ve hiperhidrisitenin azaltılması için yararlı mikroorganizmaların kullanımı konusunda da yapılan çalışmalar bulunmaktadır [Burns and Schwarz, 1996], [Shetty et al., 1996], [Nowak, 1998], [Mirza et al., 2001]. PGPR olarak bilinen bu mikroorganizmalar başlıca *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* ve *Pseudomonas* cinsleridir.

Doku kültüründe PGPR kullanımının, mikroçoğaltım ile elde edilen gövdelerin köklendirilmesine olan etkisinin alev ağacı bitkisinde denendiği çalışmada [Larraburu et al., 2007], gövde uçlarının köklenmesi, kültür besi ortamına hem oksin eklenerek hem de *Azospirillum brasilense* ve *Azotobacter chroococcum* aşılanarak arttırılmaya çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre bakteriyel aşılama, alev ağacı gövdelerinin daha erken köklenmesini sağlamıştır. Özellikle *A. brasilense* ile beraber yapılan 49.2 μM IBA uyarımının kökün taze ve kuru ağırlığını (sırasıyla % 105 ve % 137), kök yüzey alanını (% 65) ve gövdenin taze ve kuru ağırlığını (sırasıyla % 32 ve % 62) belirgin olarak arttırdığı rapor edilmiştir. Köklenmeye ek olarak, gövdelerin çoğaltımı için MS besi ortamına farklı derişimlerde (0.0; 2.2; 4.4; 8.0; 44.4 μM) BA büyüme düzenleyicisi eklenmiş ve en yüksek çoğaltım oranı (4.3) 4.4 μM BA içeren besi ortamında elde edilmiştir. Ramirez-Malagon ve arkadaşları (1997) alev ağacı bitkisi gövdelerinin uyarılmasında 44.4 μM BA kullanımının en iyi sonucu verdiğini rapor etmesine karşın, Kane ve arkadaşları (1987) 8.0 μM , Leifert ve arkadaşları (1992) ise 2.2 μM derişimin kullanılmasını tavsiye etmişlerdir.

Ayrıca alev ağacının mikroçoğaltımının iyileştirilmesinde sıvı kültürlerin ve geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinin kullanımı konusunda yapılan bir çalışmada gövde uçlarının günde 1 kez 16 dakika boyunca (24s / 16') sıvı besi ortamı ile temas etmesi sonucunda yüksek proliferasyon oranı (% 80) sağlanmıştır [Akbulak, 2011]. Alev ağacı bitkisinin mikroçoğaltımı konusunda yapılan çalışmalar Tablo 3.1'de gösterilmiştir [Akbulak, 2011].

Tablo 3.1: Alev ağacı bitkisinin mikroçoğaltımı konusunda yapılan çalışmalar.

Çalışmanın amacı	Kullanılan yöntem	Kullanılan besi ortamı	Kaynak
<i>In vitro</i> çoğaltım	Mikroçoğaltım	WPM + 8 µM BA	Kane, 1987
<i>In vitro</i> çoğaltım	Mikroçoğaltım	MS + 2.2 µM BA	Leifert et al., 1992
<i>In vitro</i> çoğaltım	Sıvı kültür ve Geçici daldırma	QL + 2 mg l ⁻¹ BA	Akbulak, 2011
Köklenmenin iyileştirilmesi	Mikroçoğaltım	MS + 44.4 µM BA	Ramirez- Malagón et al., 1997
	Köklenme	MS + 442.9 µM IBA (6 gün) MS + 634.4 µM BA PG	
Köklenmenin iyileştirilmesi	Mikroçoğaltım	MS + 4.4 µM BA	Larraburu et al., 2007
	Mikroorganizma inokülasyonu	MS + 49.2 µM IBA + <i>Azospirillum brasilense</i>	

Alev ağacı, ticari açıdan önemli bir süs bitkisi olması sebebiyle türün *in vitro* çoğaltılmasının yanı sıra *in vitro* korunması da gereklidir. Bu bağlamda, hem orta süreli hem de uzun süreli saklama yöntemleri geliştirilmiştir.

4. BİTKİLERİ KORUMA STRATEJİLERİ

4.1. *In Situ* Koruma Yöntemleri

Türlerin içinde bulundukları ekosistemde korunmalarına *in situ* koruma stratejisi denmektedir. Bu stratejide türler evrimsel baskı, doğal tehditler, patojenler gibi dış etkenlere açıktırlar ve bu nedenle, dinamik bir koruma stratejisi olarak da tarif edilmektedir [Frankel et al., 1995]. Burada amaç, belirli bir ekosistemin, sınırları belirlenmiş olan alanlarda korunmasını sağlamaktır. 1994 IUCN (International Union for Conservational Nature; Uluslararası Doğayı Koruma Derneği) kategorisine göre, korunmuş alanlar; “Biyolojik çeşitliliğin korunması ve sürdürülebilir bir biçimde kullanılması için kanunlarla belirlenmiş sınırlar içinde ayrılan kara ya da deniz parçasıdır.” şeklinde tanımlanmıştır [IUCN, 1994].

Korunmuş alanlara örnek olarak; bilimsel rezervler, ulusal parklar, doğal anıtlar, korunmuş doğal rezervler, vahşi yaşam parkları, biyosfer rezervleri ve dünya mirası alanlar verilebilir.

4.2. *Ex Situ* Koruma Yöntemleri

Türlerin bağlı bulundukları ekosistemin dışında bir yerde korunmalarına ise *ex situ* koruma stratejisi denmektedir. Bu stratejide türler, dış etkenlere olabildiğince kapalıdırlar. Dolayısıyla statik bir koruma yöntemi olarak tarif edilmektedir [Frankel et al., 1995]. *Ex situ* koruma stratejisi son zamanlarda *in situ* yöntemlere ek olarak geliştirilen bir strateji olarak önem kazanmaya başlamıştır.

Çeşitli *ex situ* korumalarına örnek olarak; germplazm bankaları ve koleksiyonlar, tohum bankaları, test tüpü gen bankaları, polen bankaları, tarla gen bankaları, DNA bankaları ve *in vitro* saklama yöntemleri verilebilir.

Teze konu olan alev ağacı bitkisi, son zamanlarda *ex situ* bir koruma stratejisi olan *in vitro* saklama teknikleri kullanılarak germplazm kaybı önlenmeye çalışılmıştır.

5. ALEV AĞACI BİTKİSİNİN *IN VITRO* KORUNMASI

Vejetatif üretimdeki türün çeliklerinin köklenmesindeki zorlukları aşmak için yararlanılan çeşitli bitki doku kültürü tekniklerinin yanı sıra uygun orta süreli (yavaş büyüme koruması ile) ve uzun süreli (kriyoprezervasyon ile) koruma prosedürlerinin uygulanması, hem iş gücü ve teknik personel maliyetini hem de bulaş ve somaklonal varyasyon oluşma riskini azaltarak *in vitro* çoğaltım tekniklerine yardımcı olacaktır. Ancak, alev ağacının *in vitro* korunması konusunda yapılan çalışmalar halen sınırlıdır [Ozden Tokatlı et al., 2008].

5.1. Orta Süreli Saklama

Germplazmanın korunmasının temel amacı, bitki stabilizasyonunu tehlikeye atmadan steril bir durumda bir türün genetik çeşitliliğini korumak ve alt kültürlerin sayısını sınırlamaktır [Shibli et al., 2000], [Moges et al., 2003]. *In vitro* yavaş büyüme korumasında, germplazm normal büyüme ve büyüme sınırlayıcı koşullarda kültüre edilmektedir. *In vitro* kültürlerin büyüme hızı; düşük sıcaklık ve / veya düşük ışık yoğunluğunda inkübasyon, kültür ortamındaki besin bileşenlerinin manipülasyonu, ozmotik ajanlar ve büyüme geciktiricilerinin kullanımını içeren çeşitli yöntemler ile sınırlandırılabilir [Tahtamouni et al., 2001], [Moges et al., 2003].

Ozmotik ajanlar hücrelerin potansiyel su miktarını azaltan materyallerdir. Kültür ortamına ozmotik maddelerin eklenmesi büyümenin azalmasında ve farklı bitki türlerinin *in vitro* büyütülen birçok dokusunun canlı olarak saklanabilme süresinin artmasında etkilidir [Shibli, 1991], [Wilson et al., 2000]. Turgora dayalı büyüme ve hücre genişlemesi hipotezine göre [Zimmermann, 1978], besi ortamına eklenen ozmotik ajanların yüksek seviyesi, kritik bir turgor basıncı oluşmasına karşı hareket edecektir. Bu stres durumu hem kallus gelişimini hem de gövde oluşumunu engelleyecektir [Brown et al., 1979].

Mannitol, sukroz, sorbitol [Shibli et al., 1992], tribütıl-2,4 diklorbenzilfosfonium klorid (Posfon D), malik hidrazid, sukkinik asit-2, 2 dimetil hidrazid (B-995), CCC (2-chloroethyl trimethylammonium chlorid) ve ansimidol

[Dodds and Roberts, 1985] *in vitro* çoğaltılan dokuların uzun süre canlı saklanabilmesi için kullanılan uygun kimyasallardır. Mannitol bazı bitkiler tarafından birincil fotosentetik ürün olarak üretilen ve metabolize edilebilen bir şeker alkolüdür [Tahtamouni and Shibli, 1999], [Moges et al., 2003]. Mannitolün kullanımı tütünde doku büyümesini desteklemez ve krizantem [Moges et al., 2003] ve acıbademin [Ballester et al., 1997] gövde gelişimini azaltır. Sorbitol ise çoğalma besisi ortamına eklendiğinde *in vitro* krizantem büyütülmesinde gövde büyümesini engelleyen bir başka şeker alkolüdür [Ballester et al., 1997].

Sukroz, çoğu doku kültürü ortamının ana bileşenidir ve hem karbon / enerji kaynağı olarak hem de ozmotik ajan olarak iş görmektedir [Shibli, 1991], [Shibli and Al-Juboory, 2000]. Sukroz, *in vitro* bitki büyümesini azaltmak için de kullanılabilir [Orlikowska, 1992], [Moges et al., 2003]. Ancak, eksplantların büyümesi sukroz derişimine bağlıdır [Sarkar and Naik, 1998]. Sukroz derişimi artırılarak yabancı armutta [Tahtamouni and Shibli, 1999] ve patatesten [Sarkar and Naik, 1998] mikro bitki uzaması azaltılmıştır.

Alev ağacı bitkisinde yapılan *in vitro* çoğaltım çalışmalarına ek olarak, tür, özellikle ticari bitki doku kültürü laboratuvarlarında üretildiği ve türe duyulan gereksinimlerin azaldığı zamanlarda türün çoğaltımını yavaşlatmak ve üretim maliyetini azaltmak için orta dereceli saklama yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar da [Ozden Tokatlı et al., 2008], [Akdemir et al., 2010] yapılmıştır. Ozden Tokatlı ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmada, alev ağacı bitkisinin *in vitro* çoğaltılan gövdeciklerinden alınan aksiler tomurcuklardan aseptik koşullar altında sodyum aljinat (Na-aljinat) (% 3) ve $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (100 mM) kullanılarak, sentetik tohumlar hazırlanmış ve bu tohumlar 4 °C'ta saklanmıştır. Elde edilen bulgular, 3 ay saklanan sentetik tohumların normal proliferasyon koşullarına alınmalarını takiben aktarıldıkları besisi ortamında, saklama sonrası canlılıklarını (% 100) ve rejenerasyon (% 91) potansiyellerini koruduklarını göstermiştir.

Akdemir ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan bir diğer çalışma ise alev ağacına ait sentetik tohumların 6 ay ve mikro gövdelerin ise 15 g l⁻¹ sukroz ve 15 g l⁻¹ mannitol içeren QL [Quoirin and Lepoivre, 1977] besisi ortamında 4 °C'ta 15 aya kadar saklanabildiğini göstermiştir. Bu bulgular, türün orta süreli saklanması için alev ağacının aksiler tomurcuklarını içeren sentetik tohumların ve mikro gövdelerin uygun materyal olduğunu ortaya çıkarmıştır.

5.2. Uzun Süreli Saklama (Kriyoprezervasyon)

Kriyoprezervasyon tohum, zigotik embriyo, gövde ucu, nodal tomurcuklar, hücre ve kallus kültürleri, somatik embriyolar gibi çeşitli bitki materyallerinin metabolik aktivenin durduğu çok düşük sıcaklıklarda (-196 °C'ta) sıvı azot (SA) içerisinde uzun süreli saklanmasıdır [Helliot and de Boucaud, 1997], [Engelmann, 2004]. Kriyoprezervasyon süresince, hücre bölünmesi, metabolik ve biyokimyasal süreçler askıya alınmakta [Niino et al., 1992], [Niino et al., 1995] ve teorik olarak hücreler sınırsız bir süre özelliklerini değiştirmeden korunmaktadır [Niino et al., 1995], [Paul et al., 2000]. Ayrıca, kriyoprezervasyon saklanan germplazmların fenotipik ve genotipik özelliklerinin maksimum kararlılığını sağlamaktadır [Ashmore, 1997].

Kriyoprezervasyon çalışmalarında yüksek genetik kararlılık, hayatta kalma ve büyüme oranları göstermelerinin yanı sıra virüs ve patojenden arı bir bölge olması nedeniyle çoğunlukla 1-3 mm uzunluğundaki gövde uçları gibi organize dokular yaygın olarak kullanılmaktadır. Gövde uçları, aktif olarak bölünen ve görece küçük vakuollü hücreler olarak karakterize edilmekte ve çözündürme sonrası hızlı çoğalma oranı göstermektedirler. Ayrıca, gövde ucu hücrelerinin sahip olduğu görece düşük su içeriği kriyoprezervasyon için uygun bitki kaynağı olmalarında güçlü bir nedendir [Ashmore, 1997].

Armut, elma, dut, narenciye ve otsu bitkiler de dahil olmak üzere birçok bitki türü başarılı bir şekilde SA'da muhafaza edilmiştir [Niino et al., 1992], [Mycock et al., 1995]. Herhangi bir kriyoprezervasyon protokolünün başarılı gelişimi için en önemli unsur donma için kullanılan eksplantlarda optimal fizyolojik durumun seçimi [Wu et al., 1999], [Zhao et al., 1999] ve dondurulma-çözdürülme sırasında hücre içi buz kristallerinin oluşumunun önlenmesidir. Bu, soğuğa alıştırmaya, absisik aside (ABA) maruz bırakma, yoğun şeker çözeltilerine daldırma gibi çeşitli ön muameleler ile sağlanabilmektedir [Ashmore, 1997], [Shibli et al., 1999], [Shibli, 2000].

Türlerin hatta genotiplerin çoğuna uygun olan tek bir protokol ya da yöntem olmadığı için [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], bitki germplazmalarının korunması için birçok kriyoprezervasyon teknikleri geliştirilmiştir [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997], [Engelmann et al., 1997]. İlk protokol, doku ön muamelesi ve doku dehidratasyonu için kontrollü bir hızda yavaş bir şekilde soğutma ve bunu

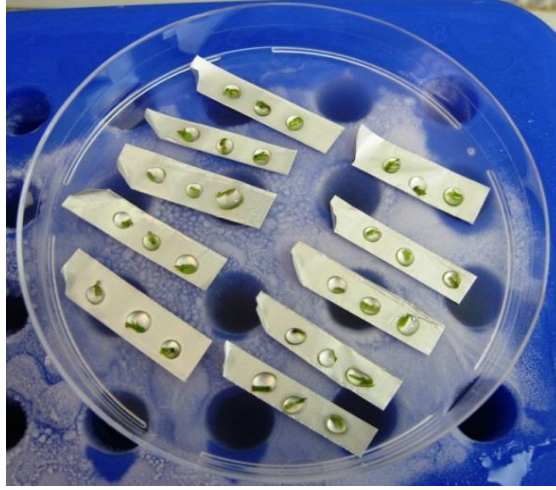
takiben SA'ya daldırmayı içeren klasik iki adımlı dondurma tekniğidir [Ashmore, 1997]. Donma oranının ve ön donma sıcaklığının ayarlanması, kalan hücre içi su miktarının değişmesine izin vermekte ve böylece suyun kristalleşmesine neden olan zararı azaltmaktadır [Villalobos and Engelmann, 1995]. Ancak, bu teknik zaman alıcı ve karmaşık olmasının yanı sıra istenilen hassas soğutma sıcaklığını sağlayan görece pahalı bir soğutucu cihaz gerekmektedir [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997]. Çoğunlukla, yavaş soğutma aşamasında hücreyi öldürebilecek buz oluşumu da gerçekleşebilmekte ve bu nedenle ilgili teknik düşük hayatta kalma oranı sağlamaktadır [Sakai et al., 1990], [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997]. Son yıllarda vitrifikasyona dayalı yeni teknikler geliştirilmiştir [Touchell et al., 1994], [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997], [Swan et al., 1999]. Bu teknikler arasında enkapsülasyon-dehidratasyon, vitrifikasyon, enkapsülasyon-vitrifikasyon ve damlacık dondurma yer almaktadır [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997]. Bu yöntemlerin hepsinde, ön aşamaları takiben doğrudan azota aktarma ile sağlanan hızlı bir dondurma kullanılmakta [Lipavska and Vreugdenhil, 1996] ve böylece, zararlı hücre içi buz oluşumu önlenmektedir [Ashmore, 1997].

Enkapsülasyon-dehidratasyon yöntemi, bitki materyallerinin kalsiyum-aljinat (Ca-aljinat) boncuklarında (sentetik tohum) enkapsüle edilmelerini içermektedir. Enkapsülasyon sonrasında ise eksplantlar en az bir gün 0.3 M ile 1.5 M arasında değişen farklı sukroz derişimlerine sahip besi ortamında ön kültüre alınmaktadırlar [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997], [Swan, 1998], [Shatnawi, 1999]. Aljinat boncuklar dondurulmadan önce ya laminar hava akımlı kabinde steril hava ile ya da silika jel üzerinde dehidrate edilerek eksplantların su içerikleri azaltılır [Ashmore, 1997]. Bitki materyallerinin Ca-aljinat ile enkapsülasyonu meristemlerin gelişmesinin kısa bir süre gecikmesini sağlayabilmekle birlikte [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], enkapsülasyon-dehidratasyon yöntemi birçok bitki türünde başarıyla uygulanmaktadır [Janeiro et al., 1996], [Shatnawi et al., 1999].

Vitrifikasyon yöntemi ise, öncelikle hayvan hücrelerinin kriyoprezervasyonu için kullanılmış [Fahy et al., 1987], daha sonra % 30 gliserol, % 15 etilen glkol, % 15 dimetilsülfoksit (DMSO) ve 0.4 M sukroz içeren bitki vitrifikasyon çözeltisi 2 (Plant vitrification solution2, PVS2)'nin geliştirilmesi [Sakai et al., 1990] ile bitki hücrelerinin kriyoprezervasyonunda da kullanılmaya başlanmıştır. PVS2; hücre, doku ya da organlarda hem hücre içi hem de hücre dışında kayda değer bir buz

oluşumu olmadan sıcaklık geçişlerinde bitkinin yavaşça soğutulmasını sağlayan kriyokoruyucu bir çözeltilidir [Moges et al., 2003]. Bu yöntemlerde dondurma işlemi son derece basit olduğundan, programlanabilir bir dondurucu gerekli değildir ve kriyoprezervasyon basit bir ekipman kullanılarak sağlanabilmektedir. Buna ek olarak, klasik yaklaşımların kullanımı ile karşılaştırıldığında daha büyük organlar daha hızlı bir şekilde kriyoprezerve edilebilmektedir [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997]. Ozden Tokatlı ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan çalışmada, juvenil *P. vera* aksiler tomurcukları 0 °C'ta 90 dk PVS2 çözeltisi ile muamelesini takiben kriyoprezerve edildikten sonra, % 11 oranında bitki gelişimi elde edilirken, daha uzun süreli PVS2 uygulamalarının aksiler tomurcuklar üzerinde toksik bir etkisinin olduğu rapor edilmiştir.

Alev ağacında kullanılan ve bitki eksplantlarının görece daha düşük miktarlarda vitrifikasyon çözeltisi ile inkübe edilmesi ile gerçekleştirilen bir kriyoprezervasyon yöntemi olan damlacık vitrifikasyon yöntemi [Panis et al., 2005] de birçok bitki türünün başarılı bir şekilde kriyoprezervasyonunu sağlamıştır [Kim et al., 2009], [Chen et al., 2011]. Bu yöntemde PVS2 çözeltisi, 0 °C sıcaklığı korumak için buz kalıpları üzerindeki plastik petripler içerisine konulan steril alüminyum folyolar üzerine her bir folyaya belli bir sayıda damlacık (genelde 3 adet) damlatılarak yapılmaktadır [Ozden Tokatli and Akdemir, 2010], (Şekil 5.1). SA'ya girmeden önce soğuğa alıştıran ve ön kültürlenmiş gövde uçları, hazırlanan PVS2 damlacıkları içerisine her damlacığa bir gövde ucu olacak şekilde yerleştirilerek, belli bir süre 0 °C sıcaklıkta inkübe edilmektedir. Bu süre bitki türüne ya da alınan eksplant çeşidine göre farklılık gösterebilmektedir.



Şekil 5.1: Damlacık vitfikasyon yönteminde kullanılan PVS2 ve gövde uçlarını içeren alüminyum folyolar.

Kriyoprezervasyon süreci soğuğa alıştırma, osmotik olarak aktif bileşiklerden oluşan besi ortamı ile ön kültürlenme, kriyokoruyucu maddelerle muamele, SA'da saklama, çözme ve çözme sonrası muameleleri içeren birçok adımdan oluşmakta [Moges et al., 2003] ve her adım kriyoprezervasyonun başarısını etkilemektedir [Razdan and Cockling, 1997].

Soğuğa alıştırma: Kriyoprezervasyon denemelerinde kullanılmak için bitkiler, önce soğuğa alıştırma aşamasında, farklı bitki türlerine göre değişmekle birlikte, 10 °C ya da daha düşük sıcaklıklarda, bir kaç hafta bekletilmektedir [Ozudogru et al., 2009]. Örneğin; krizanteme ait nodal segmentler 10 °C'ta ve 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda 3 hafta [Martin and Gonzalez-Benito, 2005], alev ağacının gövde kültürü 4 °C'ta karanlık ortamda 2-3 hafta [Ozden Tokatli et al., 2008], *in vitro* büyütülen yılan otu bitkileri 5 °C'ta 50 güne kadar 26 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda [Tanaka et al., 2004] ve at kestanesi bitkisinin embriyonik kallusu 4 °C'ta karanlık ortamda 5 gün [Lambardi et al., 2005] tutularak, soğuğa alıştırılmıştır.

Ön kültürlenme: Bitki materyalinin donma toleransı, SA'ya maruz kalmadan önce yüksek ozmotik ajanlar eklenen besi ortamında ön kültürlenme ile arttırılabilmektedir [Scottez et al., 1996]. Genellikle ön kültürlenip SA'da saklanan bitki materyalleri, ön kültürlenmeyenlere göre çözme işleminden sonra daha yüksek hayatta kalma oranı göstermektedirler [Scottez et al., 1996]. Ön kültürlenme, osmotik etkiye sahip olan ya da donma stresinden hücre zarlarını, proteinleri ve enzimatik bağlanma yerlerini koruyan sukroz, sorbitol veya mannitol gibi osmotik ajanların

eklendiği besiortamlarında biyolojik materyalin kültürlenmesini içermektedir [Villalobos and Engelmann, 1995]. Ozmotik ajanların derişimi ve onlara maruz kalma süreleri bitki türlerine ve bitkiden alınan eksplantın çeşidine bağlı olarak değişmektedir [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997]. Sukrozun kullanıldığı ön kültürleme, SA'da gövde uçlarının hem dehidratasyona hem de donma stresine direncinin artmasında önemli bir rol oynamaktadır [Swan et al., 1998], [Shibli, 2000].

Swan ve arkadaşları (1998), enkapsülasyon-dehidratasyon yöntemi ile yaptıkları kriyoprezervasyon çalışmasında SA öncesi sukroz ile ön kültürlemenin, gövde uçlarının dehidratasyona ve donma stresine karşı daha fazla dirençli olmasını sağladığını rapor etmişlerdir [Swan et al., 1998]. Bazı bitkiler tarafından birincil fotosentetik ürün olarak üretilen ve metabolize edilebilen bir şeker alkolü olan mannitol de osmotik ajan olarak kullanılabilmektedir [Swan et al., 1999], [Tahtamouni and Shibli, 1999], [Moges et al, 2003]. Bir başka şeker alkolü olan sorbitol ise gövde gelişimini engellemektedir [Gnanapragasam and Vasil, 1992], [Moges et al., 2003].

Kriyokoruyucu maddelerle muamele: Bitki materyalleri SA'da dondurulmadan önce kriyokoruma için DMSO, gliserol, etilen glikol (EG), polietilen glikol (PEG), amino asitler ve şekerler gibi çeşitli kriyokoruyucu maddelere maruz bırakılmaktadırlar [Ashmore, 1997], [Shibli et al., 2001]. Bazı istisnai durumlarda tek bir kriyokoruyucu (DMSO) etkilidir. Ancak, DMSO, gliserol ve sukroz, prolin, mannitol ya da sorbitol gibi üçüncü bir bileşikten oluşan bir kriyokoruyucu karışımı genellikle çok daha etkilidir [Withers, 1991]. Kriyokoruyucular uygun derişimlerde kullanılmalı ve hücrede toksik olmamalıdır [Withers, 1991], [Moges et al., 2003]. Kriyokoruyucular hücre içi buz kristali oluşumunu azaltmakta ve hücre içeriğinin donma noktasını düşürmektedir. Böylece hücre içeriği ve zarının ultra düşük sıcaklara dayanıklı olması sağlanmaktadır [Dumet et al., 1993].

SA'da saklama: SA'da saklama süresinin kriyoprezerve edilen bitki materyallerinin tekrar rejenere olmasına etkisi kritik değildir [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997]. Bitki materyalleri SA içerisine daldırıldıklarında, hücre içerisinde hiçbir biyokimyasal ya da biyofiziksel olay meydana gelmemektedir [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997].

Çözme ve çözme sonrası muameleler: Çözme işlemi, kristallenme veya yaklaşık 40 °C steril suda çalkalama ile oluşabilecek herhangi bir buz zararı riskini önlemek

için hızlı bir şekilde yapılmalıdır [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997]. Çözme, hem oda sıcaklığındaki laminar hava akımlı bir kabin içerisinde [Gonzalez-Arno et al., 1993], [Al-Ababneh et al., 2003] hem de su banyosunda yapılabilir [Ashmore, 1997].

Kriyoprezerve edilen *Populus alba* L.'nin gövde uçlarının en iyi hayatta kalma oranı (% 22), kriyoviyallerinin oda sıcaklığında 5 saniye tutulması ve sonrasında 40 °C'taki bir su banyosuna daldırılması sonucunda elde edilmiştir [Lambardi et al., 2000]. Çözme işleminden sonra çözünen materyali, dehidratasyon ve büzülme nedeniyle hücre zarı yüzeyinin kaybından dolayı herhangi bir deplazmolitik yaralanmayı önlemek ve kriyokoruyucuların etkisini ortadan kaldırmak için birçok kez yıkamak gerekmektedir [Shibli et al., 2006]. Kriyoprezerve edilen gelişmemiş embriyoların hayatta kalma oranı besi ortamının 100 mg l⁻¹ gibberilik asit (GA₃) eklenerek kültürlenmesi ile arttığı gözlemlenmiştir [Engelmann, 2000]. Ancak Withers (1991) besi ortamına GA₃'ün eklenmesinin, 2,4-D'nin hem varlığında hem de yokluğunda, havucun (*Daucus carota* L.) kriyoprezerve edilen meristemlerinin gelişmesini uyarmakta başarısız olduğunu rapor etmiştir.

Süs bitkileri, yüksek piyasa değerine sahip olduğu için bu bitkilerin kriyoprezervasyonu önemlidir [Keller et al., 2008]. Literatürde örneğin, karanfil [Fukai, 1989], yabani krizantem türleri ve melezleri [Fukai et al., 1994], yılanotu [Tanaka et al., 2004] ve sardunyalar [Grapin et al., 2003] dahil olmak üzere çeşitli süs bitkilerinin kriyoprezervasyonu ile ilgili raporlar bulunmaktadır. Bugüne kadar alev ağacı enkapsülasyon-dehidratasyon ve damlacık dondurma teknikleri kullanılarak kriyoprezerve edilmiştir [Hughes and Dunn, 1996], [Ozden Tokatli et al., 2008]. Adı geçen ilk teknikle dondurulan ve çözödürölen eksplantların hayatta kalma oranı (% 12.5) çok yüksek değildir. Bu nedenle, kriyoprezervasyon sonrasında hayatta kalma oranını arttırabilmek için eksplantların konsantre vitrifikasyon çözeltileri (ör., PVS2) ile muamele edildiği vitrifikasyon tabanlı protokoller değerlendirilmiş ve alev ağacı bitkisinin kriyoprezervasyonu için Ozden Tokatli ve Akdemir (2010) tarafından geliştirilen ve daha yüksek hayatta kalma oranı (% 6) sağlayan damlacık dondurma tekniği daha başarılı hayatta kalma oranı (% 21) vermiştir.

Alev ağacı bitkisinin mikroçoğaltımı için günümüze kadar yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır ve saklama sonrasında tekrar proliferiye olan bitki materyalinin genetik kararlılığının irdelendiği bir çalışma bulunmamaktadır [Kane et al., 1987], [Leifert et al., 1992], (Tablo 5.1).

Tablo 5.1: Alev ağacı bitkisinin *in vitro* korunması konusunda yapılan çalışmalar.

Çalışmanın amacı	Kullanılan yöntem	Kullanılan besi ortamı	Kaynak
Orta süreli saklama	Enkapsülasyon	MS + %3 Na-Alg MS + 100 mM CaCl ₂ . 2H ₂ O	Ozden Tokatlı et al., 2008
	Yavaş büyütme saklaması	QL + 1 mg l ⁻¹ BA	Akdemir et al., 2010
Uzun süreli saklama	Damlacık vitrifikasyonu	QL+ 4 mg l ⁻¹ BA	Ozden Tokatlı and Akdemir, 2010
	Enkapsülasyon-dehidratasyon	-	Hughes and Dunn, 1996

6. GENETİK KARARLILIK

Kriyoprezervasyon, gelecekte bitki materyallerinden yararlanmayı sağlamakta, onların canlılığını korumakta ve böylece herhangi bir genetik çeşitlilik kaybı riskini azaltmaktadır [Touchell and Dixon, 1994], [Lipavska and Vreugdenhil, 1996], [Ashmore, 1997]. Literatürde, kriyoprezervasyon sonrası rejenere olan bitki materyalinin genetik olarak kararlı olduğunu gösteren çalışmalar [Sakai et al., 1990], [Swan et al., 1999] bulunmaktadır. Shibli ve arkadaşları (1999) enkapsülasyon-dehidratasyon ile kriyoprezervasyon sonucunda, antosiyaninler ve diğer flavonoidler üreten yabanmersini (*Vactinium pahalae*) hücrelerinin, üretim kapasitesini azaltmadığını bildirmiştir. Benzer şekilde, Chen ve arkadaşları (1984) pervane çiçeğinin (*Catharanthus roseus*) alkaloid üreten hücrelerinin kriyoprezervasyonu sonrasında, alkaloid üretim kapasitesini koruduklarını ve hücrelerin alkaloid içeriklerinin değişmeden saklanabildiğini bildirmiştir. Benson ve arkadaşları (1996) kriyoprezerve edilen patates gövde uçlarının hayatta kalan bitkilerinde ploidi istikrarını gözlemiştir. Asmanın kriyoprezerve edilen hücrelerinden rejenere olan bitkilerin yaprak morfolojilerinin, bu bitkinin kontrol hücreleri ile benzer olduğu ortaya konulmuştur [Withers and Engelmann, 1998]. Ancak, tüm *in vitro* tekniklerde olduğu gibi kriyoprezervasyon uygulamaları ve bunu takiben yapılan rejenerasyon aşamaları, bitki morfolojisinde, kromozom sayısında, gen ekspresyonunda, protein profillerinde veya DNA dizilerinde somaklonal varyasyon olarak görünen değişmelere neden olabilmektedir [Harding, 2004].

Kriyoprezerve edilen bitkiciklerde oluşan morfolojik değişiklikler, Scowcroft (1984) ile Fukai ve arkadaşları (1994) tarafından rapor edilmiş olsa da bu tip değişimler tohum projenisinde pek sık görülmemektedir [Monk, 1990]. Bununla beraber, bu tip değişiklikler vegetatif olarak çoğaltılan türlerde görülebilmektedir [Sano et al. 1990].

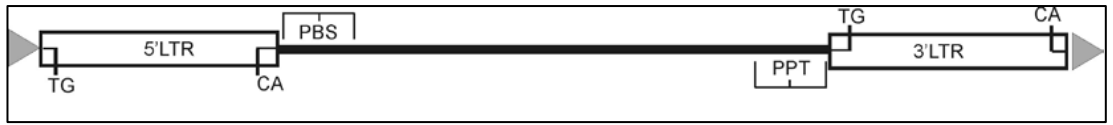
Moleküler tekniklerin gelişmesiyle birlikte, *in vitro* korunan bitkilerin genetik kararlılığının belirlenmesi ile elde edilen bulguların geçerliliği konusunda günümüzde birçok farklı görüş bulunmaktadır. Harding (2004) morfolojik, sitolojik, histolojik ve biyokimyasal analiz teknikleri kullanılarak yapılan analizleri içeren 71 makale derlemiş ve kriyoprezerve edilen materyalde düşük oranda da olsa genetik kararsızlığın olduğunu rapor etmiştir.

Kriyoprezervasyon sonrası bitkilerde oluşabilecek somaklonal varyasyonların belirlenmesi amacıyla, DNA temelli birçok farklı belirteç kullanılmaktadır. En çok kullanılan belirteçler ise RAPD (Random Amplified Polimorphism DNA, Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) [Williams et al., 1990] ve ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat, Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm) [Zietkiewicz et al., 1994] olup, bunun yanı sıra bir çok PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)-DNA tabanlı belirteç çeşitleri de geliştirilmiştir. Kriyoprezervasyon sonrası bitkilerin genetik kararlılıklarının moleküler analizler bağlamında değerlendirilmesinde genellikle RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism, Restriksiyon Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi) [Harding and Benson, 2000], SSR (Simple Sequence Repeat, Basit Tekrarlı Diziler) [Harding and Benson, 2001], RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) [Gagliardi et al., 2003] ve AFLP (Amplified Fragment Length Polymorfism, Çoğaltılmış Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi) [Turner et al., 2001] teknikleri kullanılmıştır. Bu teknikler kullanılarak, kriyoprezervasyon sonrası elde edilen bitkilerde bazı küçük değişiklikler gözlenmiştir. Her ne kadar kriyoprezervasyon sonrası elde edilen bitkilerin genel anlamda genetik kararlılıklarını korudukları rapor edilse de [Harding, 2004], alev ağacı gibi özellikle odunsu bitki türlerinin kriyogenik olarak saklanması için geliştirilen protokollerin, saklama öncesi ve sonrasında, saklanan materyalin genetik kararlılığına olan etkilerinin moleküler belirteçler ile belirlenmesi gerekmektedir.

Kriyoprezervasyon süresince genom üzerinde meydana gelebilecek olası somaklonal varyasyonun belirlenmesinde, nispeten daha yeni moleküler teknikler olan IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism, Retrotranspozonlar Arası Çoğaltılmış Polimorfizm) ve REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism, Retrotranspozon Mikrosatellit Çoğaltılmış Polimorfizm) [Kalendar and Schulman, 2006] teknikleri de kullanılabilir. IRAP ve REMAP, retrotranspozonlara dayalı belirteç teknikleridir.

6.1. Retrotranspozonlar ve Retrotranspozonlara Dayalı Belirteçler

Retrotranspozonlar genom üzerindeki gezici elementlerdir ve bitki genomunun yapısal evriminin ana bileşenidir [Finnegan, 1989], [Flavell et al., 1992], [Voytas et al., 1992], [Suoniemi et al., 1998]. Retrotranspozonlar, yapılarındaki ve transpozon döngülerindeki farklılıklara göre başlıca iki alt sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar LTR (Long Terminal Repeat; Uzun Uç Tekrarları) retrotranspozonlar ve LTR olmayan retrotranspozonlardır (Şekil 6.1 [Kalendar and Schulman, 2006]).



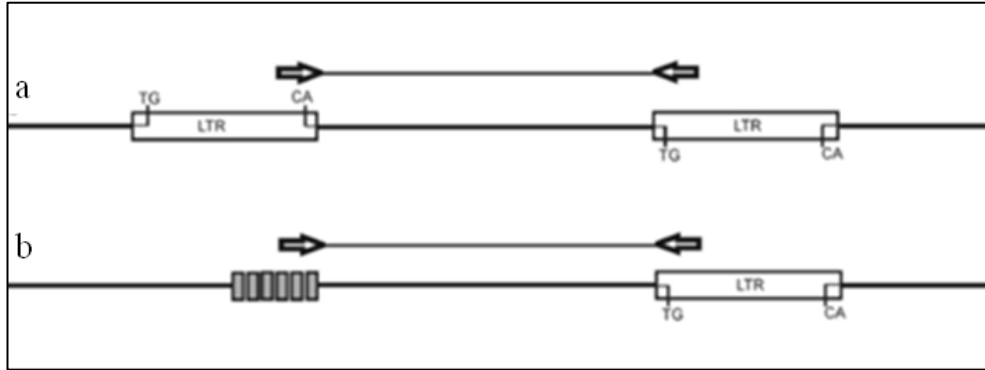
Şekil 6.1: LTR transpozonun organizasyonu. PBS ve PPT; Ters transkriptaz enzimi tarafından, replikasyon için gerekli primer bağlanma bölgeleri.

Retrotranspozonlar, transkripsiyonel promotor ve terminator bölgelerini içeren LTR'ler ile çevrilidir. Retrotranspozonlar hemen hemen tüm ökaryotik genomlarda bol miktarda bulunmakla beraber özellikle bitkilerde daha çoktur [Finnegan, 1989], [Flavell et al., 1992], [Voytas et al., 1992], [Suoniemi et al., 1998]. Bitkilerde toplam DNA'nın % 40'ı ile % 70'i arası LTR transpozonlardan oluşmaktadır [Pearce et al., 1996], [SanMiguel et al., 1996], [Shirasu et al., 2000]. Bitkilerde, LTR retrotranspozonlar LTR olmayan transpozonlardan çok daha bol ve aktiftir [Arabidopsis Genom Girişimi, 2000], [Pirinç Kromozom Dizi Konsorsiyumu, 2003], [Hill et al., 2005], [Macas et al., 2007], [Paterson et al., 2009]. LTR retrotranspozonlarının genom üzerindeki bolluğu, genel yayılımı ve aktivitesi onları moleküler belirteçlerin gelişimi için ideal birer kaynak yapmaktadır [Kalendar, 2011].

Retrotranspozonların moleküler belirteç olarak kullanıldığı tekniklerde, primerler genellikle bağlanma noktaları olarak LTR'lere yakın bölgelere göre tasarlanmaktadır. Çünkü bu bölgeler aileler içinde korunurken, aileler arasında farklılık gösteren bölgelerdir. Korunmuş bölümleri de içeren LTR'nin iç bölgeleri bu amaç için kullanılabilir. Ayrıca LTR'ler genellikle çoğaltılacak hedef büyüklüğünü en aza indirmek için seçilmektedirler [Kalendar, 2011].

IRAP belirteci, iki retrotranspozon arasındaki DNA parçasının çoğaltılmasını kapsamaktadır [Kalendar et al., 1999]. Uzun uç bölgelerinin dışına doğru bir ya da iki primer kullanılmakta ve böylece iki yakın retrotranspozon arasındaki DNA çoğaltılmaktadır. IRAP, LTR'nin hem 5' hem de 3' ucu ile eşleşebilen tek bir primer ile uygulanabilmektedir. Ayrıca LTR'den iki primer ile de yönlendirilebilmektedir (Şekil 6.2a). Bu iki primer aynı retrotranspozon element ailesinden olabileceği gibi farklı ailelerden de olabilmektedir. PZR ürünleri, genomda hedef bölgenin çok sayıda çoğaltılması ile elde edilmektedir.

REMAP, IRAP'a benzer olmakla beraber kullanılan iki primerden biri, kısa tekrarlı diziler ile eşleşmektedir [Kalendar et al., 1999]. Genom boyunca bulunan kısa tekrarlı diziler (SSR), polimeraz enziminin DNA üzerinde kaymasına bağlı olarak yüksek mutasyon oranına sahip olup retrotranspozonlar ile ilişkili görülmektedirler. Bu nedenle SSR'lar bir tür içinde bireysel lokuslarda çok fazla çeşitlilik gösterebilmektedirler. REMAP'ta, SSR primerinin basit dizi tekrarlarının içine kaymasını önlemek için, 3' ucunda bu bölgelere özgü tamamlayıcı nükleotidler kullanılmaktadır (Şekil 6.2b).



Şekil 6.2: Retrotranspozonlara dayalı moleküler belirteç teknikleri, a) IRAP yöntemi, b) REMAP yöntemi.

IRAP yönteminde çoğaltma, genom üzerinde birbirine yakın iki retrotranspozonun sağ ve sol LTR bölgeleri arasında gerçekleşmekte ve retrotranspozon primerleri kullanılmaktadır. REMAP yönteminde ise çoğaltma, bir mikrosatellit ile retrotranspozonun bir LTR bölgesi arasında, SSR bölgelerinin arasındaki bölgeleri çoğaltmak için kullanılan ISSR primerleri ve retrotranspozon primerleri kullanılarak gerçekleşmektedir.

IRAP ve REMAP yöntemleri, arpa [Manninen et al. 2000], buğday [Boyko et al., 2002], yulaf [Tanhuanpää et al., 2006, 2007, 2008] ve pirincin gen haritalarının çıkarılmasında, çimende genom evriminin çalışılmasında [Vicient et al., 2001], arpa [Leigh et al., 2003], [Brik et al., 2006], muz [Teo et al., 2005], üzüm [Pereira et al., 2005], bezelye [Pearce et al., 2000], [Smýkal et al., 2008, 2009], elma [Antonius-Klemola et al., 2006], keçi otu [Boyko et al., 2002], [Saeidi et al., 2008], [Belyayev et al., 2010], turunçgil [Bretó et al., 2001], buğday [Boyko et al., 2002; Bento et al., 2008, 2010], pirinç [Branco et al., 2007], keten [Smýkal et al., 2011], ayçiçeği [Vukich et al., 2009] ve tıbbi bitkilerde (kekik otu, şakayık çiçeği, zambak, yüksük otu) genetik çeşitliliğin ölçümü, popülasyon yapısı, kromatin modifikasyonu, epigenetik yeniden programlama, benzerlik ilişkileri, önemli türlerin belirlenmesi gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmıştır [Boronnikova and Kalendar 2010]. IRAP belirteç tekniği ayrıca arpada [Campbell et al., 2011] ve ketende [Smýkal et al., 2011] somaklonal varyasyonun belirlenmesi çalışmasında kullanılmıştır. REMAP ise buğdayda kriyoprezervasyon sonrasında genetik kararlılığın irdelendiği bir çalışmada [Solov'ava et al., 2011] kullanılmıştır. Ancak literatürde, IRAP ve REMAP belirteçlerinin kriyoprezervasyon sonrası saklanan bitkiciklerin genetik kararlılıklarının irdelenmesinde beraber değerlendirildiği bir yayın bulunmamaktadır.

7. MATERİYAL ve YÖNTEMLER

7.1. Materyal

7.1.1. Bitki Materyali

Tez çalışması kapsamında kullanılan alev ağacı (*Photinia fraseri* x Dress) bitki materyali, “Azienda Vivai Battistini” (Cesena, Italya) tarafından *in vitro* olarak sağlanmıştır. Bu bitki materyalleri, daha sonra ilgili tez çalışmasında kullanılmak üzere, GYTE, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı’na aktarılmış ve bu tez çalışması kapsamında, kriyoprezervasyon çalışmalarında kullanılmak üzere periyodik olarak 4-5 haftada bir alt kültürlenerek bitkinin devamlılığı sağlanmıştır.

7.1.2. Kullanılan Malzemeler

Alev ağacının doku kültürü aşamasında eklenen kimyasal ve/veya organik bileşenlere ait katalog numaraları Tablo 7.1’de, kriyoprezervasyon çalışmalarında kullanılan bileşenlere ait olanlar Tablo 7.2’de, genomik DNA (gDNA) izolasyonunda kullanılan bileşenlere ait olanlar Tablo 7.3’te, PZR reaksiyonlarında ve agaroz jelin hazırlanıp, görüntülenmesinde kullanılan bileşenlere ait olanlar ise Tablo 7.4’te sunulmuştur.

Tablo 7.1: Doku kültüründe kullanılan bileşenler.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog No
Etil alkol (%96)	Pro-Lab	-
Glisin	Merck	1.04201.0100
Nikotinik asit	Sigma	N-0765
Tiamin HCl	Sigma	T-3902
Piridoksin HCl	Sigma	P-8666
Myo-inositol	Sigma	I-3011
Agar	Merck	1.01614.1000
Sukroz	Merck	1.07651.1000
BA (Benzil adenin)	Sigma	B-3408
NH ₄ NO ₃ (Amonyum nitrat)	Sigma	A-3795-500
KNO ₃ (Potasyum nitrat)	Sigma	P-8291
KH ₂ PO ₄ (Potasyum fosfat)	Sigma	P-8416
CaCl ₂ .2H ₂ O (Kalsiyum klorür)	Sigma	C-2536
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O (Kalsiyum nitrat)	Sigma	C-2786
MgSO ₄ .7H ₂ O (Magnezyum sülfat)	Sigma	M-7899
H ₃ BO ₃ (Borik asit)	Sigma	B-9645
KI (Potasyum iyodür)	Riedel-de Haen	03124
MnSO ₄ .4H ₂ O (Mangan sülfat)	Sigma	M-7899
ZnSO ₄ .7H ₂ O (Çinko sülfat)	Sigma	Z-1001
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (Molibdik asit)	Sigma	M-1651
CuSO ₄ .5H ₂ O (Bakır sülfat)	Sigma	C-8027
CoCl ₂ .6H ₂ O (Kobalt klorür)	Sigma	C-2911
FeSO ₄ .7H ₂ O (Demir sülfat)	Sigma	F-8263
Na ₂ EDTA (Sodyum etilendiamintetraasetik asit)	Sigma	4503

Tablo 7.2: Kriyoprezervasyon çalışmalarında kullanılan bileşenler.

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

Tablo 7.3: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan bileşenler.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog No
CTAB (Setil Trimetil Amonyum Bromid)	Merck	1.02342.0100
Tris-HCl	AppliChem	A3452.0250
Trizma Base	Sigma	T6066
NaCl	Sigma	S3014
EDTA	Calbiochem	324503
β -Merkaptoetanol	Applichem	A,11080,0100
PVP (Polivinil pirolidon)	Sigma	P-2307
Kloroform	Sigma	372978
Oktanol	AppliChem	A3461.1000
RNaz A	Intron Biotechnology	27062
Proteinaz K	Intron Biotechnology	32181

Tablo 7.4: PZR reaksiyonlarında ve agaroz jelin hazırlanıp görüntülenmesinde kullanılan bileşenler.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog No
Taq DNA polimeraz PZR kiti	Intron Biotechnology	25022
dNTP karışım 1 ml (2.5 mM her biri)	Intron Biotechnology	25022
Agaroz	Sigma	T6066
Trizma base	Sigma	S3014
Asetik asit	Calbiochem	324503
EDTA	Applichem	A,11080,0100
Etidyum bromid	Sigma	P-2307
Jel Yükleme boyası	Sigma	372978
λ DNA-Hind III	AppliChem	A3461.1000
1 kb DNA belirteç (TrackIt™)	Intron Biotechnology	27062
100 bp DNA belirteç (TrackIt™)	Intron Biotechnology	32181

7.1.3. Kullanılan Cihazlar

Tez kapsamında kullanılan cihazların listesi Tablo 7.5’te sunulmuştur.

Tablo 7.5: Tez kapsamında 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
Havan	H 100 MM	İsolab
Sıcak su banyosu	D-77960	Julabo
Liyofilizatör	RC10.10.	Jouan
Vorteks	AC230	VNR International
Mikrodalga fırın	MW71E	Samsung
Nanodrop	BioSpec-nano	Shimadzu Biotech
Otomatik pipet	3862243	Eppendorf Research
Santrifüj	Universal 32	Hettich
Termal döngü cihazı	PTC-200	MJ Research INC
Jel elektroforezi ve güç kaynağı	MP300	Claver Scientific
Jel görüntüleme cihazı	Universal Hood II	BIO-RAD
DSC (Diferansiyel taramalı kalorimetre)	Exstar DSC- 7020	Seiko

7.2. Yöntemler

7.2.1. Besi Ortamı

Tez kapsamında kullanılan bitki materyallerinin doku kültüründe çoğaltımı ve alt kültürü sırasında kullanılan QL [Quoirin and Lepoivre, 1977] besi ortamı ve kriyoprezervasyon basamaklarında kullanılan ön kültür ve çözdürme aşamalarında kullanılan MS [Murashige and Skoog, 1962] besi ortamına ait bileşenler Tablo 7.6’da sunulmuştur.

Tablo 7.6: QL ve MS besi ortamı stok çözeltilerinin içerikleri (1L).

Makro Elementler	QL (mg l ⁻¹)	MS (mg l ⁻¹)
KNO ₃	1800	1800
NH ₄ NO ₃	400	1650
MgSO ₄ .7H ₂ O	356	370
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0	440
KH ₂ PO ₄	272	170
Ca(NO ₃). 4H ₂ O	1204	0
Demir Kelatör		
FeSO ₄ .7H ₂ O	55.6	27.8
Na ₂ EDTA	74	37.3
Mikro Elementler		
MnSO ₄ .4H ₂ O	16.9	16.9
KI	0.83	0.83
H ₃ BO ₃	6.2	6.2
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.6	8.6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025
Organik Bileşikler		
Nikotinik asit	0.5	0.5
Pridoksin-HCl	0.5	0.5
Tiamin-HCl	0.1	0.1
Glisin	2	2
Myo-inositol	100	100

Alev ağacı, kriyoprezervasyon denemelerinde kullanılmak için her 4-5 haftada bir, 1 mg l⁻¹ BA ile desteklenen QL çoğalma besi ortamı kullanılarak, laminar hava akımlı steril kabinde düzenli olarak alt kültürlenmiştir. 1 mg l⁻¹ BA içeren QL besi ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler Tablo 7.7.'de gösterilmiştir. Besi ortamı bileşenleri ilgili oranlarda karıştırılarak 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

Tablo 7.7: 1 mg l⁻¹ BA içeren QL besi ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler (1 L).

Bileşen adı	Miktar
Sukroz	30 g
Agar	7 g
Myo-İnositol	100 mg
Makro Elementler (QL için)	56.96 ml
Mikro Elementler	10 ml
Demir Kelatör	20 ml
MS Vitamin Karışımı	1 ml
BA (1 mg l ⁻¹)	1 ml
dH ₂ O	1 L'ye tamamlanacak
pH	6.0

7.2.2. Alev Ağacının Kriyoprezervasyonu

Düzenli olarak alt kültürlenene ve çoğaltılan alev ağacı (*Photinia X fraseri* Dress.) bitkisinin gövde uçlarının, Ozden Tokatlı ve Akdemir (2010) tarafından geliştirilmiş olan protokol (damlacık vitrifikasyon tekniği) kullanılarak kriyoprezervasyonu gerçekleştirilmiştir.

Damlacık-vitrifikasyon tek aşamalı dondurma tekniğinde, *in vitro* koşullarda çoğaltılan mikro gövdeler vitrifikasyon çözeltisi ile muamele edilmeden önce ilk olarak 4 veya 6 hafta 4 °C'ta karanlık koşullarda soğuğa alıştırılmıştır. Bu gövdelerden daha sonra aseptik koşullar altında gövde uçları alınmış ve bu gövde uçlarının 0.5 M sukroz içeren MS besi ortamında 3 gün süre ile ön kültürü

yapılmıştır. 0.5 M sukroz içeren MS besi ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler Tablo 7.8.'de gösterilmiştir.

Tablo 7.8: 0.5 M sukroz içeren MS besi ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler (1 L).

Bileşen adı	Miktar
Sukroz	171.145 g
Gelrite	3 g
Myo-İnositol	100 mg
Makro Elementler (MS için)	62.4 ml
Mikro Elementler	10 ml
Demir Kelatör	10 ml
MS Vitamin Karışımı	10 ml
dH ₂ O	1 L'ye tamamlanacak
pH	5.8

Bu aşamayı takiben, taze hazırlanan PVS2 [Sakai et al., 1990]; 0 °C sıcaklığı korumak için buz kalıpları üzerindeki plastik petripler içerisinde aseton ile muamele edilmeyi takiben, şerit şeklinde kesilen ve otoklavlanan alüminyum folyo (~ 0.7 cm X 2.5 cm) üzerine her bir folyoya 3 damlacık (6 µl / damlacık) olacak şekilde damlatılmıştır. Her PVS2 damlacığı içerisine sadece bir gövde ucu yerleştirilerek, eksplantlar 0 °C'ta 120 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodu sonrasında gövde uçlarının bir bölümü SA'ya aktarılmayarak doğrudan 1.2 M sukroz içeren MS besi ortamına (çözme çözeltisi) aktarılarak, 25 °C'ta 30 dakika inkübe edildikten sonra çoğalma besi ortamına aktarılmıştır (kontrol grubu).

PVS2 hazırlanmasında kullanılan bileşenler Tablo 7.9'da, 1.2 M sukroz içeren MS besi ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler ise Tablo 7.10.'da gösterilmiştir. Vitrifiye edilen ama SA'ya daldırılmayan bu grup, ilgili çalışmanın kontrolü olarak kullanılmıştır. Vitrifikasyon periyodu sonrasında gövde uçlarının diğer bölümü ise kriyoviallere aktarıldıktan sonra üzerlerine SA eklenerek hızla kriyoviyallerin kapağı kapatılmış ve daha sonra kriyoviyaller hızlıca SA'ya daldırılarak en az 1 saat süre burada bekletilmiştir (SA grubu).

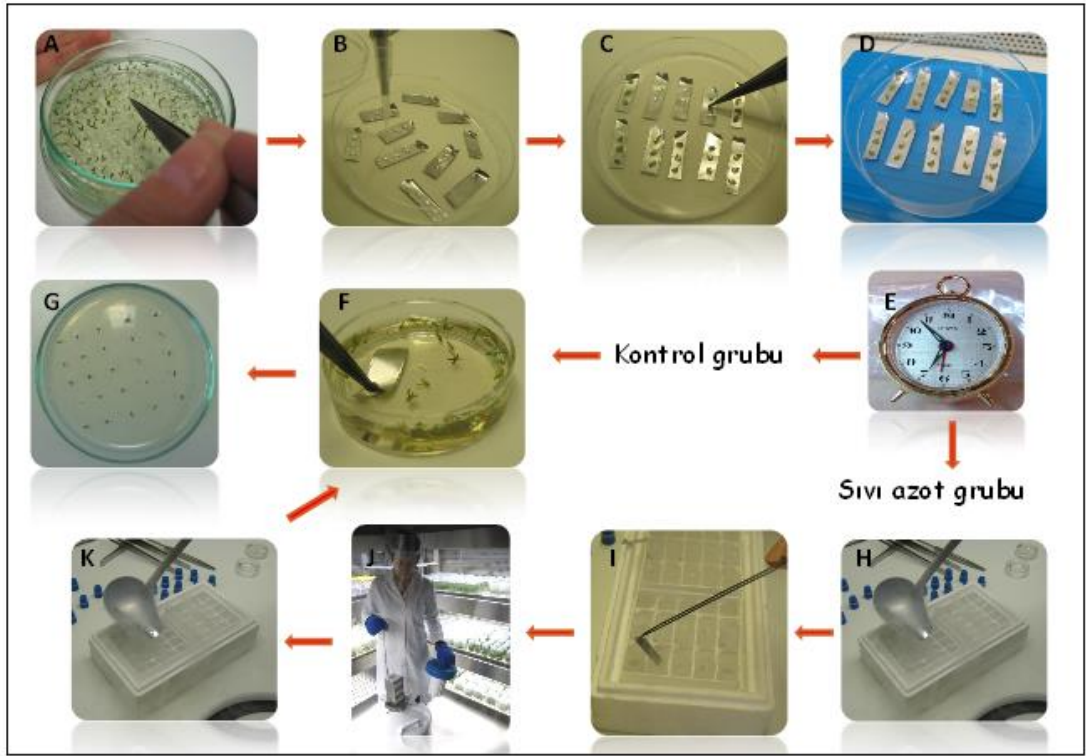
Tablo 7.9: PVS2 hazırlanmasında kullanılan bileşenler (200 mL).

Bileşen adı	Miktar
Gliserol	54 mL
Etilen glikol	32 mL
DMSO	32 mL
MS (0.4 M sukroz içeren)	200 mL'ye tamamlanacak
pH	5.8

Tablo 7.10: 1.2 M sukroz içeren MS besi ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler (1 L).

Bileşen adı	Miktar
Sukroz	410.748 g
Gelrite	-
Myo-İnositol	100 mg
Makro Elementler (MS için)	62.4 ml
Mikro Elementler	10 ml
Demir Kelatör	10 ml
MS Vitamin Karışımı	10 ml
dH ₂ O	1 L'ye tamamlanacak
pH	5.8

En az 1 saat SA'da bekletilen kriyoviyaller çıkartılarak kapağı açılmış ve PVS2 damlacıkları içinde folyolar üzerinde bulunan gövde uçları folyolar ile birlikte çıkarılıp hızlıca 1.2 M sukroz içeren çözme çözeltisine aktarılmıştır. 30 dk bu çözeltide inkübasyonun ardından gövde uçları 1 mg l⁻¹ BA içeren QL çoğalma besi ortamına aktarılmıştır (proliferasyon besi ortamı). 4 haftalık kültür periyodu sonrasında hem kontrol grubu hem de SA grubuna ait gövde uçlarından bitkicik gelişimi gözlenmiştir (Şekil 7.1, [Akdemir, 2013]).



Şekil 7.1: Damlacık vitrifikasyon / tek aşamalı dondurma yöntemi ile 4 veya 6 hafta 4 °C'ta soğuğa alıştırılan alev ağacına ait gövdelerden elde edilen gövde uçlarının kriyoprezervasyon basamakları, a) 0.5 M sukroz içeren MS besiortamında karanlıkta 3 gün inkübe edilen gövde uçları, b) PVS2 çözeltisinin steril folyolar üzerine damlatılması, c) Her bir PVS2 damlasının üzerine 1 gövde ucunun aktarılması, d ve e) 0°C'ta folyoların farklı zaman aralıklarında inkübasyonu, f) Inkübasyonun ardından SA'ya aktarılmayan kontrol grubuna ait gövde uçlarının 1.2 M sukroz içeren MS besiortamında çözülmesi, g) 30 dakika inkübasyonun ardından kontrol grubuna ait gövde uçlarının 1 mg l⁻¹ BA içeren QL besiortamına aktarılması, h) PVS2 ile farklı zaman aralıklarında inkübasyonun ardından, folyoların yerleştirileceği kriyoviallerin SA ile doldurulması, ı) SA dolu kriyoviallere üzerinde PVS2 damlacıkları içinde gövde uçları bulunan folyoların aktarılması (SA grubu), j) Kriyoviallerin büyük kriyokutucuklara aktarılıp, doğrudan SA tankına aktarılması, k) En az 1 saat süreyle SA tankında tutulan kriyoviallerin laminar akımlı kabinde kapaklarının açılarak, tekrar SA ile doldurulması ve sırasıyla 1.2 M sukroz içeren MS besiortamında 30 dk çözülmesi (f) ve çözünen gövde uçlarının proliferasyon besiortamına aktarımı, (g).

7.2.3. Termal Analizler (DSC, Diferansiyel Tarama Kalorimetre)

Alev ağacının gövde uçlarının kriyoprezervasyon sırasındaki termal analizi Seiko DSC 7020 Exstar cihazında gerçekleştirilmiştir. Kriyoprezervasyon aşamalarına başlamadan önce, bitki büyütme odasındaki alt kültürlenmiş alev ağacı mikro gövdeleri, 4 veya 6 hafta soğuğa alıştırıldıktan sonra gövdelerinden çıkartılan gövde uçlarından, 0.5 M sukroz içeren MS besi ortamında 3 gün ön kültüre alınan gövde uçlarından ve 120 dk PVS2 çözeltisinde inkübe edildikten sonra alınan gövde uçlarından 10 mg alınarak, bu süreçlerde hücre içi su miktarının değişimini gözlemek için, DSC analizleri yapılmıştır. Gövde uçları, yassı alüminyum DSC kaplarına yerleştirildikten sonra, kaplar Perkin Elmer sıkıştırma pensesi ile kapatılmıştır. Kontrol olarak boş alüminyum DSC kabı kullanılmıştır. Örneklerin DSC profilleri, dakikada 10 °C soğutulurak / ısıtılarak (± 10 °C min⁻¹) çıkartılmıştır. DSC sisteminde tüm tarama işlemi 25 °C ile -160 °C arasında gerçekleştirilmiştir. Örnekler önce 25° C'tan -160 °C'a soğutulmuş ve bu sıcaklıkta 2 dk inkübe edildikten sonra, dakikada 10 °C artacak şekilde 25 °C'a tekrar ısıtılmıştır.

7.2.4. Kriyoprezervasyon Verilerinin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizleri

Kriyoprezervasyon denemelerinin tüm basamaklarından sonra her kontrol grubu için proliferasyon besi ortamına ortalama 30 gövde ucu aktarılmış ve kültürün 4. haftasında bunların canlılık ve proliferasyon oranlarına bakılmıştır. Kültürlerin canlılık ve proliferasyon sonuçları alınırken aşağıdaki adımlar dikkate alınmıştır.

- Herhangi bir tomurcuk veya gövde oluşturmayan ancak canlılıklarını koruyan eksplantların yüzdesi (canlılık yüzdesi)
- Yeni gövde veya tomurcuk oluşturan eksplantların yüzdesi (proliferasyon yüzdesi)
- Her bir eksplant üzerinde oluşan yeni gövde sayısı (gövde / eksplant oranı)
- Her bir eksplant üzerinde oluşan gövdelerin uzunluğu (gövde uzunluğu)
- Eksplantların gövde oluşturma kapasitesi (her bir eksplant üzerinde oluşan ortalama gövde sayısı, GOK indeksi = (gövde / eksplant oranı) × proliferasyon yüzdesi / 100, [Lambardi et al., 1993])

Canlılık ve proliferasyon yüzdelерinin hesaplanması χ^2 testi (karşılaştırmalar iki değеr arasında ise) veya Post hoc çoklu karşılaştırmaya testi (3 veya daha fazla veri karşılaştırılırsa) kullanılmıştır. Gövde veya tomurcuk sayısı ile gövde boyu sonuçları LSD benzerlik testi ile karşılaştırılmıştır ($P \leq 0,05$).

7.2.5. Moleküler Analizler

Damlacık vitrifikasyon tek aşamalı dondurma yöntemi ile kriyoprezerve edilen alev ağacının gövde uçlarından gelişen bitkiciklerin genetik kararlılıkları IRAP ve REMAP moleküler belirteçleri kullanılarak değеrlendirilmiştir. Bu amaçla, kriyoprezervasyon işleminin her basamağından alınan kriyoprezervasyon ve kontrol grubuna ait alev ağacı gövde uçları, proliferasyon besi ortamında en az 2 kere alt kültürledikten sonra *in vitro* gelişen gövdelerden, CTAB yöntemi (bkz. 7.2.5.1), [Lodhi et al., 1994] ile genomik DNA (gDNA) izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu yapılan bitkiciklere ait bilgiler aşağıda sunulmuştur.

- Ana bitki: Kriyoprezervasyon çalışmalarının kaynağı olarak kullanılan ve *in vitro* koşullarda çoğaltılan alev ağacı mikro gövdelerinden elde edilen başlangıç bitkisi (1. Kontrol grubu).
- CH1, CH2 ve CH3: 4 veya 6 hafta, 4 °C'ta karanlıkta soğuşa alıştırılan bitkicikler (2. kontrol grubu).
- PC1, PC2 ve PC3: Soğuşa alıştırılan gövdelerden aseptik koşullar altında çıkartılan gövde uçlarının 3 gün karanlıkta, 0.5 M sukroz içeren MS besi ortamında ön kültüre alınması ile elde edilen bitkicikler (3.kontrol grubu).
- PV1, PV2 ve PV3: Soğuşa alıştırma ve yüksek oranda sukroz içeren besi ortamındaki ön kültür aşamasından sonra, 120 dk PVS2 çözeltisinde inkübe edilen ancak SA ile muamele edilmeyen kontrol grubu örnekleri (4. Kontrol grubu).
- SA1, SA2 ve SA3: 120 dk PVS2 çözeltisinde inkübasyonun ardından kriyoprezerve edilen SA örnekleri (SA grubu).

7.2.5.1. CTAB Yöntemi ile Genomik DNA İzolasyonu

gDNA izolasyonu için kullanılan yöntem [Lodhi et al., 1994] aşağıda maddeler halinde sunulmuştur.

- Derin dondurucuda saklanan yapraklardan 0.5 gr tartılmış ve yapraklar SA'da ezilmiştir.
- Ezilen yapraklara 5 ml CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) ekstraksiyon çözeltisi (Tablo 7.11) eklenerek karıştırılmıştır.
- Karışım, 15 ml'lik falkon tüplere konulmuş ve havana 1 ml daha çözelti eklenerek kalan homojenat tüpe eklenmiştir.
- Çözelti üzerine, 50 mg PVP eklenmiş ve tüp ters çevrilerek birkaç kez karıştırılmıştır.
- Daha sonra ilgili karışım, 60 °C'lık sıcak su banyosunda 25 dakika inkübe edilmiş ve daha sonra ardından tüpler oda sıcaklığında soğutulmuştur.
- Karışımın üstüne 6 ml kloroform / oktanol (24:1) eklenerek 20-25 defa hızla çalkalanmış ve karışım 4000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiştir.
- Üst faz (az olması durumunda) ependorf tüpe aktarılmıştır (Eğer PVP'nin varlığından dolayı sıvı faz berrak değilse ikinci kez kloroform / oktanol eklenerek aynı işlem tekrarlanmıştır).
- Elde edilen çözeltiliye 0.5 hacim 5 M NaCl eklenerek iyice karıştırılmıştır.
- Çözeltiye 1 hacim soğuk (-20 °C) % 95'lik etanol eklenmiş ve 4 °C'ta DNA iplikçikleri belirene kadar bekletilmiştir.
- Daha sonra oda sıcaklığında 13000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüjün ardından üst sıvı dökülüp pelet soğuk %76'lık etanolle yıkanmıştır.
- Tüpler 37 °C'ta, etüvde etanol tamamen uzaklaşana kadar bekletilmiştir.
- DNA steril distile suda çözülmüştür.
- Örnekler, son derişimi 0.1 mg ml⁻¹ olacak şekilde 10 mg ml⁻¹ RNaz A çözeltisi eklendikten sonra 37 °C'ta 45 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonun ardından örnekler, 1 mg ml⁻¹ Proteinaz K çözeltisi son derişimi 0.01 mg ml⁻¹ olacak şekilde eklendikten sonra 37 °C'ta 30 dakika inkübe edilmiştir.

- Karışımın üstüne eşit hacimde kloroform / oktanol eklenerek 20-25 defa hızla çalkalanmış ve karışım 4000 rpm’de 25 dakika santrifüj edilmiştir.
- Üst faz yeni bir eppendorf tüpe aktarılmış ve elde edilen çözeltiye 0.5 hacim 5 M NaCl eklenerek iyice karıştırılmıştır.
- Çözeltiye 1 hacim soğuk (-20 °C) % 95’lik etanol eklenip 4 °C’ta DNA iplikçikleri belirlenene kadar bekletilmiştir.
- Daha sonra oda sıcaklığında 13000 rpm’de 5 dk santrifüj edilip üst sıvı dökülmüş ve pellet 4 °C’ta soğutulan % 76’lık etanolle yıkanmıştır.
- Tüpler 37 °C’ta, etanol tamamen uzaklaşana kadar bekletildikten sonra DNA steril distile suda çözülmüştür.

Tablo 7.11: CTAB çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan bileşenler. (1L)

Bileşen adı	Miktar
CTAB (%2)	50 g
EDTA (20 mM)	7.2 g
Trizma-Base (0.1)	12 g
NaCl (1.4 M)	81.8 g
dH ₂ O	1 L’ye tamamlanacak
β-merkaptoetanol (% 0.2)	35μl (otoklav sonrasında)

İzolasyonu gerçekleştirilen gDNA’ların nanodrop cihazı ile 260nm ve 280nm dalga boylarında ölçümleri yapılmıştır. 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerden sonra, gDNA’nın miktar tayini ve saflık oranı aşağıda sunulan formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Saflık Oranı} = A_{260} / A_{280} \quad (7.1.)$$

$$\mu\text{g}/\mu\text{l} = 1 \text{ OD}_{260} \times 50 \text{ (çift iplikli DNA için)} \times \text{Dilisyon oranı} \quad (7.2.)$$

μg/μl: Miktar tayini.

7.2.5.2. IRAP Analizleri

IRAP analizlerinde amplifikasyon reaksiyonu, 1 × PZR tampon [10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl], 2.5 mM MgCl₂, 400 µM dNTP karışımı (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP), 10 µM primer, 50 ng DNA kalıbı ve 2U Taq DNA polimeraz (Intron Biotechnology, *I*-Taq™) içermek üzere toplam 25 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. Termal döngü cihazında (MJ Research INC PTC-200) gerçekleştirilen PZR reaksiyonu için optimize edilen programa ait tüm basamaklar aşağıda sıralanmıştır.

IRAP-PZR programı

95°C → 3 dk (ön denatürasyon)

95°C → 15 sn
55°C → 30 sn
72°C → 3 dk

} 36 Döngü

72°C → 10 dk

4°C → Son

IRAP-PZR amplifikasyon ürünleri (12 µL), 1 × TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tamponu içerisinde hazırlanan % 1'lik agaroz jele yüklenmiş, 80 V'da 92 dk yürütüldükten sonra etidyum bromid ile boyanarak, ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir.

IRAP analizlerinde kullanılacak 10 primer (Tablo 7.12), amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini görmek için, ana materyalden elde edilen gDNA ile kullanılarak amplifikasyonu denenmiştir. PZR reaksiyonu sonucunda tüm primerlerin çalıştığı gözlemlendiği için, primerler diğer klonların genetik analizlerinde de kullanılmıştır.

Tablo 7.12: IRAP analizlerinde kullanılan primerlerin baz dizileri.

Primer Adı	Baz Dizilimi (5' → 3')
LTR-1	ACCCCTTGAGCTAACTTTTGGGGTAAG
LTR-2	CTTGCTGGAAAAGTGTGTGAGAGG
LTR-3	TGTTAATCGCGCGCTCGGGTGGGAGCA
LTR-4	AGCCTGAAAGTGTTGGGTTGTCTG
LTR-5	CTGGCATTTCATTGTCGTCGATGC
LTR-6	GCATCAGCCTGGACCAGTCCTCGTCC
LTR-7	CACTCAAATTTTGGCAGCAGCGGATC
LTR-8	TCGAGGTACACCTCGACTCAGG
LTR-9	ATTCTCGTCCGCTGCGCCGCCCTACA
LTR-10	TGAGTTGCAAGGTCCAGGCATCA

7.2.5.3. REMAP Analizleri

REMAP analizleri, DNA üzerindeki kısa tekrarlı diziler (SSR) ile retrotranspozonların LTR'leri arasındaki bölgeyi çoğaltmayı amaçladığı için, her analizde biri IRAP, diğeri ise basit tekrarlı diziler arasındaki bölgeyi çoğaltmayı amaçlayan bir belirteç tekniği olan ISSR (Inter- Simple Sequence Repeats, basit ara dizi tekrarları), [Zietkiewicz et al., 1994] primeri olmak üzere iki farklı primer kullanılmıştır. REMAP analizlerinde, IRAP primerleri olarak, PZR reaksiyonlarının sonucuna göre en iyi amplifiye olmuş ve en çok bant veren LTR-3, LTR-4, LTR-5, LTR-6 ve LTR-10 primerleri (Tablo 7.12), ISSR primeri olarak ise rastgele seçilen ve amplifikasyonu denenen 7 primerden en iyi amplifiye olmuş ve en çok bant veren ISSR-2 ve ISSR-13 primeri (Tablo 7.13) seçilmiştir.

REMAP PZR programı, IRAP analizlerinde yapıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 7.13: REMAP analizlerinde seçilen ISSR primerlerin baz dizileri.

Primer Adı	Baz Dizilimi (5' → 3')
ISSR-2	GAGAGAGAGAGAGAC
ISSR-13	GAGAGAGAGAGC

Seçilen IRAP ve ISSR primerlerinin birbirleri ile kombinasyonu sağlanarak REMAP analizlerinde kullanılan 10 primer ifti Tablo 7.14'te sunulmuştur.

Tablo 7.14: REMAP için primer kombinasyonları.

Primer Adı	Primer Kombinasyonları
REMAP-1	LTR-3 ve ISSR-2
REMAP -2	LTR-3 ve ISSR-13
REMAP -3	LTR-4 ve ISSR-2
REMAP -4	LTR-4 ve ISSR-13
REMAP -5	LTR-5 ve ISSR-2
REMAP -6	LTR-5 ve ISSR-13
REMAP -7	LTR-6 ve ISSR-2
REMAP -8	LTR-6 ve ISSR-13
REMAP -9	LTR-10 ve ISSR-2
REMAP -10	LTR-10 ve ISSR-13

REMAP analizlerinde amplifikasyon reaksiyonu, 1 × PZR tampon [10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl], 2.5 mM MgCl₂, 400 µM dNTP karışımı (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP), 10 µM primer, 50 ng DNA kalıbı ve 2U Taq DNA polimeraz (Intron Biotechnology, *I*-Taq™) içermek üzere toplam 25 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. Termal d cihazında (MJ Research INC PTC-200) gerçekleştirilen PZR reaksiyonu için optimize edilen programa ait tüm basamaklar aştığıda sıralanmıştır.

REMAP-PZR programı

95°C → 3 dk (n denatürasyon)

95°C → 15 sn	} 36 D
55°C → 30 sn	
72°C → 3 dk	
72°C → 10 dk	
4°C → Son	

REMAP-PZR amplifikasyon ürünleri (12 µL), 1 × TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tamponu içerisinde hazırlanan % 1'lik agaroz jele yüklenmiş, 80 V'da 92 dk yürütüldükten sonra etidyum bromid ile boyanarak, ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir.

7.2.5.4. Agaroz Jel Elektroforezi

1.125 g agaroz üzerine 75 mL TAE tamponu eklendikten sonra (% 1.5 agaroz jel) bu karışım, agarozun erimesi için mikrodalga fırında ~ 3-4 dk ısıtılmıştır. İlgili karışımın oda sıcaklığına soğutulmasının ardından, 7.5 µL etidyum bromid eklenip karıştırılarak, jel kaseti içine dökülmüş ve jel tarağının kasete yerleştirilmesinden sonra ortalama 30 dk jelin polimerize olması beklenmiştir. Jel, polimerizasyonunun ardından elektroforez tankına (700 mL 1 × TAE ve 35 µL etidyum bromid içeren) yerleştirilmiştir. Jel sisteminde, yürütülecek örnekler 1 µL jel yükleme boyası ile karıştırıldıktan sonra jeldeki kuyulara yüklenmiştir. DNA örnekleri, 80 V'da yürütüldükten sonra UV ışık altında görüntülenmiştir.

TAE hazırlanması (50 ×):

- Öncelikle 0.5 M EDTA stok çözeltisi hazırlanmıştır: 93.05 g EDTA, 400 mL dH₂O'da çözüldükten sonra içerisine NaOH pelletleri atılarak pH 8.0'a ayarlanmış ve 500 ml'e dH₂O ile tamamlandıktan sonra kaba filtreden geçirilerek otoklavlanmıştır.
- 242 g Trizma-base bir miktar dH₂O'da çözülmüştür.
- Karışıma dikkatli bir şekilde 57.1 mL glasiyel asetik asit eklenmiştir.
- Bu karışıma son olarak yukarıda hazırlanmış olan 100 ml 0.5 M EDTA eklendi ve hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır.
- TAE daha sonra 10 × veya 1 × olmak üzere istenilen konsantrasyonda sulandırılmıştır.

7.2.5.5. IRAP ve REMAP Verilerinin Değerlendirilmesi

Her bir IRAP ve REMAP primeri ile elde edilen jel profilleri, bant varlığı durumunda 1, yokluğunda ise 0 verilerek değerlendirilmiştir. Oluşturulan bu veriler MVSP 3.1 software [Kovach, 1999] kullanılarak analiz edilmiştir. Bu yazılım programı aynı zamanda, Jaccard (1908) benzerlik indekslerini hesaplayarak genetik farklılıkların hesaplanmasında, UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetical average) analiz yöntemi [Rohlf, 1993] ise dendogram oluşturulmasında kullanılmıştır. Her bir IRAP ve REMAP belirtecindeki primere ait polimorfizm bilgi içeriği (PIC, polymorphism information content) değeri Roldán-Ruiz ve ark. (2000)'nın kullandığı aşağıdaki formüle uygun olarak hesaplanmıştır:

$$PIC_i = 2f_i (1-f_i) \quad (7.3.)$$

PIC_i : i bantının polimorfik bilgi içeriği

f_i : Bir bantın varolma sıklığı.

Hem IRAP hem de REMAP analizleri sonucunda, ana birey ile her kontrol grubunun 3 bireyinin ortalaması arasındaki benzerlik oranları SPSS for Windows programı ile Post Hoc çoklu karşılaştırılma testi (LSD, $P \leq 0.05$) kullanılarak analiz edilmiştir.

8. BULGULAR

8.1. Kriyoprezervasyon Çalışmaları

4 °C'ta, 4 hafta veya 6 hafta soğuğa alıştırma sürecini takiben damlacık vitrifikasyon yöntemi ile kriyoprezerve edilen alev ağacının, kontrol ve SA grubuna ait gövde uçlarının canlılık ve proliferasyon oranlarının istatistiksel analizleri Tablo 8.1'de, ilgili gruplara ait gövde uçlarının canlılık ve proliferasyon görüntülerinin birkaçı ise Şekil 8.1'de sunulmuştur.

Tablo ve şekillerden anlaşılacağı gibi 4 veya 6 hafta soğukta tutulan kontrol gövde uçlarında canlılık (sırasıyla % 80.6 ve % 74.9), proliferasyon (sırasıyla % 67.8 ve % 64), çoklu gövde oluşumu (sırasıyla 1.25 ve 1.26) ve buna bağlı olarak gövde oluşturma kapasitelerinde (sırasıyla 0.84 ve 0.85) istatistiksel bir fark oluşmamıştır. Ancak, soğuğa alıştırma sırasında uygulanan farklı inkübasyon süreleri, kriyoprezervasyon sonrası gövde uçlarının canlılık ve proliferasyon yüzdelerini etkilemiştir. Kriyoprezervasyon sonrası en iyi canlılık (% 24.8) ve proliferasyon (% 19.4) gövdelerin SA öncesi 6 hafta soğuğa alıştırmaları ile elde edilmiştir. Yine bu muamele, 4 haftaya göre görece daha fazla eksplant başına oluşan gövde sayısı ve bunun sonucunda gövde oluşturma kapasitesi sağlamıştır. Elde edilen bu sonuçlar, SA öncesi alev ağacı gövdelerinin en az 6 hafta 4 °C'ta tutularak, soğuğa alıştırma gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

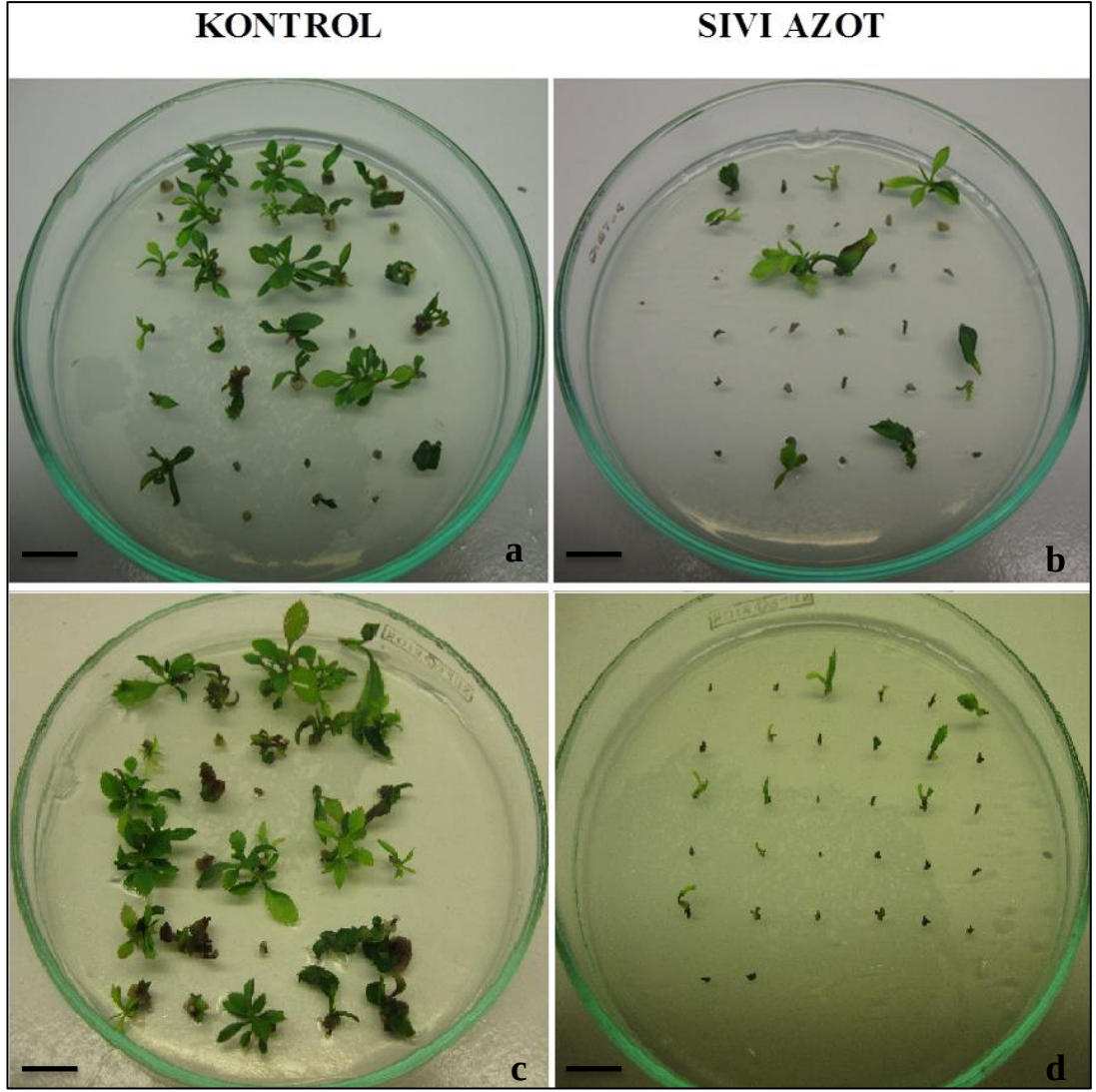
Tablo 8.1: 4 hafta 4 °C'ta veya 6 hafta 4 °C'ta soğuğa alıştırılıp kriyoprezerve edilen gövde uçlarının canlılık ve proliferasyon oranlarının istatistiksel analiz sonuçları^a.

	Canlılık (%)	Proliferasyon (%)	Gövde/Eksplant oranı	Gövde uzunluğu	GOK ^b
Kontrol 4 hafta	80.6 ± 2.7a ^c	67.8 ± 5.8a	1.25 ± 0.10a	3.51 ± 0.12b	0.84
SA 4 hafta	13.4 ± 3.2c	13.4 ± 3.2b	0.17 ± 0.03c	2.69 ± 0.23c	0.02
Kontrol 6 hafta	74.9 ± 4.2a	64.0 ± 5.5a	1.26 ± 0.10a	4.19 ± 0.13a	0.80
SA 6 hafta	24.8 ± 2.4b	19.4 ± 0.9b	0.23 ± 0.04b	2.16 ± 0.18c	0.04

^aHer deneme için farklı harfler, LSD çoklu karşılaştırılmalı teste göre anlamlı bir fark ($P \leq 0.05$) göstermektedir. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^bGOK: Gövde oluşturma kapasitesi indeksi.

^cOrtalama ± standart hata.

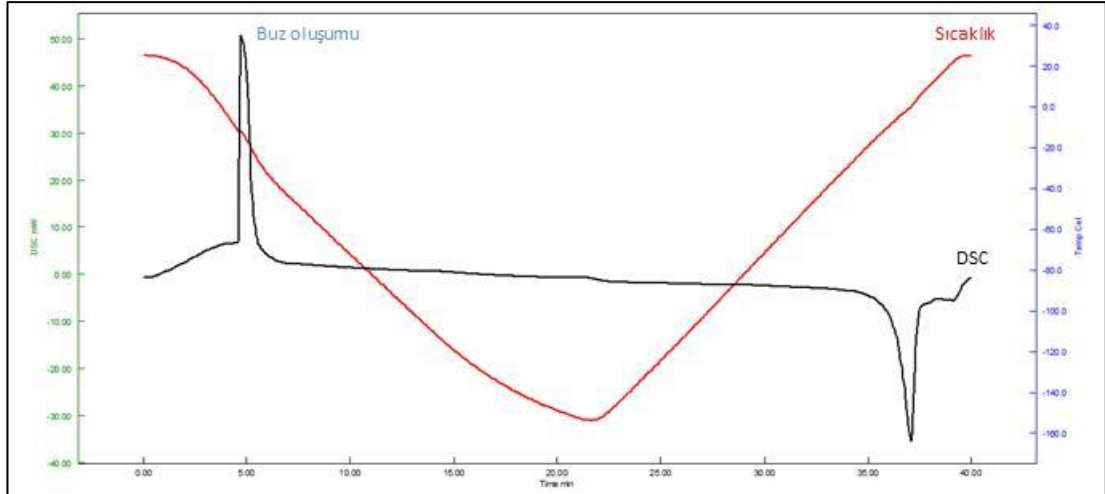


Şekil 8.1: 4 veya 6 hafta 4 °C'ta soğuğa alıştırılıp kriyoprezerve edilen gövde uçlarının canlılık ve proliferasyon görüntüleri, a) 4 hafta kontrol grubu, b) 4 hafta SA grubu, c) 6 hafta kontrol grubu, d) 6 hafta SA grubu, a ve b için siyah bar 0.74 cm, c ve d için ise 0.73 cm.

8.2. Termal Analizler

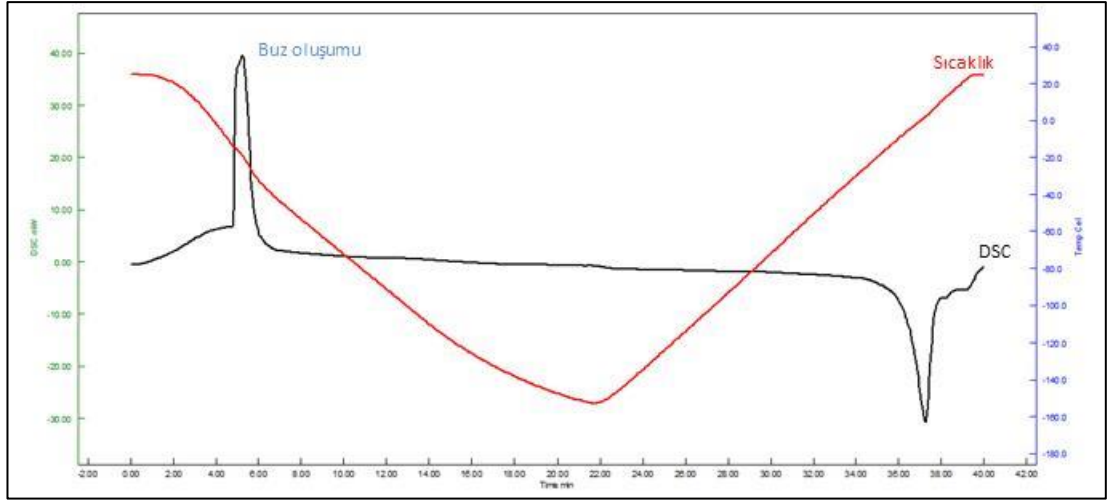
Ana bitkiden (bitki büyütme odasından) ve hem 4 hafta hem de 6 hafta soğuğa alıştırma aşamasını takiben kriyoprezervasyon sürecinin SA'ya daldırılmadan önceki farklı aşamalarından, termal analizler için alınan gövde uçlarına ait DSC grafikleri sırasıyla Şekil 8.2, Şekil 8.3, Şekil 8.4, Şekil 8.5, Şekil 8.6, Şekil 8.7 ve Şekil 8.8'de sunulmuştur.

Şekil 8.2'de standart büyüme koşullarından alınan bitkiciklerden çıkartılan gövde uçlarına (kontrol grubu) ait DSC sonucu gösterilmiştir. Kontrol grubuna ait gövde uçlarında elde edilen 50 mW'luk ekzotermik pik (buz oluşumu), bu gövde uçlarındaki yüksek miktardaki su varlığına işaret etmektedir.



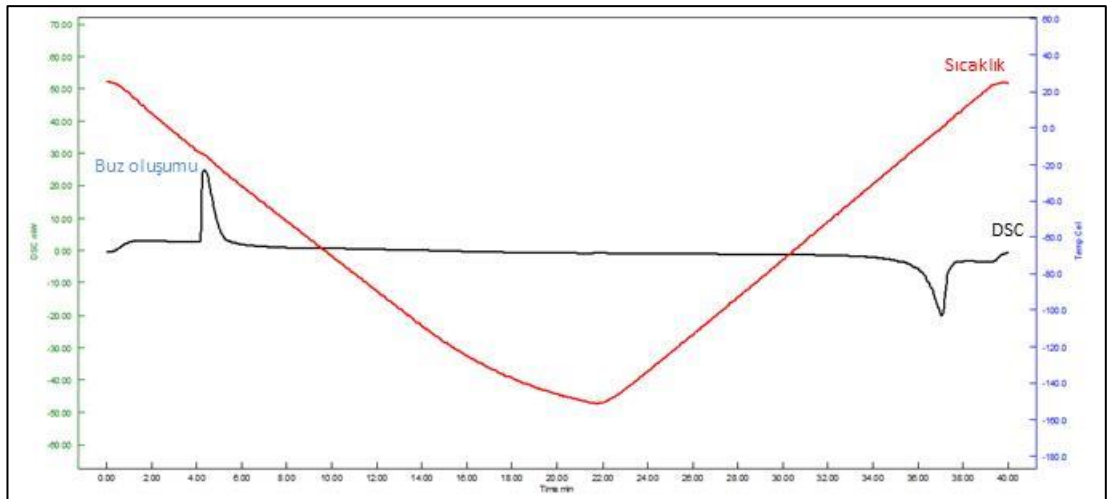
Şekil 8.2: Standart büyüme koşullarından alınan kontrol grubuna ait gövde uçlarının termal geçişlerinin DSC taraması görüntüsü.

Standart büyüme koşullarından alınarak 4 hafta 4 °C'ta soğuğa alıştırılan gövde uçlarına ait DSC sonucu Şekil 8.3'te sunulmuştur. Bu aşamada yapılan DSC taramasında hücre içi su içeriğinin azaldığı, ekzotermik pikin 40 mW'a düştüğü gözlenmiştir.



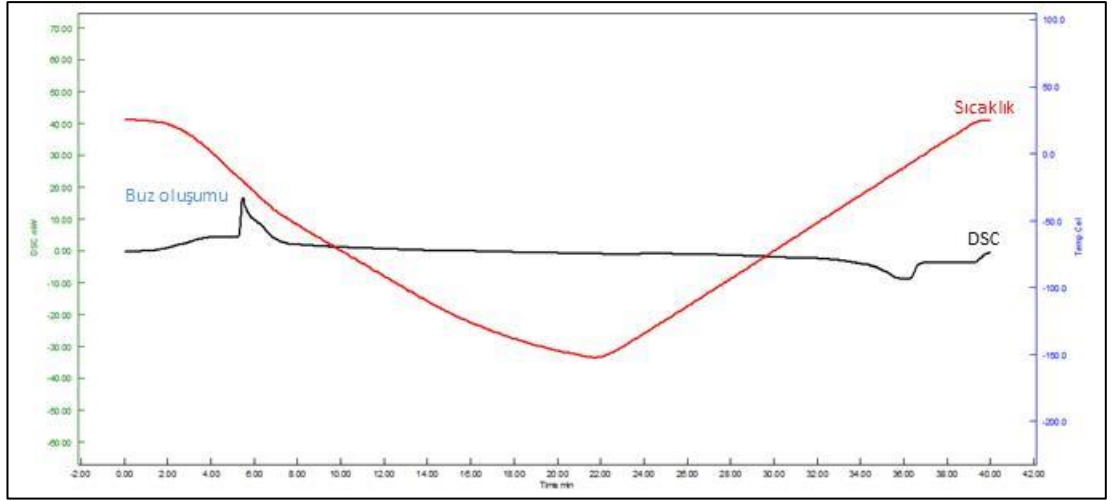
Şekil 8.3: Standart büyüme koşullarından alınarak 4 hafta 4 °C'ta soğuğa alıştırılan gövde uçlarının termal geçişlerinin DSC taraması görüntüsü.

Soğuğa alıştırma aşamasını takiben 0.5 M sukroz içeren MS besisi ortamında ön kültüre alınan gövde uçlarına ait DSC analizinde ekzotermik pikin 25 mW'a düştüğü gözlenmiştir (Şekil 8.4).



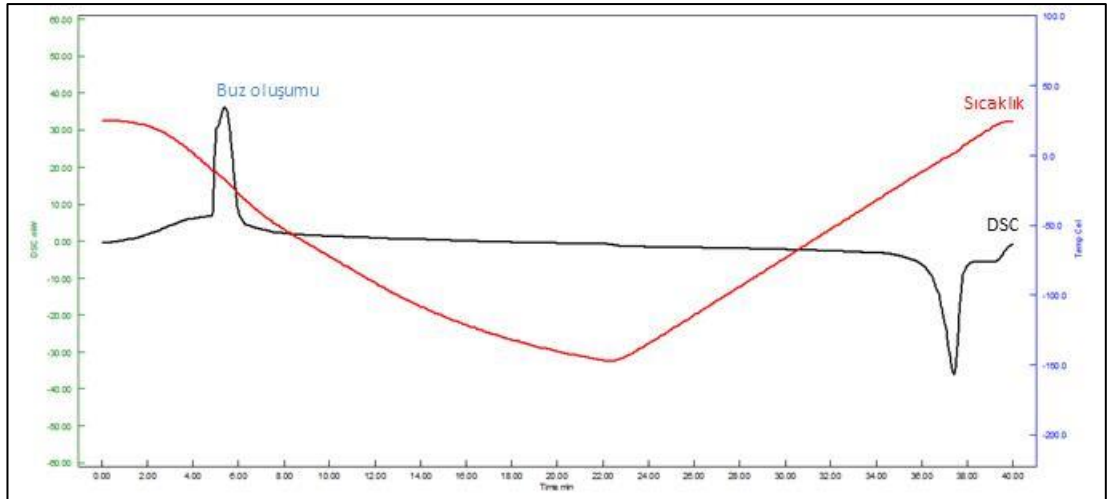
Şekil 8.4: 4 hafta 4 °C'ta soğuğa alıştırma aşamasını takiben 0.5 M sukroz içeren MS besisi ortamında ön kültüre alınan gövde uçların termal geçişlerinin DSC taraması görüntüsü.

Ön kültür aşamasından sonra SA'ya girmeden önceki son aşama olan PVS2 çözeltisinde 120 dk inkübasyonun ardından alınan gövde uçlarına ait DSC analizlerinde ise ekzotermik pikin 15 mW'a düştüğü gözlenmiştir (Şekil 8.5).



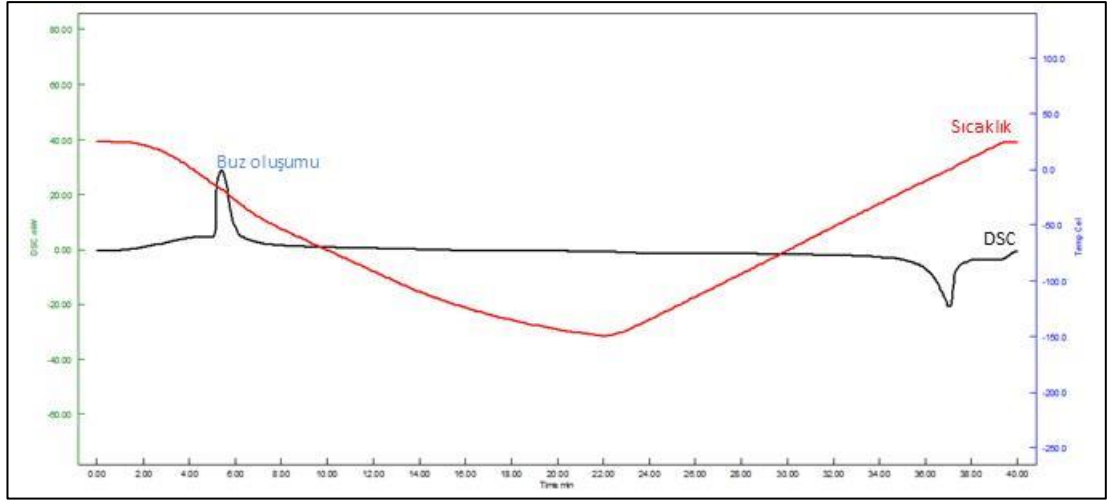
Şekil 8.5: Ön kültür aşamasının ardından 120 dk PVS2 çözeltisinde inkübe edildikten sonra alınan gövde uçlarının termal geçişlerinin DSC taraması görüntüsü.

Standart büyüme koşullarından alınarak bu sefer 6 hafta 4 °C'ta soğuğa alıştıırılan gövde uçlarına ait DSC sonucu Şekil 8.6'da sunulmuştur. Bu aşamada yapılan DSC taramasında hücre içi su içeriğinin azaldığı, ekzotermik pikin 35 mW'a düştüğü gözlenmiştir.



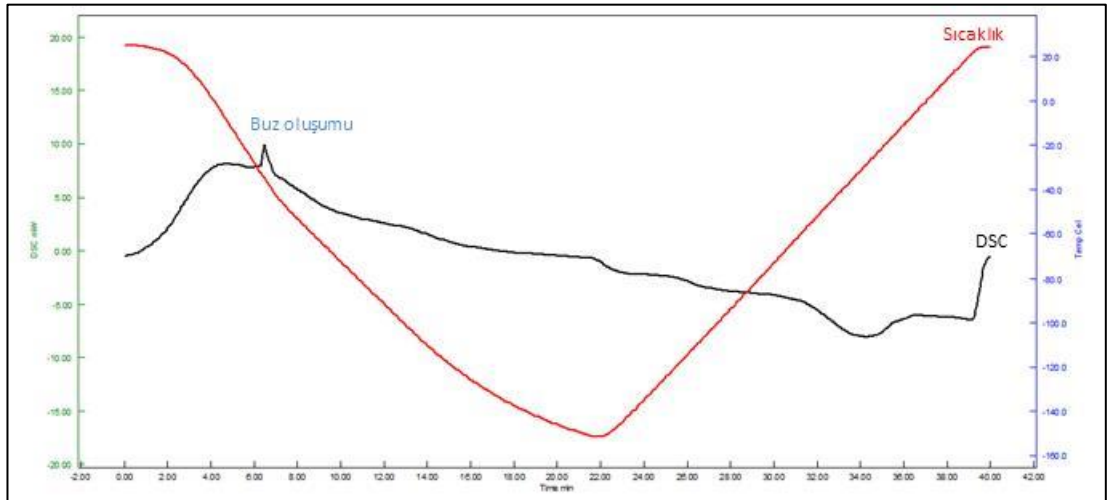
Şekil 8.6: Standart büyüme koşullarından alınarak 6 hafta 4 °C'ta soğuğa alıştıırılan gövde uçlarının termal geçişlerinin DSC taraması görüntüsü.

6 hafta 4 °C'ta soğuğa alıştıırma aşamasını takiben 0.5 M sukroz içeren MS besi ortamında ön kültüre alınan gövde uçlarına ait DSC analizinde ekzotermik pikin 30 mW'a düştüğü gözlenmiştir (Şekil 8.7).



Şekil 8.7. 6 hafta 4 °C'ta soğuğa alıştırma aşamasını takiben 0.5 M sukroz içeren MS besi ortamında ön kültüre alınan gövde uçların termal geçişlerinin DSC taraması görüntüsü.

Ön kültür aşamasından sonra SA'ya girmeden önceki son aşama olan PVS2 çözeltisinde 120 dk inkübasyonun ardından alınan gövde uçlarına ait DSC analizlerinde ise ekzotermik pikin 10mW'a düştüğü gözlenmiştir (Şekil 8.8).



Şekil 8.8. Ön kültür aşamasının ardından 120 dk PVS2 çözeltisinde inkübe edildikten sonra alınan gövde uçlarının termal geçişlerinin DSC taraması görüntüsü.

Yapılan tüm termal analizler neticesinde, SA'ya daldırma esnasında gerçekleşebilecek zararlı buz oluşumuna neden olan hücre içi su içeriğinin, 6 hafta soğuğa alıştırılıp kriyoprezervasyon protokolüne alınan bitkilerde 4 hafta soğuğa alıştırılıp ilgili protokole alınan bitkilere göre daha az olduğu gözlenmiştir.

8.3. Moleküler Analizler

Hem kriyoprezerve edilen gövde uçlarının proliferasyon oranlarında hem de termal analizler sonrasında elde edilen bulgular neticesinde, kriyoprezervasyon sürecine alınmadan önce 6 hafta 4 °C'ta soğuğa alıştırılan bitkilerde, 4 hafta 4 °C'ta soğuğa alıştırılan bitkilere kıyasla, kriyoprezervasyon sonrasında daha yüksek proliferasyon elde edilmiş ve bu nedenle alev ağacının moleküler analizleri, 6 hafta 4 °C'ta soğuğa alıştırılıp kriyoprezervasyonu gerçekleştirilen gövde uçlarının proliferasyonu sonucunda elde edilen bitkilerden gDNA izolasyonu yapılarak gerçekleştirilmiştir.

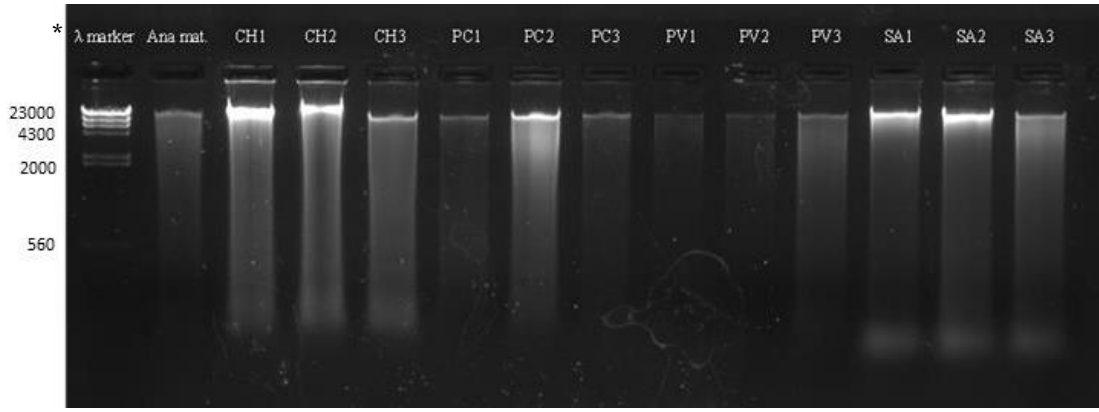
8.3.1. Genomik DNA İzolasyonu

CTAB yöntemi ile DNA izolasyonu sonrasında, alev ağacına ait ana bitkiden ve kriyoprezervasyonun farklı aşamalarında alınan gövde uçlarının proliferasyonu ile elde edilen bitkilerden izole edilen gDNA derişimleri Tablo 8.2'de, agaroz jel görüntüleri ise Şekil 8.9'da sunulmuştur.

Tablo 8.2: Alev ağacı ana bitkisine ve 6 hafta soğuğa alıştırmayı takiben kriyoprezervasyon sürecinde alınan kontrol bitkilerine ait gDNA'ların derişimleri.

Alev ağacı	DNA derişimi (ng / µl)	*A _{260 / 280}
Ana	200	2.01
CH1	442	2.08
CH2	350	2.05
CH3	175	2.04
PC1	150	2.13
PC2	250	2.13
PC3	160	2.01
PV1	125	2.05
PV2	125	2.13
PV3	150	2.16
SA1	250	2.39
SA2	300	2.31
SA3	200	2.30

*A_{260 / 280}: Saflık oranı.



* Belirteç: λ HindIII ile kesilmiş.

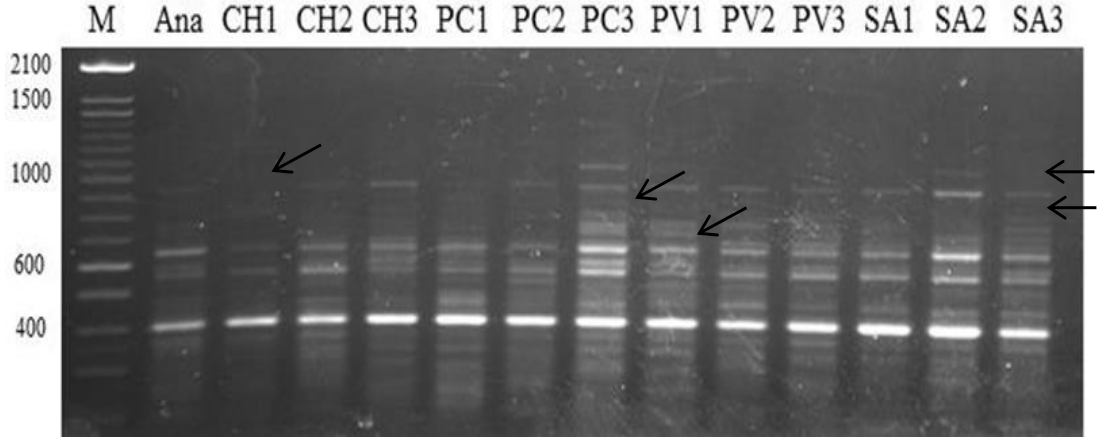
Şekil 8.9: Alev ağacı ana bitkisine ve 6 hafta soğuğa alıştırmayı takiben kriyoprezervasyon sürecinde alınan kontrol bitkilerine ait gDNA'ların jel görüntüsü.

Şekil 8.9, Şekil 8.10, Şekil 8.11, Şekil 8.12, Şekil 8.13, Şekil 8.14, Şekil 8.15, Şekil 8.16, Şekil 8.17, Şekil 8.18, Şekil 8.19, Şekil 8.20, Şekil 8.21, Şekil 8.22, Şekil 8.23, Şekil 8.24, Şekil 8.25, Şekil 8.26, Şekil 8.27, Şekil 8.28, Şekil 8.29, Şekil 8.30, Şekil 8.31 ve Tablo 8.14, Tablo 8.26'da görülen CH1, CH2 ve CH3; 6 hafta 4 °C'ta karanlıkta soğuğa alıştırılan kontrol grubu, PC1, PC2 ve PC3; soğuğa alıştırılan gövdelerden aseptik koşullar altında çıkartılan gövde uçlarının 3 gün karanlıkta 0.5 M sukroz içeren MS besiyerinde ön kültüre alınan kontrol grubu örnekleri, PV1, PV2 ve PV3; ön kültür aşamasından sonra 120 dk PVS2 çözeltisinde inkübe edilen ancak SA ile muamele edilmeyen kontrol grubu örnekleri, SA1, SA2 ve SA3; 120 dk PVS2 uygulamasının ardından kriyoprezerve edilen SA örnekleri, M ise 100bp + 1kb belirteçtir.

8.3.2. IRAP Analizleri

Alev ağacının ana bitkisine ve kriyoprezervasyonun farklı aşamalarında alınan gövde uçlarının proliferasyonu ile elde edilen bitkilere ait gDNA'ların, kriyoprezervasyon sonrası oluşabilecek somaklonal varyasyonların belirlenmesinde kalıp olarak kullanıldığı toplamda 10 IRAP primeri ile gerçekleştirilen IRAP-PZR reaksiyonları sonucunda her bir primer ile elde edilen amplifikasyon ürünlerine ait agaroz jel görüntüleri Şekil 8.10, Şekil 8.11, Şekil 8.12, Şekil 8.13, Şekil 8.14, Şekil 8.15, Şekil 8.16, Şekil 8.17, Şekil 8.18 ve Şekil 8.19'da sunulmuştur. Her bir primer ile elde edilen IRAP-PZR profillerine göre ana bitkide olmayan veya ana bitkide

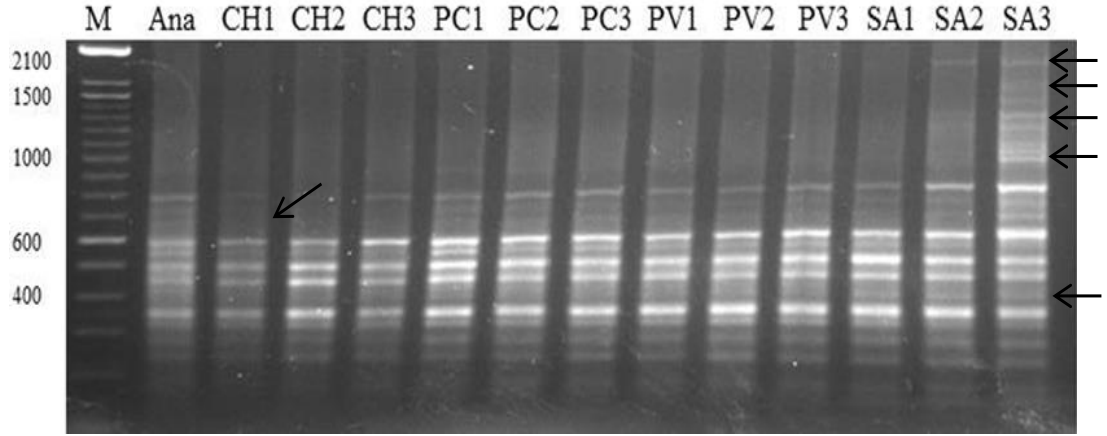
olup, diğer bitkilerde görülmeyen bantlar polimorfik bant olarak sayılıp, bant varlığı “1”, yokluğu ise “0” ile gösterilmiştir. Bu veriler ise Tablo 8.3, Tablo 8.4, Tablo 8.5, Tablo 8.6, Tablo 8.7, Tablo 8.8, Tablo 8.9, Tablo 8.10, Tablo 8.11 ve Tablo 8.12’de sunulmuştur. Oklar, bazı polimorfik bantları göstermektedir.



Şekil 8.10: LTR-1 primeri ile elde edilen IRAP profilleri (% 1.5’luk agaroz jel).

Tablo 8.3: LTR-1 primeri ile elde edilen bant sonuçları.

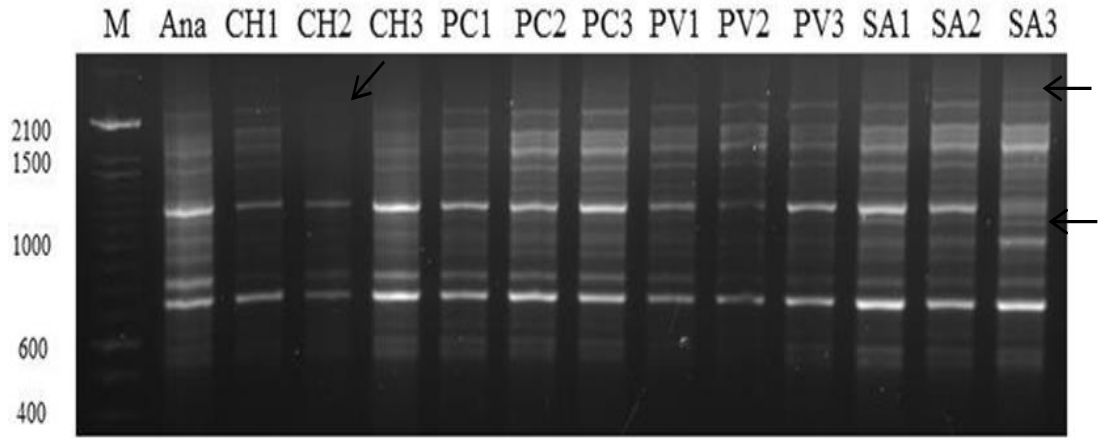
LTR-1 Primeri													
Bant (bp)	Ana	CH1	CH2	CH3	PC1	PC2	PC3	PV1	PV2	PV3	SA1	SA2	SA3
240	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
320	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
410	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
440	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
520	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
540	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
580	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
610	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
620	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
630	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
700	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1
750	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
795	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1
810	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
870	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
930	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1050	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0



Şekil 8.11: LTR-2 primeri ile elde edilen IRAP profilleri (% 1.5' luk agaroz jel).

Tablo 8.4: LTR-2 primeri ile elde edilen bant sonuçları.

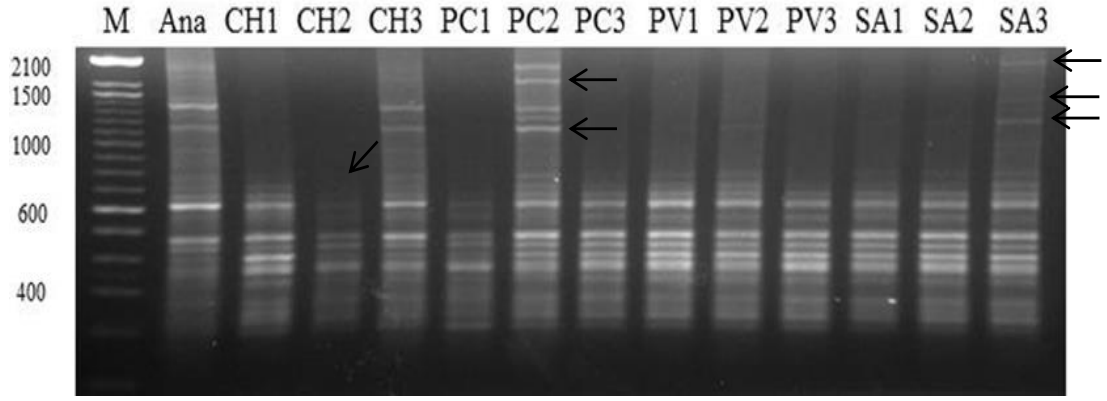
LTR-2 Primeri													
Bant (bç)	Ana	CH1	CH2	CH3	PC1	PC2	PC3	PV1	PV2	PV3	SA1	SA2	SA3
150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
190	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
220	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
350	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
420	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
440	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
650	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
750	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
910	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1050	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1



Şekil 8.12: LTR-3 primeri ile elde edilen IRAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).

Tablo 8.5: LTR-3 primeri ile elde edilen bant sonuçları.

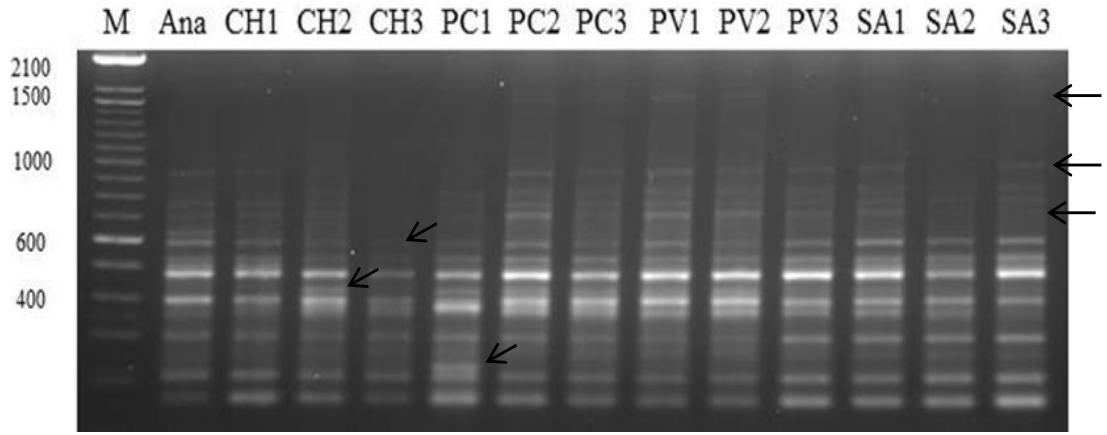
LTR-3 Primeri													
Bant (bp)	Ana	CH1	CH2	CH3	PC1	PC2	PC3	PV1	PV2	PV3	SA1	SA2	SA3
520	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
580	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
610	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
710	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
820	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
930	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
970	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1050	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1120	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1190	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1250	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
1350	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1420	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2100	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2400	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
2700	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1



Şekil 8.13: LTR-4 primeri ile elde edilen IRAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).

Tablo 8.6: LTR-4 primeri ile elde edilen bant sonuçları.

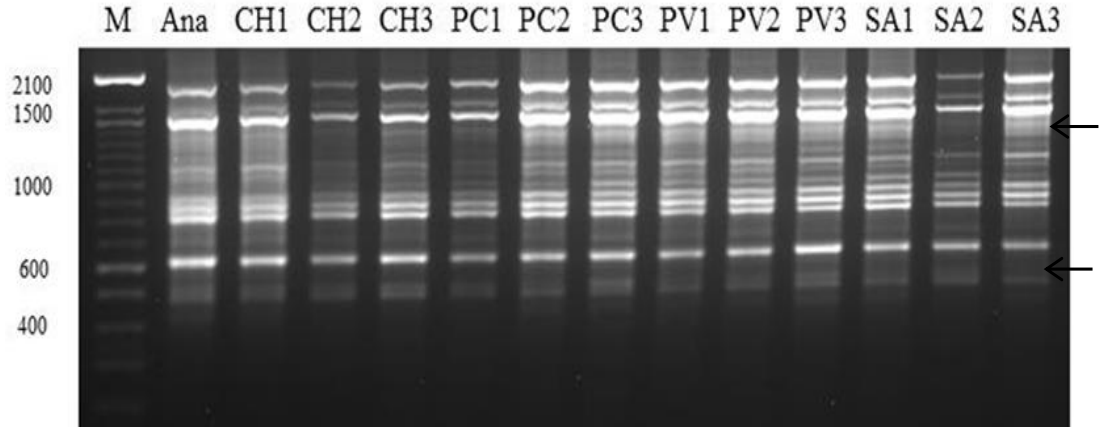
LTR-4 Primeri													
Bant (bp)	Ana	CH1	CH2	CH3	PC1	PC2	PC3	PV1	PV2	PV3	SA1	SA2	SA3
200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
270	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
320	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
360	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
430	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
460	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
550	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
560	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
620	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
640	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
700	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
770	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
850	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
890	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
1110	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1250	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
1350	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
1450	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1700	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1800	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1



Şekil 8.14: LTR-5 primeri ile elde edilen IRAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).

Tablo 8.7. LTR-5 primeri ile elde edilen bant sonuçları.

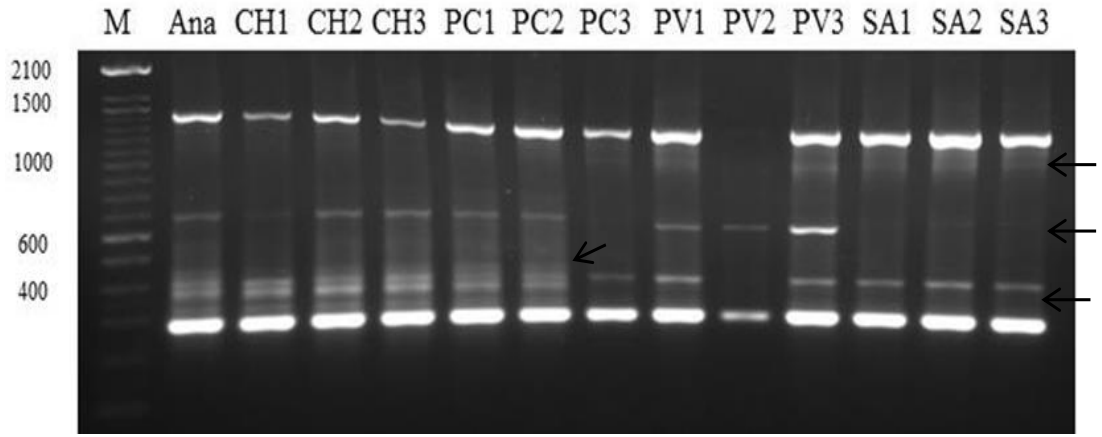
LTR-5 Primeri													
Bant (bç)	Ana	CH1	CH2	CH3	PC1	PC2	PC3	PV1	PV2	PV3	SA1	SA2	SA3
170	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
220	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
270	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
340	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
360	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
370	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
430	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
490	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
540	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
610	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
750	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
950	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1500	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0



Şekil 8.15: LTR-6 primeri ile elde edilen IRAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).

Tablo 8.8. LTR-6 primeri ile elde edilen bant sonuçları.

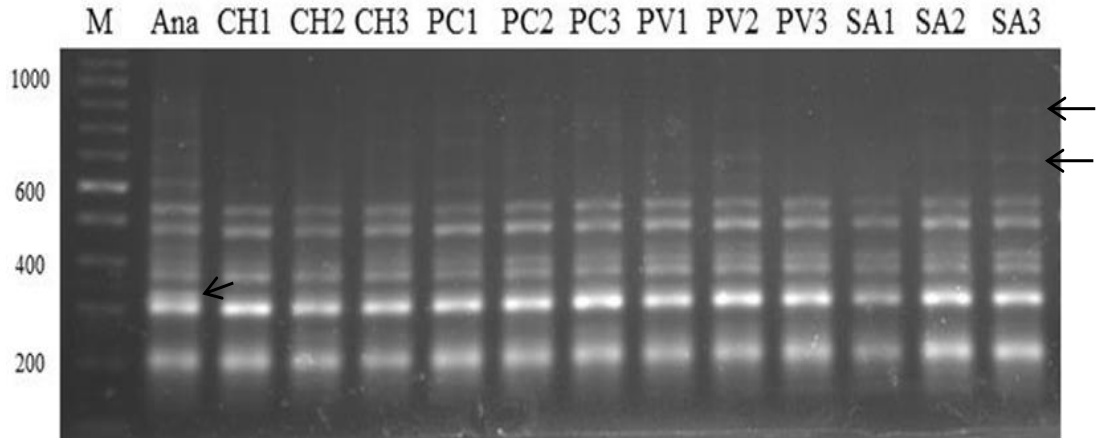
LTR-6 Primeri													
Bant (bp)	Ana	CH1	CH2	CH3	PC1	PC2	PC3	PV1	PV2	PV3	SA1	SA2	SA3
430	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
490	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
610	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
850	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1000	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1050	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1300	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1850	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
2200	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1
2900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 8.16: LTR-7 primeri ile elde edilen IRAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).

Tablo 8.9: LTR-7 primeri ile elde edilen bant sonuçları.

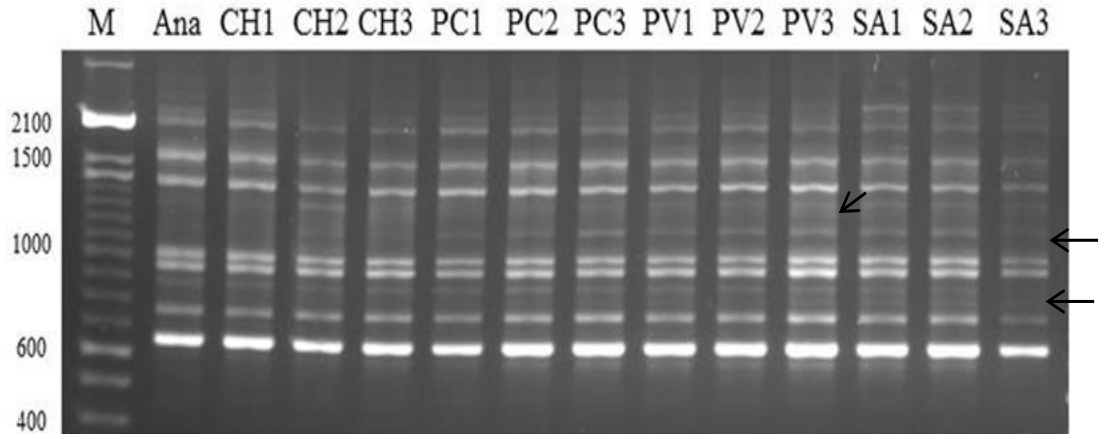
LTR-7 Primeri													
Bant (bç)	Ana	CH1	CH2	CH3	PC1	PC2	PC3	PV1	PV2	PV3	SA1	SA2	SA3
290	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
320	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
390	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
405	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
425	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
695	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 8.17: LTR-8 primeri ile elde edilen IRAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).

Tablo 8.10: LTR-8 primeri ile elde edilen bant sonuçları.

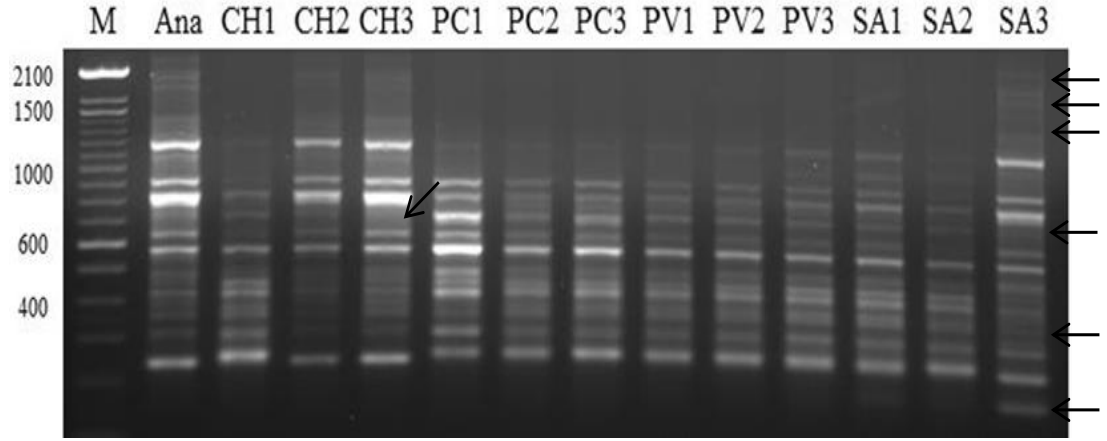
LTR-8 Primeri													
Bant (bç)	Ana	CH1	CH2	CH3	PC1	PC2	PC3	PV1	PV2	PV3	SA1	SA2	SA3
200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
320	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
370	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
450	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0
490	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
530	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
690	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
750	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
800	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1



Şekil 8.18: LTR-9 primeri ile elde edilen IRAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).

Tablo 8.11: LTR-9 primeri ile elde edilen bant sonuçları.

LTR-9 Primeri													
Bant (bp)	Ana	CH1	CH2	CH3	PC1	PC2	PC3	PV1	PV2	PV3	SA1	SA2	SA3
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1050	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
1150	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 8.19: LTR-10 primeri ile elde edilen IRAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).

Tablo 8.12. LTR-10 primeri ile elde edilen bant sonuçları.

LTR-10 Primeri													
Bant (bp)	Ana	CH1	CH2	CH3	PC1	PC2	PC3	PV1	PV2	PV3	SA1	SA2	SA3
190	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
230	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
250	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
280	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
310	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
370	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
380	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
420	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
440	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
490	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
570	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
630	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
720	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
760	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
820	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1000	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
1100	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1270	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1340	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1400	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1500	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1600	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1800	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1900	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2100	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1

İlgili IRAP primerlerinin kullanılmasıyla her bir primer için elde edilen polimorfizm oranları Tablo 8.13.'te gösterilmiştir. Tüm PZR amplifikasyonları sonucunda, 150 bç'den 2.9 kb büyüklüğüne kadar toplam 192 bant elde edilmiştir. Her bir primer için 9-29 olmak üzere ortalama 19.2 bant elde edilmiş olup, bu bantlardan 100'ü (% 52.1) ise 13 bitki (ana bitki ve 12 klon) arasında polimorfik olarak belirlenmiştir. En yüksek polimorfizm oranı (% 78.9), LTR1 primeri ile amplifikasyon sonrasında görülürken, en düşük polimorfizm (% 20.0) ise LTR9 primeri ile elde edilmiştir. Ana bitki ve klonlarının PIC değerleri karşılaştırıldığında ise en yüksek PIC değeri (0.489) LTR9 primeri ile amplifikasyon sırasında elde edilirken, en düşük PIC değeri (0.250) ise LTR3 primeri ile edilmiştir. Tüm IRAP primerlerinin ortalama PIC değeri ise 0.307 olarak hesaplanmıştır (Tablo 8.13).

Tablo 8.13: Alev ağacı klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan IRAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilir bant ve polimorfik bant sayısı ve yüzdesi.

Primer	Çoğaltılan bant aralığı (bç)	Değerlendirilen bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Polimorfizm yüzdesi	PIC* değeri
LTR 1	240-1050	19	15	78.9	0.338
LTR 2	150-1900	22	14	63.6	0.257
LTR 3	520-2700	24	11	45.8	0.250
LTR 4	200-1800	22	12	54.5	0.316
LTR 5	170-1500	20	10	50.0	0.282
LTR 6	430-2900	20	6	30.0	0.284
LTR 7	290-1400	9	3	33.3	0.489
LTR 8	200-800	12	7	58.3	0.419
LTR 9	600-2300	15	3	20.0	0.347
LTR 10	190-2100	29	19	65.5	0.293
Toplam	150-2900	192	100	-	-
Ortalama	-	19.2	-	52.1	0.307

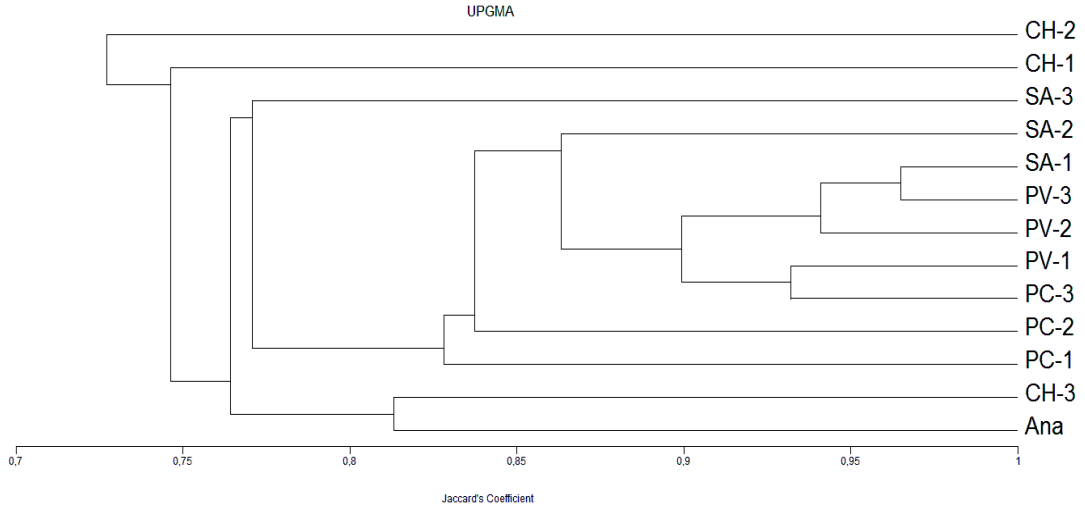
*PIC (Polymorphism information content): Polimorfizm bilgi içeriği.

Ana materyal ile klon bitkiler arasındaki benzerliklerin sunulduğu benzerlik matriksi (Tablo 8.14) ve dendograma (Şekil 8.20) göre bireyler arasındaki benzerlik katsayıları 0.649'dan 0.965'e değişmekte olup, ortalama 0.795 olarak belirlenmiştir.

Tablo 8.14: Alev ağacı ana materyali ile klonları arasında IRAP analizi ile elde edilen benzerlik matriksi.

	Ana	CH-1	CH-2	CH-3	PC-1	PC-2	PC-3	PV-1	PV-2	PV-3	SA-1	SA-2	SA-3
Ana	1.000												
CH-1	0,735	1.000											
CH-2	0,690	0,719	1.000										
CH-3	0,813	0,696	0,783	1.000									
PC-1	0,776	0,745	0,789	0,795	1.000								
PC-2	0,814	0,788	0,717	0,79	0,831	1.000							
PC-3	0,765	0,780	0,720	0,794	0,872	0,901	1.000						
PV-1	0,774	0,791	0,729	0,781	0,847	0,852	0,932	1.000					
PV-2	0,741	0,765	0,739	0,758	0,821	0,839	0,893	0,931	1.000				
PV-3	0,749	0,762	0,735	0,765	0,817	0,823	0,875	0,912	0,938	1.000			
SA-1	0,741	0,789	0,750	0,747	0,833	0,839	0,880	0,905	0,944	0,965	1.000		
SA-2	0,713	0,711	0,677	0,728	0,775	0,771	0,842	0,853	0,864	0,883	0,876	1.000	
SA-3	0,768	0,649	0,676	0,754	0,718	0,746	0,759	0,778	0,776	0,784	0,787	0,819	1.000

Ana materyale en yakın birey, PC-2 ve CH-3 bireyi iken, en uzak birey ise CH-2 birey olmuştur. Bununla birlikte, kriyoprezerve edilen bitkicikler ile ana materyal arasında benzerlik matriksinden de görüleceği üzere % 70 üzerinde benzerlik belirlenmiştir. Yapılan tüm analiz sonucu birlikte değerlendirildiğinde, ana materyal ile kontrol grubu ve kriyoprezerve edilen materyaller arasında kabul edilebilir bir polimorfizm (PIC: 0.307 yani $0.25 \leq PIC \leq 0.5$) olduğu belirlenmiştir.

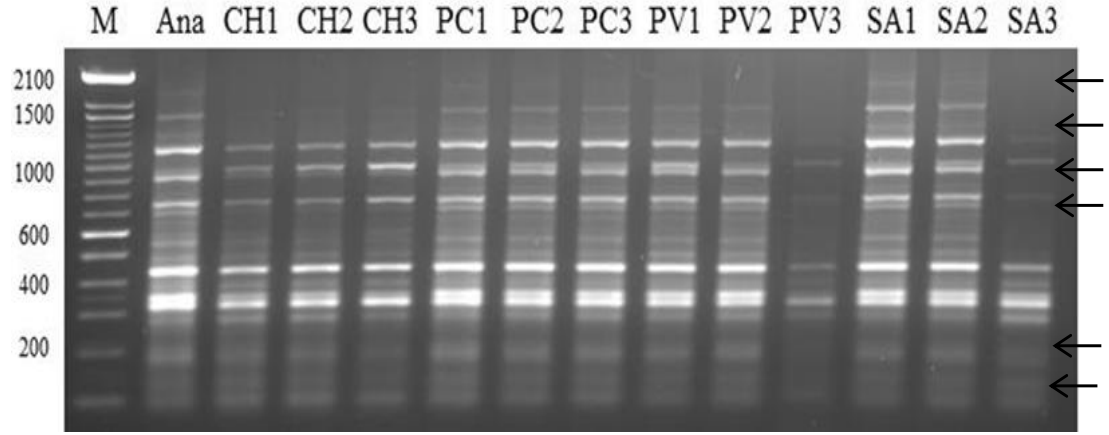


Şekil 8.20: Alev ağacı ve 12 klonundan, 10 IRAP primeri ile elde edilen 192 banttan UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogram.

8.3.3. REMAP Analizleri

Alev ağacının ana bitkisine ve kriyoprezervasyonun farklı aşamalarında alınan gövde uçlarının proliferasyonu ile elde edilen bitkilere ait gDNA'ların, kriyoprezervasyon süresince oluşabilecek somaklonal varyasyonların belirlenmesinde kalıp olarak kullanıldığı toplamda 10 REMAP primer çifti ile gerçekleştirilen REMAP-PZR reaksiyonları sonucunda her bir primer çifti ile elde edilen amplifikasyon ürünlerine ait agaroz jel görüntüleri Şekil 8.21, Şekil 8.22, Şekil 8.23, Şekil 8.24, Şekil 8.25, Şekil 8.26, Şekil 8.27, Şekil 8.28, Şekil 8.29 ve Şekil 8.30'da sunulmuştur. Her bir primer ile elde edilen REMAP-PZR profillerine göre ana bitkide olmayan veya ana bitkide olup, diğer bitkilerde görülmeyen bantlar polimorfik bant olarak sayılıp, bant varlığında "1", yokluğunda ise "0" olarak gösterilmiştir. Bu veriler ise Tablo 8.15, Tablo 8.16, Tablo 8.17, Tablo 8.18, Tablo

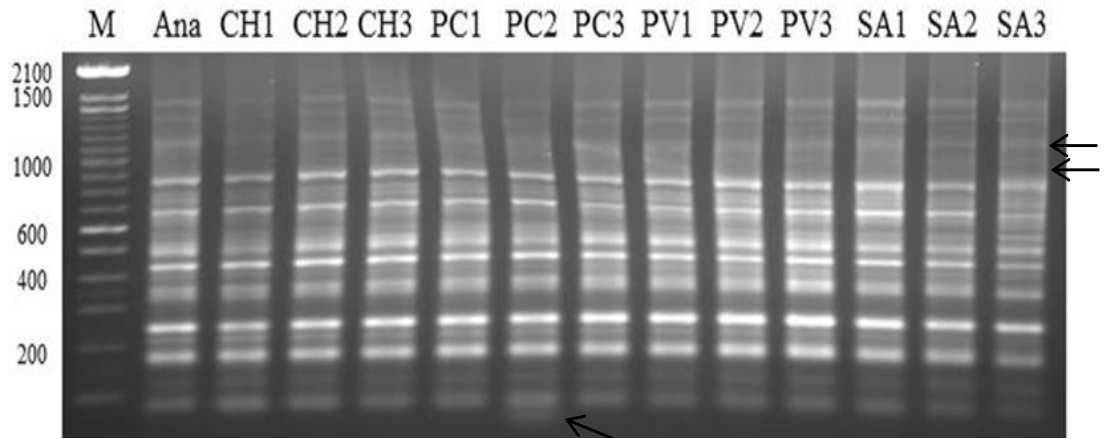
8.19, Tablo 8.20, Tablo 8.21, Tablo 8.22, Tablo 8.23 ve Tablo 8.24’te sunulmuştur. Aşağıdaki şekillerde oklar, bazı polimorfik bantları göstermektedir.



Şekil 8.21: REMAP-1 primeri ile elde edilen REMAP profilleri (% 1.5’luk agaroz jel).

Tablo 8.15: REMAP-1 primeri ile elde edilen bant sonuçları.

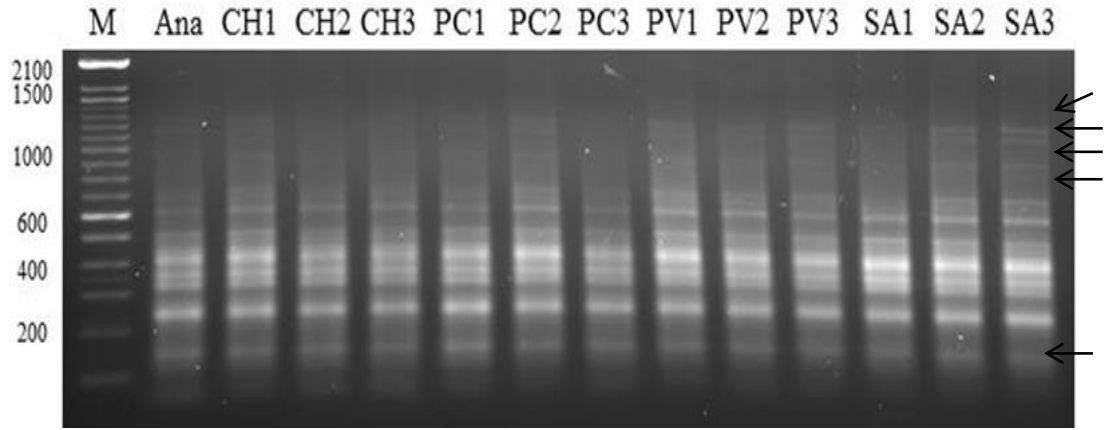
REMAP-1 Primeri													
Bant (bç)	Ana	CH1	CH2	CH3	PC1	PC2	PC3	PV1	PV2	PV3	SA1	SA2	SA3
100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
290	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
320	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
380	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
430	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
490	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
530	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
590	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
650	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
930	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1300	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1800	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0



Şekil 8.22: REMAP-2 primeri ile elde edilen REMAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).

Tablo 8.16: REMAP-2 primeri ile elde edilen bant sonuçları.

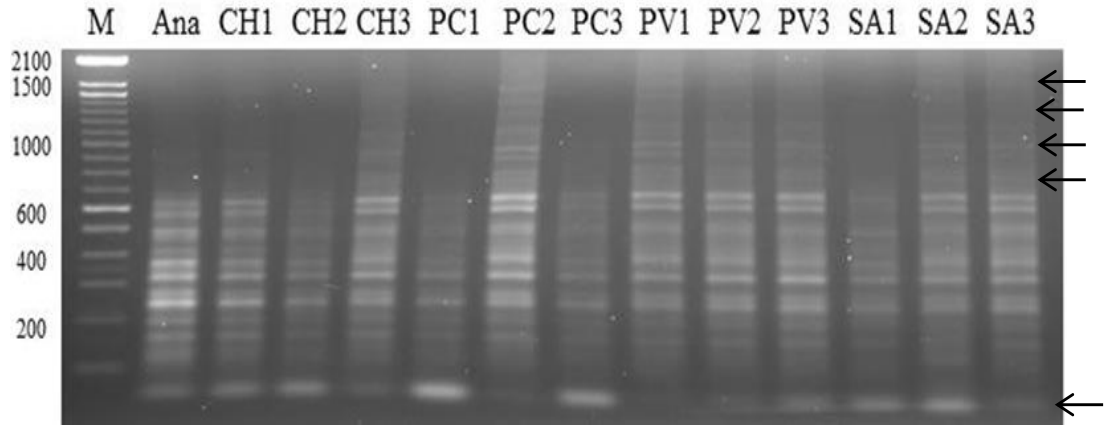
REMAP-2 Primeri													
Bant (bç)	Ana	CH1	CH2	CH3	PC1	PC2	PC3	PV1	PV2	PV3	SA1	SA2	SA3
50	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
90	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
120	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
180	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
210	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
250	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
330	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
360	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
420	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
490	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
510	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
540	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
640	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
670	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
740	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
770	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
830	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
1100	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1150	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1200	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
1350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 8.23: REMAP-3 primeri ile elde edilen REMAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).

Tablo 8.17: REMAP-3 primeri ile elde edilen bant sonuçları.

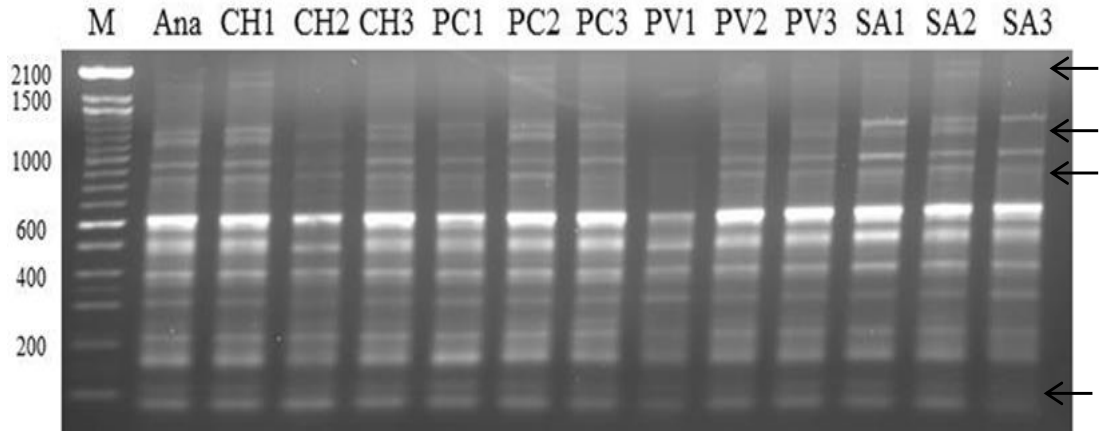
REMAP-3 Primeri													
Bant (bç)	Ana	CH1	CH2	CH3	PC1	PC2	PC3	PV1	PV2	PV3	SA1	SA2	SA3
50	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
250	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
310	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
430	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
470	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
670	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
700	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1050	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
1350	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
1450	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1



Şekil 8.24: REMAP-4 primeri ile elde edilen REMAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).

Tablo 8.18: REMAP-4 primeri ile elde edilen bant sonuçları.

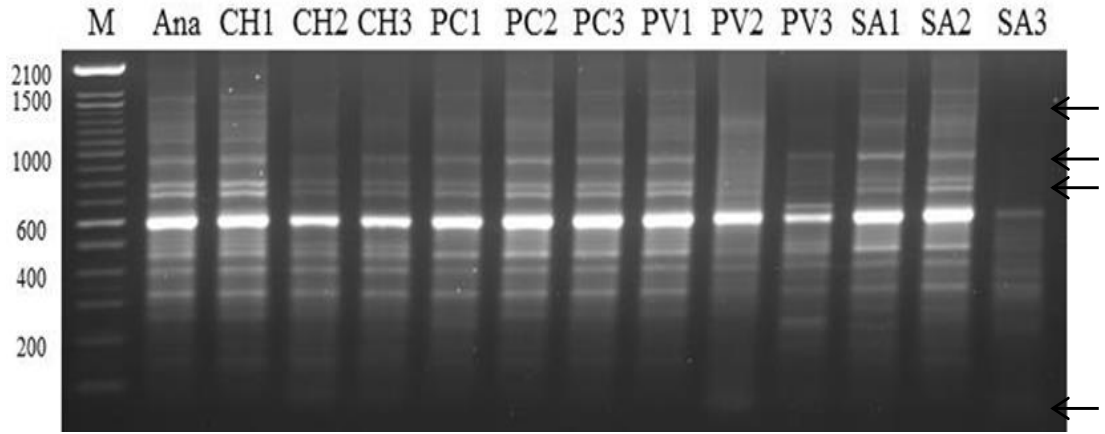
REMAP-4 Primeri													
Bant (bp)	Ana	CH1	CH2	CH3	PC1	PC2	PC3	PV1	PV2	PV3	SA1	SA2	SA3
50	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1
120	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
170	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
240	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
260	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
320	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
360	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
410	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
480	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
490	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
590	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
620	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
740	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1
790	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1
850	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1
900	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1
1000	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1
1200	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0
1400	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1
1600	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1



Şekil 8.25: REMAP-5 primeri ile elde edilen REMAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).

Tablo 8.19: REMAP-5 primeri ile elde edilen bant sonuçları.

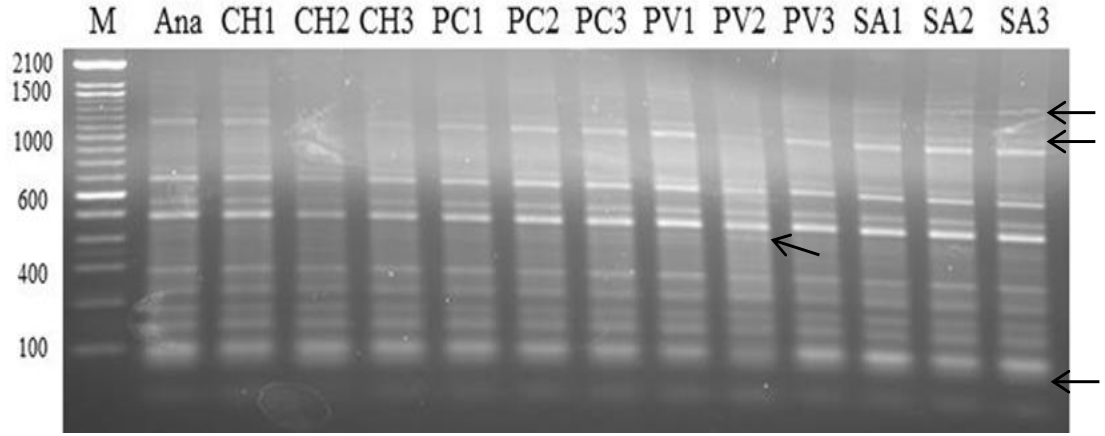
REMAP-5 Primeri													
Bant (bp)	Ana	CH1	CH2	CH3	PC1	PC2	PC3	PV1	PV2	PV3	SA1	SA2	SA3
70	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
110	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
160	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
210	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
230	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
360	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
480	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
570	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
700	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
780	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0
830	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
920	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1150	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
1200	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
1800	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
1900	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0



Şekil 8.26: REMAP-6 primeri ile elde edilen REMAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).

Tablo 8.20: REMAP-6 primeri ile elde edilen bant sonuçları.

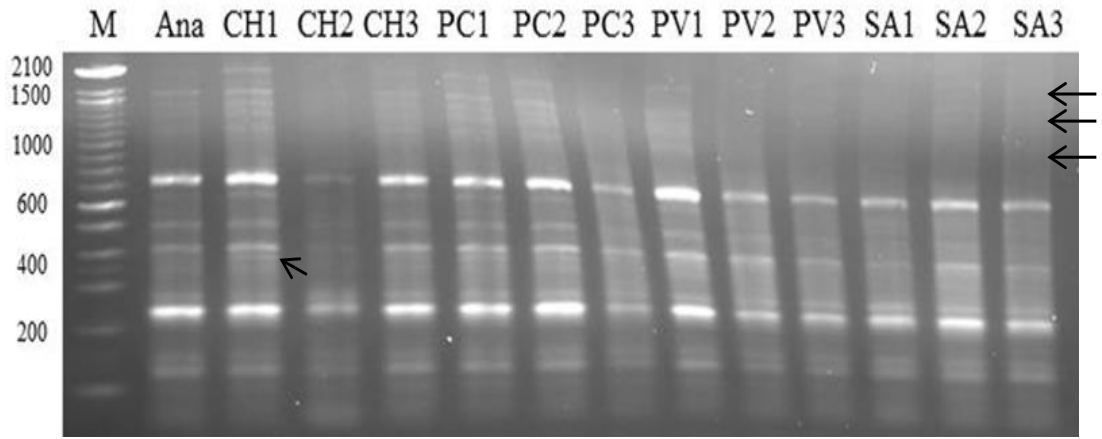
REMAP-6 Primeri													
Bant (bp)	Ana	CH1	CH2	CH3	PC1	PC2	PC3	PV1	PV2	PV3	SA1	SA2	SA3
70	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
190	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
220	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1
230	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
260	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
300	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
320	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
450	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
470	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
630	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
720	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
780	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
940	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1100	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0
1250	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
1350	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0
1500	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0
1550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0



Şekil 8.27: REMAP-7 primeri ile elde edilen REMAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).

Tablo 8.21: REMAP-7 primeri ile elde edilen bant sonuçları.

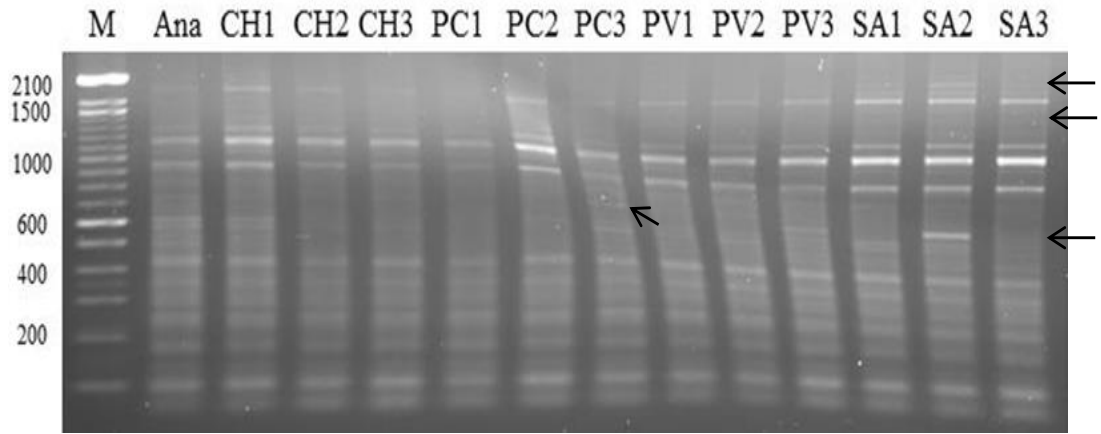
REMAP-7 Primeri													
Bant (bç)	Ana	CH1	CH2	CH3	PC1	PC2	PC3	PV1	PV2	PV3	SA1	SA2	SA3
20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
80	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
190	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
220	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
290	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
310	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
450	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
490	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1250	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1800	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
1900	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0



Şekil 8.28: REMAP-8 primeri ile elde edilen REMAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).

Tablo 8.22: REMAP-8 primeri ile elde edilen bant sonuçları.

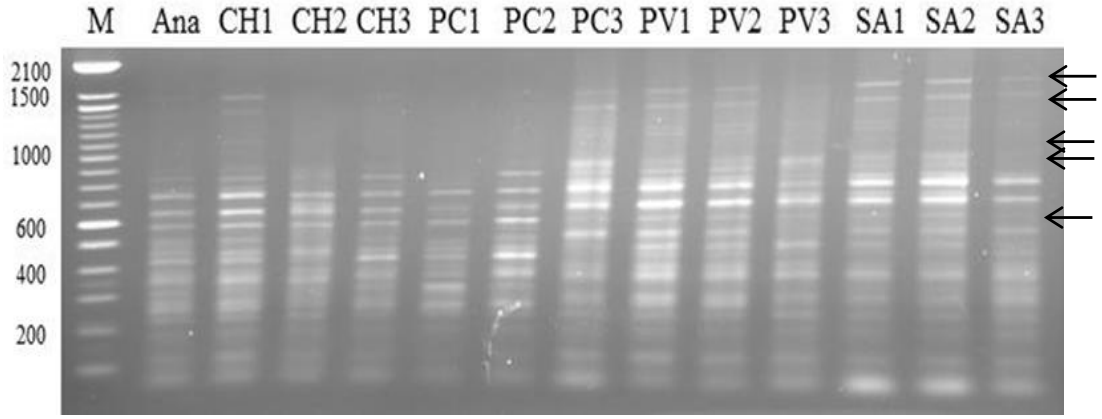
REMAP-8 Primeri													
Bant (bç)	Ana	CH1	CH2	CH3	PC1	PC2	PC3	PV1	PV2	PV3	SA1	SA2	SA3
100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
130	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
160	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
240	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
270	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
380	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
540	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
650	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1100	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
1300	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
1400	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
1550	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
1700	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
2000	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0



Şekil 8.29: REMAP-9 primeri ile elde edilen REMAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).

Tablo 8.23: REMAP-9 primeri ile elde edilen bant sonuçları.

REMAP-9 Primeri													
Bant (bç)	Ana	CH1	CH2	CH3	PC1	PC2	PC3	PV1	PV2	PV3	SA1	SA2	SA3
50	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
180	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
230	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
240	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
290	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
410	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
540	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
580	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
650	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
720	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0
850	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
940	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1050	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1250	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1350	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
1500	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
1600	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
1800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1900	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
2000	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
2100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
2200	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1



Şekil 8.30: REMAP-10 primeri ile elde edilen REMAP profilleri (% 1.5'luk agaroz jel).

Tablo 8.24: REMAP-10 primeri ile elde edilen bant sonuçları.

REMAP-10 Primeri													
Bant (bç)	Ana	CH1	CH2	CH3	PC1	PC2	PC3	PV1	PV2	PV3	SA1	SA2	SA3
80	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
120	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
190	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
210	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
230	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0
250	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
310	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
340	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
370	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
420	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
440	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
510	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
590	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
620	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
630	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0
720	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
740	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
820	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
900	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
1100	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
1200	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
1450	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

İlgili REMAP primerlerinin kullanılmasıyla her bir primer için elde edilen polimorfizm oranları Tablo 8.25’da gösterilmiştir. Tüm PZR amplifikasyonları sonucunda, 20 bç’den 2.2 kb büyüklüğüne kadar toplam 216 bant elde edilmiştir. Her bir primer için 14-29 olmak üzere ortalama 21.6 bant elde edilmiş olup, bu bantlardan 102’si (% 47.2) ise 13 bitki (ana bitki ve 12 klon) arasında polimorfik olarak belirlenmiştir. En yüksek polimorfizm oranı (% 66.6), REMAP6 primeri ile amplifikasyon sonrasında görülürken, en düşük polimorfizm (% 20.0) ise REMAP7 primeri ile elde edilmiştir. Ana bitki ve klonlarının PIC değerleri karşılaştırıldığında ise en yüksek PIC değeri (0.412), REMAP8 primeri ile amplifikasyon sırasında elde edilirken, en düşük PIC değeri (0.295) ise REMAP1 primeri ile edilmiştir. Tüm REMAP primerlerinin ortalama PIC değeri ise 0.353 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 8.25: Alev ağacı klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan REMAP primerleri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilebilir bant ve polimorfik bant sayısı ve yüzdesi.

Primer	Çoğaltılan bant aralığı (bç)	Değerlendirilen bant sayısı	Polimorfik band sayısı	Polimorfizm yüzdesi	PIC* değeri
REMAP 1	100-1800	21	10	47.6	0.295
REMAP 2	50-1550	25	7	28.0	0.300
REMAP 3	50-1450	14	6	42.8	0.355
REMAP 4	500-1600	21	13	61.9	0.402
REMAP 5	70-1900	20	10	50.0	0.305
REMAP 6	70-1550	24	16	66.6	0.343
REMAP 7	20-1900	20	4	20.0	0.366
REMAP 8	100-2000	17	9	52.9	0.412
REMAP 9	50-2200	29	13	44.8	0.409
REMAP 10	80-1600	25	14	56.0	0.327
Toplam	20-2200	216	102	-	-
Ortalama	-	21.6	-	47.2	0.353

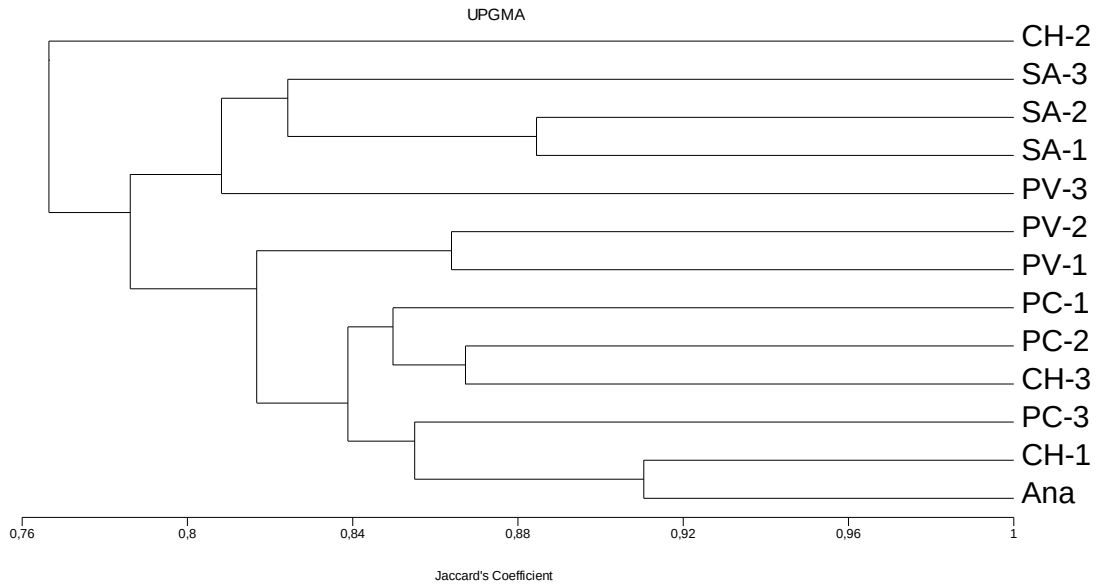
*PIC (Polymorphism information content): Polimorfizm bilgi içeriği.

Ana materyal ile klon bitkiler arasındaki benzerliklerin sunulduğu benzerlik matriksi (Tablo 8.26) ve dendograma (Şekil 8.31) göre bireyler arasındaki benzerlik katsayıları 0.711’den 0.910’e değişmekte olup, ortalama 0.804 olarak belirlemiştir.

Tablo 8.26: Alev ağacı ana materyali ile klonları arasında REMAP analizi ile elde edilen benzerlik matrisi.

	Ana	CH-1	CH-2	CH-3	PC-1	PC-2	PC-3	PV-1	PV-2	PV-3	SA-1	SA-2	SA-3
Ana	1.000												
CH-1	0,910	1.000											
CH-2	0,796	0,798	1.000										
CH-3	0,836	0,847	0,824	1.000									
PC-1	0,848	0,804	0,759	0,839	1.000								
PC-2	0,857	0,832	0,719	0,867	0,861	1.000							
PC-3	0,878	0,833	0,799	0,840	0,843	0,843	1.000						
PV-1	0,828	0,829	0,724	0,809	0,793	0,859	0,841	1.000					
PV-2	0,807	0,800	0,764	0,815	0,772	0,819	0,829	0,864	1.000				
PV-3	0,773	0,776	0,747	0,781	0,711	0,759	0,785	0,773	0,825	1.000			
SA-1	0,832	0,816	0,791	0,768	0,797	0,782	0,855	0,796	0,802	0,795	1.000		
SA-2	0,825	0,835	0,733	0,789	0,766	0,810	0,811	0,834	0,814	0,816	0,884	1.000	
SA-3	0,744	0,780	0,743	0,759	0,716	0,729	0,736	0,787	0,793	0,814	0,819	0,830	1.000

Ana materyale en yakın birey, CH-1 bireyi iken, en uzak birey ise SA-3 birey olmuştur. Bununla birlikte, kriyoprezerve edilen bitkicikler ile ana materyal arasında benzerlik matriksinden de görüleceği üzere ortalama % 80 oranında benzerlik belirlenmiştir. Yapılan tüm analiz sonucu birlikte değerlendirildiğinde, ana materyal ile kontrol grubu ve kriyoprezerve edilen materyaller arasında kabul edilebilir bir polimorfizm (PIC: 0.353) olduğu belirlenmiştir.



Şekil 8.31: Alev ağacı ve 12 klonundan, 10 REMAP primeri ile elde edilen 216 banttın UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogram.

8.3.4. IRAP ve REMAP Verilerinin Değerlendirilmesi

Hem IRAP hem de REMAP analizlerinin benzerlik matrisi verilerindeki CH, PC, PV ve SA gruplarının ortalamaları alınmış ve bu ortalamaların ana materyale benzerlikleri çoklu karşılaştırma testi LSD ($P \leq 0.05$) ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Tablo 8.27).

Tablo 8.27: IRAP ve REMAP analizlerindeki kriyoprezervasyonun farklı basamaklarındaki kontrol ve SA örneklerinin benzerlik ortalamaları^a.

	IRAP	REMAP
Ana	$1.00 \pm 0.00a^b$	$1.00 \pm 0.00a$
CH ortalama	$0.746 \pm 0.0360b$	$0.847 \pm 0.0334b$
PC ortalama	$0.785 \pm 0.0148b$	$0.861 \pm 0.0089b$
PV ortalama	$0.745 \pm 0.0023b$	$0.803 \pm 0.0160b$
SA ortalama	$0.740 \pm 0.0160b$	$0.800 \pm 0.0282b$

^aHer deneme için farklı harfler, LSD çoklu karşılaştırılmalı teste göre anlamlı bir fark ($P \leq 0.05$) göstermektedir. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^bOrtalama $\pm$ standart hata.

Tablo 8.27’de görüldüğü üzere kriyoprezervasyonun farklı basamaklarındaki bireylerin benzerlik ortalamaları, ana materyal ile kıyaslandığında, ilk değişimin soğuğa alıştırma aşaması başladığı ve bundan sonraki aşamalarda istatistiksel olarak anlamlı ek bir değişim olmadığı gözlenmiştir.

9. TARTIŞMA

9.1. Kriyoprezervasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Geleneksel *ex situ* saklama uygulamaları için de alternatif bir yöntem olan kriyoprezervasyon, değerli bitki germplazmalarının uzun süre saklanması için en önemli uygulamalardan biridir. Kriyoprezervasyonun en önemli avantajı, bitki materyalinin SA'ya daldırıldığında, ultra düşük sıcaklıklarda tüm hücre bölünmeleri ve metabolik aktivitesinin durması nedeniyle teorik olarak sonsuza değin saklanabilmesidir [Engelmann, 1997]. Kriyosaklama süresince gereksinim duyulan tek işlem, az miktarda SA'nın haftalık olarak SA tankının içerisine aktarılmasıdır. Düşük maliyetli saklama koşulları, minimum alan ve az işgücü gereksinimi kriyoprezervasyonun diğer avantajlarına ek olarak sayılabilir [Kaczmarczyk et al., 2012]. Çalışılan bitki türüne bağlı olarak, kriyoprezerve edilen bitki parçalarından yeniden gövde kültürlerinin gelişimi birkaç hafta alabilir. Sera koşullarına ve sonrasında toprağa aktarım için mikroçoğaltılmış bitkilerin üretimi için ise birkaç ay hatta yıl gerekebilir [Kaczmarczyk et al., 2012].

Apikal meristem içeren gövde uçları, kriyosaklamada en çok kullanılan bitki materyalidir. Apikal meristemler, nispeten küçük bir iletim sistemine sahip, vakuolsüz hücreler olup, organize olmuş yapılarıyla SA sonrası çözme işleminin ardından doğrudan gövde oluşumunu sağlayarak, *in vitro* çoğalan materyalin genetik bütünlüğünün sürdürülmesini sağlar [Kaczmarczyk et al., 2012]. Apikal meristem virüsten ve patojenden ari bir bölge olması sebebiyle, kriyosaklama süresince, yeni bir fungus ya da bakteri kontaminasyonu riski yoktur. Kriyogenik olarak saklanan materyalin de genellikle genetik kararlılığını sürdürdüğü rapor edilmiştir [Harding, 2004].

Gövde uçları genellikle, vitrifikasyon temelli dört teknik (enkapsülasyon-dehidratasyon, vitrifikasyon, enkapsülasyon-vitrifikasyon ve damlacık vitrifikasyon) kullanılarak kriyoprezerve edilir [Benelli et al., 2012]. Damlacık-vitrifikasyon yöntemi en son geliştirilmiş [Panis et al., 2005] kriyoprezervasyon yöntemidir ve birçok bitki türünde başarılı bir şekilde uygulanmaya devam etmektedir [Leunufna and Keller, 2005], [Yoon et al., 2006], [Kim et al., 2009], [Chen et al., 2011]. Bu yöntemle daha iyi sonuçlar elde edilmesi, dondurma süresince eksplantlar ile SA

arasında, çözme süresince ise eksplantlar ile çözme çözeltisi arasındaki doğrudan temas olmasından, buna bağlı olarak, dondurma ve çözme hızının çok yüksek olmasından kaynaklandığı rapor edilmiştir [Benelli et al., 2012]. Eksplantların görece daha düşük miktarlarda vitrifikasyon çözeltisi ile inkübe edilmesi de bu yöntemin diğer bir avantajıdır. *Prunus* anacı [de Boucaud et al., 2002], *Malus domestica* [Halmagyi et al., 2010] ve *Prunus cerasifera* [Vujovic et al., 2011] damlacık-vitrifikasyon yöntemi ile kriyoprezerve edildiğinde sırasıyla % 52, % 70 ve % 20 oranında bitki gelişimi görülmüştür. Literatürdeki bu olumlu sonuçları nedeniyle, tez kapsamında alev ağacı bitkisine ait gövde uçları, damlacık vitrifikasyon yöntemleri kullanılarak kriyoprezerve edilmiştir. Vitrifikasyon çözeltisi, su miktarını azaltarak hücreleri ölümcül buz kristallerinden koruduğu gibi, alternatif olarak dehidratasyon ve donma süresince hücresel yapıların stabilizasyonunda da işlevsel olabilir [Volk and Walters, 2006]. Alev ağacında, damlacık vitrifikasyon yöntemi ile kriyoprezervasyon protokolünün geliştirildiği çalışmada [Ozden Tokatlı and Akdemir, 2010] kriyoprezervasyon sonrası en yüksek bitki gelişimi (% 30) 4 hafta soğuğa alıştırma aşamasın takiben gerçekleştirilen denemede elde edilmiştir. Proliferasyon besi ortamı olarak ise kriyoprezervasyon sonrası en iyi proliferasyon 4 mg l⁻¹ BA ile desteklenen QL besi ortamında gerçekleşmiştir. Tez kapsamında yapılan denemelerde, kriyoprezervasyon sonrası en yüksek bitki gelişimi 6 hafta soğuğa alıştırma aşamasın takiben gerçekleştirilen denemede elde edilmiş, kriyoprezervasyon sonrası en iyi proliferasyon ise 1 mg l⁻¹ BA ile desteklenen QL besi ortamında gerçekleşmiştir. İki çalışma arasında görülen farklılığın nedeni, önceki çalışmayı takiben alev ağacı bitkisinin uzun süre sitokin içeren besi ortamında alt kültürlenmesi nedeniyle mikroçoğaltılan gövdelerin fizyolojik durumunun ve endojenik sitokin seviyesinin değişmiş olması olabilir.

Yapılan denemelerde, 4 hafta 4 °C'ta soğuğa alıştırma işlemini takiben 0 °C'ta 120 dk PVS2 uygulanan alev ağacı gövde uçlarının, kriyoprezerve edilmeyen kontrol grubunda % 80.6 canlılık belirlenmiş, kriyoprezerve edilen gövde uçlarından ise 120 dk PVS2 uygulamasının ardından % 13.4 oranında canlılık elde edilmiştir. 6 hafta 4 °C'ta soğuğa alıştırma işlemini takiben 0 °C'ta 120 dk PVS2 uygulanan alev ağacı gövde uçlarının, kriyoprezerve edilmeyen kontrol grubunda ise % 74.9 canlılık belirlenmiş, kriyoprezerve edilen gövde uçlarından ise aynı muamelenin ardından % 24.8 oranında canlılık elde edilmiştir. Her ne kadar kriyoprezervasyon öncesi 6 hafta 4 °C'ta saklanarak, soğuğa alıştırılan kontrol grubu gövdelerden alınan gövde

uçlarının canlılık oranı, 4 hafta aynı soğuklukta korunmalarına görece daha az olsa da, iki deneme arasında istatistiksel bir fark bulunmamaktadır (Bkz Tablo 8.1). Bu sonuç, ilgili uygulamaları takiben yapılan ve tezde de sunulan DSC termal analiz sonuçlarından da somut olarak görüldüğü şekilde görece daha uzun 4 °C'ta tutulan gövdelerin daha fazla dehidrate olduğunu ancak bu dehidratasyon sonrası gövdelerden alınan gövde uçlarının canlılık ve proliferasyon yeteneklerini koruduklarını göstermektedir.

Kriyoprezervasyon sürecine alınmadan önce 6 hafta soğuğa alıştırılan bitkilerde, 4 hafta soğuğa alıştırılan bitkilere kıyasla, kriyoprezervasyon sonrasında daha yüksek canlılık ve proliferasyon yüzdeleri elde edilmiştir. 4 ve 6 haftalık soğuğa alıştırma sürecini takiben kriyoprezervasyon tekniğinin her aşamasından alınan gövde uçlarının DSC analizlerine bakıldığında, 6 hafta soğuğa alıştırılan bitkilerde, 4 hafta alıştırılanlara göre, buz oluşumunu simgeleyen ekzotermik pikin, CH, PC ve PV gruplarının çoğunda daha düşük olduğu (4 hafta CH: 40 mW - 6 hafta CH: 35 mW, 4 hafta PC: 25 mW - 6 hafta PC: 30 mW - 4 hafta PV: 15 mW - 6 hafta PV: 10 mW) gözlenmiştir. Bu durum, yine 6 hafta soğuğa alıştırılan bitkilerde, 4 hafta soğuğa alıştırılanlara göre, soğukta daha fazla durması ile ilişkili olarak hücre içi su miktarının daha fazla azaldığını ve uygulamaları takiben yapılan SA muamelesi sonrasında hücrelerde daha az buz oluştuğunu göstermektedir. 6 hafta 4 °C'ta tutulan kontrol grubuna ait gövdelerden alınan gövde uçlarının canlılık ve proliferasyon oranlarından elde edilen sonuçlara paralel olarak, görece daha fazla soğuğa alıştırılan bitkilerin su miktarı, dehidratasyon ve kriyoprezervasyon sonrası canlılıklarını ve proliferasyon yeteneklerini korumaları için yeterince fazla ve hücre içi ve dışında hücreye hasar verecek ölümcül buz oluşumunun önleyecek kadar da azdır.

Tez kapsamında yapılan termal analizler ile elde edilen sonuçlara benzer şekilde literatürde farklı bitki materyallerinin DSC analizleri, donma derecesinin altındaki sıcaklıklarda görülen hasarlar ile donma ya da erime geçişleri arasında güçlü bir bağlantı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Donma ve erime geçişlerinin değişimleri, kuru ağırlıklarında 0.25 - 0.4 g'dan fazla su içeren tohumlarda [Vertucci, 1989], polende [Buitink et al., 1996], zeytin gövde uçlarında [Martinez et al., 2000] ve enkapsüle edilmiş gövde uçlarında [Sherlock et al., 2005] gözlenmiştir.

9.2. Kriyoprezerve Edilen Alev Ağacının Genetik Kararlılıklarının İrdelenmesi için Yapılan IRAP ve REMAP-PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kriyoprezervasyonun amacı, genetik olarak kararlı bitki materyallerinin devamlılığının sağlanmasıdır. Bitki doku kültürü uygulamalarında bitkiler, ozmotik şok, yaralanma, mekanik sarsılma, kap içinde gaz birikmesi, hormonal uygulamalar, anormal minarel içeriği, yüksek nisbi nem gibi birçok farklı sebepten ötürü strese girmektedirler. Kriyoprezervasyon protokollerinde ise bunlara ek olarak bitkiler, ultra düşük sıcaklıklara, dehidratasyona ve PVS2 içeriğindeki DMSO gibi belirli toksik kriyokoruyuculara maruz kalırlar. Tüm bu durumlar bitkilerde, fizyolojik stres ve buna bağlı olarak da genetik kararsızlık ile sonuçlanabilir [Panis and Lambardi, 2005]. Kriyokoruyuculardan kaynaklanan ve/veya oksidatif stres nedeniyle kriyoprezervasyon sürecinde oluşan hasar, serbest radikallerin oluşumuna neden olarak, genetik değişikliklere yol açabilir [Benson and Bremner, 2004]. Su kaybının yarattığı strese benzer şekilde, kriyoprezervasyon öncesi yüksek ozmotik muamelesi ve dehidratasyon süresince meydana gelen stres, süperoksitler, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerini içeren reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olur [Mittler, 2002]. Bu serbest radikallerin birçoğu, eşleşmemiş elektron içerirler ve bu nedenle de özgün olmayan bir şekilde komşu moleküllerle reaksiyona girerek, elektron çiftlerinden birini kendine aktarmakta ve radikal oluşumu için zincir reaksiyonu başlatmaktadır [Kaczmarczyk et al., 2012]. Bu reaksiyonlar, protein, lipid ve DNA gibi makromoleküllerde işlev kaybına ya da yapısal değişikliklere neden olabilir [Benson, 1990], [Halliwell and Gutteridge, 2007]. Bu nedenle özellikle DNA’da kriyoprezervasyon süresince oluşma riski bulunan genetik kararsızlıklar, çeşitli araştırmacılar tarafından RAPD [DeVerno et al., 1999], [Gagliardi et al., 2003], [Liu et al., 2004], [Martin ve Gonzalez-Benito, 2005], [Sanchez et al., 2008], [Akdemir et al., 2013], [Martin et al., 2011] ve AFLP [Turner et al., 2001], [Liu et al., 2004], [Fernandes et al., 2008], [Peredo et al., 2008], [Zarghami et al., 2008], [Martin et al., 2011] gibi moleküler belirteçler kullanılarak irdelenmiştir.

Meşakatli bir işlem olan kriyoprezervasyon süresince yukarıda da bahsi geçen streslerin bitkilerde genetik varyasyonun yanı sıra, DNA metilasyonu veya transpozon ve retrotranspozon aktivasyonu sonucu epigenetik değişikliklere de neden olabileceği bilinmektedir. Bu nedenle tez kapsamında, stres ile aktive oldukları

bilinen retrotranspozonların [Wessler, 1996] alev ağacında kriyoprezervasyon sonrası elde edilen bitkilerde somaklonal varyasyona neden olup olmadıkları retrotranspozona dayalı iki farklı moleküler belirteç olan IRAP ve REMAP teknikleri kullanılarak, irdelenmiştir. Literatürde farklı bitkilerin doku kültürü sonrasında elde edilen klonlar arasındaki genetik kararlılıkların IRAP ve REMAP belirteçleri ile belirlendiği çalışmalar [Hirochika, 1993], [Kubis et al., 2003], [Campbell et al., 2011] bulunmaktadır. Bunlara ek olarak, dehidratasyon tekniği ile kriyoprezerve edilen buğday bitkisinin ISSR ve REMAP belirteçleri kullanılarak genetik kararlılığın irdelendiği bir çalışma da [Solov'eva et al., 2011] bulunmaktadır. Bu çalışmada iki belirteçle yapılan analizler, kriyoprezervasyon sonrası saklanan materyelin genetik olarak kararlı olduğunu göstermiştir. Ancak ilgili çalışmada kriyoprezervasyon öncesinde bitkilerin soğuğa alıştırılması aşaması gerçekleştirilmeyip, bunun yerine ilk aşama olarak gövde uçları 22 °C'ta ön kültür aşaması gerçekleştirilmiştir. Her ne kadar alev ağacı gibi odunsu bitkilerin kriyoprezervasyonu için, protokol öncesinde soğuğa alıştırma aşaması önemli olsa da, bu sonuç, alev ağacında yapılacak bir başka çalışmada, gövde uçlarının soğuğa alıştırma aşaması yerine, dehidratasyon için daha yoğun sukroz içeren ya da başka şeker alkollerinin kullanıldığı ön kültür besiyortamında kültüre alınmasını takiben kriyoprezerve edilebileceğini önermektedir. Bu şekilde, ana bitki ile daha benzer bireyler, kriyoprezervasyon sonrasında elde edilebilir. Bununla birlikte, genellikle odunsu bitkilerin kriyoprezervasyonu için kriyoprezervasyonun ön kültür aşaması öncesinde bitkilerin soğuğa alıştırılmasının, saklama sonrası canlılığı arttırdığı bilinmektedir [Towill, 2002].

Tez kapsamında 10 primer ile yapılan IRAP analizleri, kriyoprezerve edilen alev ağacının bitkiciklerinde genetik kararsızlığın ana bitki, kontrol grupları ve kriyoprezerve edilmiş materyaller arasında çok düşük oranda olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, elde edilen ortalama PIC değerinin de (0.307), 0.5'ten düşük olması oluşan polimorfizmin kabul edilebilir bir oranda olduğunu göstermektedir [Botstein et al., 1980]. Yine 10 primer kombinasyonu kullanılarak yapılan REMAP analizleri sonucunda da PIC değeri (0.353) 0.5'ten düşük bulunmuş ve kriyoprezerve edilen alev ağacının bitkiciklerinde genetik kararsızlığın ana bitki, kontrol grupları ve kriyoprezerve edilmiş materyaller arasında çok düşük oranda olduğu belirlenmiş ve her iki belirteç ile karşılaştırılabilir sonuçlar elde edilmiştir.

Kriyoprezervasyon protokolünün farklı aşamalarına maruz kalan gövde veya gövde uçlarının ana bitki ile olan benzerlikleri, her bir aşamada kullanılan 3 bireyin ortalama benzerlik oranları göz önüne alınarak incelendiğinde, aslında var olan genetik kararsızlıkların protokolün soğuğa alıştırma aşamasında ortaya çıktığı görülmektedir. Elde edilen bu sonuç, biyotik stresin yanı sıra dehidratasyon ve soğuk gibi abiyotik streslerin genomda retrotranspozonlar ile uyarılan mutasyona yol açtığı bilindiğinden [Kalendar et al., 2000] tahmin edilebilir bir sonuçtur. Soğuğa alıştırmayı takiben yapılan sukroz muamelesinin veya PVS2 uygulaması veya SA'ya aktarmanın bitkilerde istatistiksel olarak anlamlı ek bir varyasyona neden olmadığı görülmektedir. Bunun nedeni, görece toksik olan PVS2 kriyokoruyucusunun 0°C'ta uygulanmış olması ve SA'ya daldırma sonrası bitkinin metabolik faaliyetlerinin tamamen durması olabilir.

Tez kapsamında retrotranspozona dayalı iki moleküler belirteç ile elde edilen, kabul edilebilir bir seviyede olduğu görülen genetik kararsızlığın daha önce literatürde belirtildiği şekilde [Akdemir et al., 2013] SA'ya daldırma sırasında veya sonrasında çok SA öncesi uygulanan ve dehidratasyon stresine yol açan uygulamalardan kaynaklandığı görülmüştür.

Literatürde, IRAP ve REMAP belirteçlerinin kriyoprezervasyon sonrası saklanan bitkiciklerin genetik kararlılıklarının irdelenmesinde beraber değerlendirildiği bir yayın bulunmadığından, tez kapsamında yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar özgündür.

10. SONUÇ

Teze konu olan alev ağacı bitkisinin kriyoprezervasyonu, Ozden Tokatli ve Akdemir (2010) tarafından geliştirilen damlacık dondurma tekniği ile gerçekleştirilmiş, kriyoprezerve edilen bitkilerin genetik kararlılıkları IRAP ve REMAP moleküler belirteç teknikleri ile irdelenmiştir. Tüm analizlerden elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır.

- Damlacık vitrifikasyon tekniği ile yapılan kriyoprezervasyon denemeleri, 4 veya 6 hafta soğuğa alıştıırma sürecini takiben iki farklı şekilde gerçekleştirilmiş ve istatistiksel analizler neticesinde en iyi proliferasyon sonucu ($\% 19.4 \pm 0.9$) 6 hafta soğuğa alıştıırma aşamasını takiben kriyoprezerve edilen bitkilerde gözlenmiştir.
- DSC ile yapılan termal analizler, 6 hafta soğuğa alıştıırılan bitkilerde kriyoprezervasyon sırasında 4 hafta soğukta tutulan bitkilere görece daha az buz oluşma piki varlığını göstermiştir. Hem kontrol hem de kriyoprezerve edilen gövde uçlarından elde edilen canlılık ve proliferasyon verileri hem de termal analizler, alev ağacına ait gövde uçlarının başarılı bir şekilde kriyoprezervasyonu için gövdelerin 6 hafta soğuğa alıştıırılması gerektiğini göstermektedir.
- IRAP analizleri ile standart bitki doku kültürü büyüme koşullarındaki ana bitki ile kriyoprezervasyon sürecindeki farklı aşamalardaki (CH, PC, PV ve SA) bireyler arasındaki genetik kararlılık irdelenmiş ve 150 bç'den 2.9 kb büyüklüğüne kadar toplam 192 bant elde edilmiştir. Bu bantlardan 100 tanesi polimorfik olup, bireyler arasındaki polimorfizm oranı $\% 52.1$ ve ortalama PIC değeri 0.307'dir.
- REMAP analizleri ile standart bitki doku kültürü büyüme koşullarındaki ana bitki ile kriyoprezervasyon sürecindeki farklı aşamalardaki (CH, PC, PV ve SA) bireyler arasındaki genetik kararlılık irdelenmiş ve 20 bç'den 2.2 kb büyüklüğüne kadar toplam 216 bant elde edilmiştir. Bu bantlardan 102 tanesi polimorfik olup, bireyler arasındaki polimorfizm oranı $\%47.2$ ve ortalama PIC değeri 0.353'dir.

- Ana bitki ve diğer bireyler arasında elde edilen polimorfizm oranı ve PIC değerlerine göre kriyoprezervasyon sonrası az da olsa genetik kararsızlık gözlenmiştir. Ancak, iki moleküler belirteç ile irdelenme sonucunda hesaplanan PIC değerlerinin 0.5'ten küçük olması nedeniyle, elde edilen varyasyon kabul edilebilir bir polimorfizm olarak görülmektedir.
- Tez kapsamında kriyoprezerve edilen alev ağacı gövde uçlarında görülen bu polimorfizmin kabul edilebilir seviyede olması, optimize edilen uzun süreli saklama protokolünün ilgili bitkinin germplazmasının saklanması için uygulanabilir olduğunu göstermektedir.
- Retrotranspozonlara dayalı moleküler belirteçler ile elde edilen bu kabul edilebilir polimorfizmin, eksplantların SA'ya daldırma sırasından veya sonrasında çok kriyoprezervasyonun soğuğa alıştırma basamağında gövdelerin maruz kaldıkları soğuk ve dehidratasyon stresleri nedeniyle oluştuğu görülmüştür. Ancak, kriyoprezervasyon sırasında dokuda oluşma olasılığı bulunan oksidatif stresin de tespit edilen bu varyasyona katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, ilerideki çalışmalarda kriyoprezervasyonun farklı aşamalarına maruz kalan alev ağacı dokularında oluşan oksidatif stresin gaz kromatografik analizler ile irdelenmesi planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Akbulak T., (2011), “Alev Ağacı (*Photinia X fraseri* Dress.) Süs Bitkisinin Mikroçoğaltımında Sıvı Kültür ve Geçici Daldırma Biyoreaktör Sistemlerinin Kullanımı”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.
- Akdemir H., Kaya E., Ozden Tokatlı Y. (2010), “*In vitro* proliferation and minimum growth storage of fraser photinia: Influences of different medium, sugar combinations and culture vessels”, *Scientia Horticulturae*, 126, 268-275.
- Akdemir H., (2013), “Olgun antepfıstığı bitkisinin (*Pistacia vera* L. ‘Atlı’) mikroçoğaltımı, *in vitro* konzervasyonu ve kriyoprezervasyonu için biyoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesi”, Doktora Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.
- Akdemir H., Suzerer V., Tilkat E., Yildirim H., Onay A., Ozden Çiftçi Y. (2013), “*In vitro* conservation and cryopreservation of mature pistachio (*Pistacia vera* L.) germplasm”, *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 21, 43-51
- Akin-Idowu P., Ibitoye D., Ademoyegun O. (2009), “Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops”, *African Journal of Biotechnology*, 16, 3782-3788.
- Al-Ababneh S. S., Shibli R. A., Karam N. S., Shatnawi M. A. (2003), “Cryopreservation of bitter almond (*Amgdalus communis* L.) shoot tips by encapsulation-dehydration and vitrification”, *Advanced HortScience*, 17, 15-20.
- Antonius-Klemola K., Kalendar R., Schulman A. H. (2006), “TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports”, *Theoretical Applied Genetics*, 112, 999-1008.
- Arabidopsis Genom Girişimi (Arabidopsis Genome Initiative), (2000), “Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*”, *Nature*, 408, 796-815.
- 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.
- Ballester A., Janiero L. V., Vieitez A. M. (1997), “Cold storage of shoot cultures and alginate encapsulation of shoot tips of *Camellia japonica* L. and *Camellia reticulata* Lindely”, *Scientia Horticulturae*, 71, 67-78.
- Belyayev A., Kalendar R., Brodsky L., Nevo E., Schulman A. H., Raskina O. (2010), “Transposable elements in a marginal plant population: temporal fluctuations provide new insights into genome evolution of wild diploid wheat”. *Mobile DNA* 1, 6.

Benelli C., De Carlo A., Engelmann F. (2012), "Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of *Actinidia*, *Diospyros*, *Malus*, *Olea*, *Prunus*, *Pyrus* and *Vitis*", *Biotechnology Advances*, 10, 10-16.

Benson E. E., Wilkinson M., Todd A., Ekuere U., Lyon J. (1996), "Development competence and ploidy stability in plants regenerated from cryopreserved potato shoot-tips", *CryoLetters*, 17, 119-128.

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. (1990), "Free Radical Damage in Stored Plant Germplasm, International Board for Plant Genetic Resources", ISBN 92-9043-196-2, Rome, Italy.

Benson E. E., Reed B. M., Brennam R. M., Clacher K. A., Ross D. A. (1996), "Use of thermal analysis in the evaluation of cryopreservation protocols for *Ribes nigrum* L. germplasm", *CryoLetters*, 17, 347-362.

Boronnikova S. V., Kalendar R. N. (2010), "Using IRAP markers for analysis of genetic variability in populations of resource and rare species of plants", *Russian Journal Genetics*, 46, 36-42.

Botstein D., White, R. L., Skolnick, M., Davis, R. W. (1980), "Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms", *American Journal Human Genetics* 32, 314-331.

Boyko E., Kalendar R., Korzun V., Korol A., Schulman A. H., Gill B.S. (2002), "A high-density cytogenetic map of the *Aegilops tauschii* genome incorporating retrotransposons and defense related genes: insights into cereal chromosome structure and function", *Plant Molecular Biology*, 48, 767-790.

Branco C. J., Vieira E. A., Malone G., Kopp M. M., Malone E., Bernardes A., Mistura C. C., Carvalho F. I., Oliveira C. A. (2007), "IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice", *Journal of Applied Genetics*, 48, 107-113.

Bretó M. P., Ruiz C., Pina J. A., Asíns M. J. (2001), "The diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a vegetatively propagated crop species", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21, 285-293.

Brickell C. (1996), "Enciclopedia de Plantas y Flores", Royal horticultural society, Grijalbo Mondadori, Verona, Italy, pp566.

Brik A. F., Kalendar R., Stratula O. R., Sivolap Y. M. (2006), "IRAP and REMAP analyses of barley varieties of Odessa breeding", *Cytology and Genetics*, 3, 24-33.

Brown D. C. W., Leung D. W. M., Thorpe T. A. (1979), "Osmotic requirements for shoot formation in tobacco callus", *Physiology of Planta*, 46, 36-41.

Buitink J., Walters-Vertucci C., Hoekstra F. A., Leprince O. (1996), "Calorimetric properties of dehydrating pollen: analysis of a desiccation tolerant and an intolerant species", *Plant Physiology*, 111, 235–242.

Burns J. A., Schwarz O. J. (1996), "Bacterial stimulation of adventitious rooting on *in vitro* cultured slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) seedling explants", *Plant Cell Reports*, 15, 405–408.

Campbell B. C., LeMare S., Piperidis G., Godwin I. D. (2011), "IRAP, a retrotransposon-based marker system for the detection of somaclonal variation in barley", *Molecular Breeding* 27, 193–206.

Chen T. H. H., Kartha K. K., Leung N. L., Kruz W. G. W., Chatson K. B., Constabel F. (1984), "Cryopreservation of alkaloid-producing cell cultures of periwinkle (*Catharanthus roseus*)" *Plant Physiology*, 75, 725-731.

Chen X. L., Li J. H., Xin X., Zhang Z. E., Xin P. P., Lu X. X. (2011), "Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification", *South African Journal of Botany*, 77, 397-403.

Cheong E. J. (2012), "Biotechnological approaches for improvement and conservation of *Prunus* species", *Plant Biotechnology Reports*, 6, 17-28.

De Boucaud M. T., Brison M., Heliott B., Herve-Paulus V. (2002), "Cryopreservation of plant germplasm II – Biotechnology in agriculture and forestry", *Berlin Heidelberg*, 15, 287–311.

Deng X. M., Huang M. R., Wang M. X. (2004), "Establishment of high regeneration system of *Photinia fraseri* (Red Robin)", *Jiangxi for Science Technology*, 4, 9-21.

DeVerno L. L., Park Y. S., Bonga J. M., Barrett J. D. (1999), "Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clones of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss.]", *Plant Cell Report* 18, 948-953.

Dodds J. H., Roberts L. W. (1985), "Experiments in plant tissue culture. 2nd ed", Cambridge University Press, pp, 172-179.

Dumet D., Engelmann F., Chabrillange N., Duval Y. (1993), "Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a dessiccation step", *Plant Cell Reports*, 12, 352-355.

Engelmann F. (1997), "*In vitro* conservation methods, in biotechnology and plant genetic resources: Conservation and use", CABI, Wellingford, pp, 119-162.

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.

Engelmann F. (2000), "Importance of cryopreservation for the conservation plant genetic resources", IPGRI, Rome, Italy, pp, 8-20.

Engelmann F. (2004), "Plant cryopreservation: Progress and prospects", *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40, 427-433.

Fahy G. M., MacFarlane D. R., Angell C. A., Meryman H. T. (1984), "Vitrification as an approach to cryopreservation", *Cryobiology*, 21, 407-426.

Fernandes P., Rodríguez E., Pinto G., Roldán-Ruiz I., De Loose M., Santos C. (2008), "Cryopreservation of *Quercus suber* somatic embryos by encapsulation-dehydration and evaluation of genetic stability", *Tree Physiology*, 28, 1841-1850.

Finnegan D. J. (1989), "Eukaryotic transposable elements and genome evolution", *Trends Genetics*, 5, 103-107.

Flavell A. J., Dunbar E., Anderson R., Pearce S. R., Hartley R., Kumar A. (1992), "Tyl-copia group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants", *Nucleic Acids Research*, 20, 3639-3644.

Frankel O. H., Brown, A. H. D., Burdon, J. J. (1995), "The conservation of plant biodiversity", Cambridge University Press, Cambridge.

Fukai et al., (1994), "The chimeric structure of apical dome of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam.) is affected by cryopreservation", *Scientia Horticultural*, 57, 347-351.

Fukai S. (1989), "Plant regeneration from shoot tips of *hybrida* cryopreserved in liquid nitrogen up to 2 years", *Plant Tissue Culture Letters*, 6, 177-178.

Gagliardi R. F., Pacheco G. P., Carneiro L. A., Valls J. F. M., Vieira M. L. C., Mansur E. (2003), "Cryopreservation of *Arachis* species by vitrification of in vitro-grown shoot apices and genetic stability of recovered plants", *Cryoletters*, 24, 103-110.

Gilman E.F., Watson D.G. (1994), "*Photinia glabra* Red-Leaf Photinia", Fact Sheet ST-442.

Gnanapragasam S., Vasil I. K. (1992), "Cryopreservation of immature embryos, embryonic callus and cell suspension culture of gramineous species", *Plant Science*, 83, 205-215.

Gonzalez-Arnan M. T., Urra C., Engelmann F., Ortizm R., DeLafe C. (1993), "Cryopresevation of encapsulated of sugarcane apices: effect of storage temperature and duration", *CryoLetters*, 20, 347-352.

Grapin A., Dumet D., Holota H., Dorion N. (2003), "Cryopreservation of pelargonium shoot tips by encapsulation-dehydration: Effects of sucrose concentration, dehydration duration and genotype", *Acta Horticulturae*, 623, 225-230.

Haberlandt G., (1902), "Kültürversuche mit isolierten Pflanzenzellen", *Sitzungsber Academy of Wien, Naturwiss*, 111, 69-92.

Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (2007), “Free Radicals in Biology and Medicine (Fourth edition)”, Oxford University Press, ISBN 978-0-19-856868-1, Oxford.

Halmagyi A., Deliu C., Isac V. (2010), “Cryopreservation of *Malus* cultivar: comparison of two droplet protocols”, *Scientia Horticulture*, 124, 387–392.

Hammatt N., Grant N. J. (1993), “Apparent rejuvenation of mature wild cherry (*Prunus avium* L.) during micropropagation”, *Journal of Plant Physiology* 141, 341–346.

Harding K., Benson E. E. (2000), “Analysis of chloroplast DNA in *Solanum tuberosum* plantlets derived from cryopreservation”, *CryoLetters*, 21, 279–288.

Harding K., Benson E. E. (2001), “The use of microsatellite analysis in *Solanum tuberosum* L. in vitro plantlets derived from cryopreserved germplasm”, *CryoLetters*, 22, 199–208.

Harding K. (2004), “Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review”, *CryoLetters*, 25, 3–22.

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.

Hill P., Burford D., Martin D. M. A., Flavell A. J. (2005), “Retrotransposon populations of *Vicia* species with varying genome size”, *Molecular Genetics and Genomics*, 273, 371–381

Hirochika H. (1993), “Retrotransposons of rice: Their regulation and use for genome analysis”, *Plant Molecular Biology*, 35, 231–240.

Hughes M. A., Dunn M. A. (1996), “The molecular biology of plant acclimation to low temperature”, *Journal of Experimental Botany*, 47, 291–305.

IUCN (1994), “United nations list of national parks and protected areas”, WCMC, Cambridge and IUCN Commission on National Parks and Protected Areas, Gland, Switzerland.

Jaccard P. (1908), “Nouvelles recherches sur la distribution florale”, *Bulletin de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles*, 44, 223–270

Janeiro L. V., Vietez A. M., Ballester A. (1996), “Cryopreservation of somatic embryos and embryonic axes of *Camellia japonica* L.”, *Plant Cell Reports*, 15, 699–703.

Kaczmarczyk A., Funnekotter B., Menon A., Phang P. Y., Al-Hanbali A., Bunn E., Mancera R. L. (2012), “Current Issues in Plant Cryopreservation”, Technical Publication, ISBN 978-953-51-0191-8, pp, 417–438.

Kalendar R., Schulman A. H. (2006), "IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting", *Nature Protocols*, 1, 2478-2484.

Kalendar R., Grob T., Regina M., Suoniemi A., Schulman A. H. (1999), "IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques", *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 704-711.

Kalendar R., Tanskanen J., Immonen S., Nevo E., Schulman A. (2000), "Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence", *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 97, 6603-6607.

Kalendar R. (2011), "The use of retrotransposon-based molecular markers to analyze genetic diversity", *Qatar Poverty / Field Vegetable Crops Research*, 48, 261-274.

Kane M. E., Sheehan T. J., Philman N. L. (1987), "A micropropagation protocol using fraser *Photinia* for mutation induction and new cultivar selection", *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 100, 334-337.

Keller E. R. J., Senula A., Kaczmarczyk A. (2008), "In plant cryopreservation: A Practical Guide", Springer, pp, 281-301.

Kirdok E., (2010), "*Sequoia sempervirens* (sahil sekoyası)'in kriyoprezervasyon yolu ile uzun süreli saklanması amacıyla tek aşamalı dondurma yöntemlerinin geliştirilmesi", Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.

Kim G. A., Lee S. T., Lee E. J., Choi J. K., Lim J. M. (2009), "Simplified slow freezing program established for effective banking of embryonic stem cell", *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 3, 343-349.

Kovach W. L. (1999), "MVSP-A Multi Variante Statistical Package for Windows, ver. 3.1. Kovach Computing Services", Pentraeth, Wales, UK.

Kubis S. E., Castilho A. M., Vershinin A. V., Heslop-Harrison J. S. (2003), "Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation" *Plant Molecular Biology*, 52, 69-79.

Lambardi M., Fabbri A., Caccavale A. (2000), "Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of *in vitro*-grown shoot tips", *Plant Cell Reports*, 19, 213-218.

Lambardi M., Sharma K. K., Thorpe T. A. (1993), "Optimization of *in vitro* bud induction and plantlet formation from mature embryos of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.)", *In Vitro Cell Development Biology*, 29, 189-199.

Lambardi M., De Carlo A., Capuana, M. (2005), "Cryopreservation of embryogenic callus of *Aesculus hippocastanum* L. by vitrification/one-step freezing", *CryoLetters*, 26, 185-192.

Larraburu E. E., Carletti S. M., Rodríguez Cáceres E. A., Llorente B. E. (2007), "Micropropagation of *Photinia* employing rhizobacteria to promote root development", *Plant Cell Reports*, 26, 711–717.

Leifert C., Pryce S., Lumsden P. J., Waite W. M. (1992), "Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing *in vitro*", *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 30, 171–179.

Leigh F., Kalendar R., Lea V., Lee D., Donini P., Schulman A. H. (2003), "Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques", *Molecular Genetics and Genomics*, 269, 464–474

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.

Lingdi L., Spongberg S. A. (2003), "Photinia", *Flora of China*, 9: 121–137.

Lipavska H., Vreugdenhil D. (1996), "Uptake of mannitol from media by *in vitro* grown plants", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 45, 103–107.

Liu Y., Wang X., Liu L. (2004), "Analysis of genetic variation in surviving apple shoots following cryopreservation by vitrification", *Plant Science* 166, 677–685.

Lodhi M. A., Guang-ning Y., Weeden N. F. N., Reisch B. I. (1994), "A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species", *Molecular Biology Reports*, 26: 6–13.

Macas J., Neumann P., Navrátilová A. (2007), "Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome: Comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago truncatula*", *BMC Genomics*, 8, 427.

Manninen O., Kalendar R., Robinson J., Schulman A. H. (2000), "Application of BARE-1 retrotransposon markers to map a major resistance gene for net blotch in barley", *Molecular Genetics and Genomics*, 264, 325–334.

Martin et al., (2011), "Genetic stability analysis of chrysanthemum (*Chrysanthemum x morifolium* Ramat) after different stages of an encapsulation-dehydration cryopreservation protocol", *Journal of Plant Physiology*, 168, 158–66.

Martin C., Gonzalez-Benito M. E. (2005), "Survival and genetic stability of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev shoot apices after cryopreservation by vitrification and encapsulation-dehydration", *Cryobiology*, 51, 281–289.

Martinez D., Revilla M. A., Espina A., Garcia J. R. (2000), "Differential scanning calorimetry applied to the storage at ultra low temperatures of olive and hop *in vitro* grown shoot-tips", *Thermochimica Acta*, 349, 147–151.

Merkle S. A., Dean J. F. (2000), "Forest tree biotechnology", *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 298–302.

Mirza M. S., Ahmad W., Latif F., Haurat J., Bally R., Normand P., Mallik K. A. (2001), "Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micropropagated sugarcane *in vitro*", Plant Soil and Environment, 237, 47–54.

Mittler R. (2002), "Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance", Trends Plant Science, 7, 405–410.

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.

Monk M. (1990), "Variation in epigenetic inheritance", Trends Genetics, 6, 110–114.

Murashige T., Skoog M. (1962), "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture", Physiology of Plant, 15, 473-497.

Mycock D. J., Wesley-Smith D. M., Berjak P. (1995), "Cryopreservation of somatic embryos four species with and without cryoprotectant pretreatment", Annals of Botany, 75, 331-336.

Negash A., Krens F., Schaart J., Visser B. (2001), "In vitro conservation of enset under slow-growth conditions", Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 66, 107–111.

Neitzsche W. (1983). "Germplasm preservation", Handbook of Plant Cell Culture, New York Macmillan, pp, 82-805.

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.

Niino T., Shirata K., Oka S. (1995), "Viability of mulberry buds cryopreserved for 5 years at -135°C", Journal of Sericulture Science of Japan, 64, 370-374.

Nowak J. (1998), "Benefits of *in vitro* (biotization) of plant tissue cultures with microbial inoculants", *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant*, 34, 122–130.

Orlikowska T. (1992), "Effect of *in vitro* storage at 4°C on survival and proliferation of two apple rootstocks", Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 31, 1-7.

Ozden Tokatli Y., De Carlo A., Gumusel F., Pignatelli S., Lambardi M. (2008), "Development of encapsulation techniques for the production and conservation of synthetic seeds in ornamental plants", Propagation of Ornamental Plants 8, 17-22.

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., Previati A., Lambardi M. (2010), “*In vitro* conservation and cryopreservation of ornamental plants”, *Methods in Molecular Biology*, 589, 303-324.
- Panis B., Lambardi M. (2005), “Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees)”, Turin, pp, 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.
- Paterson A. H., Bowers J. E., Bruggmann R., Dubchak I., Grimwood J., Gundlach H. (2009), “The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses”, *Nature* 457, 551-556
- Paul H., Daigny G., Sangwan-Norreel B. S. (2000), “Cryopreservation of apple (*Malus X domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation-vitrification”, *Plant Cell Reports*, 19, 768-774.
- Pearce S. R., Harrison G., Li D., Heslop-Harrison J. S., Kumar A., Flavell A. J. (1996). “The Tyl-copia group of retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localisation”, *Molecular Genomics and Genetics*, 205, 305-315
- Pearce S. R., Knox M., Ellis T. H., Flavell A. J., Kumar A. (2000), “Pea Ty1-copia group retrotransposons: transpositional activity and use as markers to study genetic diversity in *Pisum*”, *Molecular Genomics and Genetics*, 263, 898-907
- Peredo E. L., Arroyo-Garcia R., Reed B. M., Revilla M. A. (2008), “Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.)”, *Cryobiology*, 57, 234–241.
- Pereira H. S., Barão A., Delgado M., Leonor Morais-Cecílio, L., Viegas W. (2005), “Genomic Analysis of Grapevine Retrotransposon 1 (Gret1) in *Vitis vinifera*”, *Theoretical and Applied Genetics*, 111, 871-878.
- Pirinç Kromozom Dizi Konsorsiyumu (Rice Chromosome Consortium) (2003), “In-depth view of structure, activity, and evolution of rice chromosome 10”, *Science*, 300, 1566-1569.
- Quoirin M., Lepoivre P. (1977), “Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp.” *Acta Horticulture*, 78, 437-442.
- Ramirez-Malagón R., Borodanenko A., Barrera-Guerra J. L., Ochoa-Alejo N. (1997), “Micropropagation for fraser photinia (*Photinia fraseri*)” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48, 219–222.
- Razdan M. K., Cockling E.C. (1997), “Biotechnology in conservation of genetic resources”, *Science Publishers, USA*, pp, 1-25.

Rohlf F. J. (1993), "NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system", Exeter Publishing, New York.

Roldan-Luiz I., Dendauw I., Van Bockstaele E., Depicker A., De Loose M. (2000), "AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium spp.*)", *Molecular Breeding*, 6, 125-134.

Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı, (2001), Ankara.

Saeidi H., Rahiminejad M. R., Heslop-Harrison J. S. (2008), "Retroelement insertional polymorphisms, diversity and phylogeography within diploid, D-genome *Aegilops tauschii* (Triticeae, Poaceae) sub-taxa in Iran", *Annales Botanici*, 101, 855-861.

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

Sánchez C., Martinez M. T., Vidal N., San-Jose M. C., Valladares S., Vieitez A. M. (2008), "Preservation of *Quercus robur* germplasm by cryostorage of embryogenic cultures derived from mature trees and RAPD analysis of genetic stability", *CryoLetters*, 29, 493-504.

SanMiguel P., Tikhonov A., Jin Y. K., Motchoulskaia N., Zakharov D., Melake-Berhan A., Springer P. S., Edwards K. J., Lee M., Avramova Z., Bennetzen J. L. (1996). "Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome", *Science*, 274, 765-768.

Sano H., Kamada I., Youssefian S., Katsumi M., Wabiko H. (1990), "A single treatment of rice seedlings with 5-azacytidine induces heritable dwarfism and undermethylation of genomic DNA", *Molecular General Genetics*, 220, 441-447.

Sarkar D., Naik P. S. (1998), "Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro*", *Euphytica*, 102, 275-280.

Scottez C. E., Chevreau E., Godard N., Arnaud Y., Duran M., Dereuddrem J. (1996), "Cryopreservation of cold-acclimated shoot tips of pear *in vitro* cultures after encapsulated-dehydration", *Cryobiology*, 29, 691-700.

Scowcroft W. R. (1984), "Genetic Variability in Tissue Culture: Impact on Germplasm Conservation and Utilisation, International Board for Plant Genetic Resources", Report (AGPG: IBPGR/84/152), Rome.

Shatnawi M. A., Engelmann F., Frattarelli A., Damiano C. (1999), "Cryopreservation of apices *in vitro* plantlets of almond (*Prunus dulcis* Mill.)", *CryoLetters*, 20, 13-20.

Sherlock G., Block W., Benson E. E. (2005), "Thermal analysis of the plant encapsulation-dehydration cryopreservation protocol using silica gel as the desiccant", *CryoLetters*, 26, 45-54.

Shetty K., Carpenter T. L., Curtis O. F., Potter T. L. (1996), "Reduction of hyperhydricity in tissue cultures of oregano (*Origanum vulgare*) by extracellular polysaccharide isolated from *Pseudomonas* spp.", *Plant Science*, 120, 175–183.

Shibli R. A., Al-Juboory K. H., (2000), "Cryopreservation of 'Nabali' olive (*Olea europea*) using encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification". *CryoLetters*, 21, 357-366.

Shibli R. A., Smith M. A. L., Spomer L. A. (1992), "Osmotic adjustment and growth responses of three (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) cultivars to osmotic stress induced *in vitro*", *Journal of Plant Nutrition*, 15, 1373-1381.

Shibli R. A., Shatnawi M. A., Ajlouni M. M., Jaradat A., Adham Y. (1999), "Slow growth *in vitro* conservation of bitter almond (*Amygdalus communis* L.)", *Advances in Horticultural Science*, 13, 133-134.

Shibli R. A., Abu-Ein A., Al-Juboory K. H. (2000), "Influence of different growth regulators on *in vitro* shoot multiplication and rooting of 'Nabali' olive (*Olea europea*)", *Plant Tissue Culture*, 10, 93-102.

Shibli R. A., Haagenson D. M., Cunningham S. M. (2001), "Cryopreservation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cells by encapsulation-dehydration", *Plant Cell Report*, 20, 445-450.

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

Shibli R. A. (1991), "In vitro acclimatization of (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) after *in vitro* water stress", *Plant Tissue Culture*, 1, 97-100.

Shibli R. A. (2000), "Cryopreservation of black iris (*Iris nigricans*) somatic embryos by encapsulation-dehydration", *CryoLetters*, 21, 39-46.

Shirasu K., Schulman A. H., Lahaye T., Schulze-Lefert P. (2000), "A contiguous 66 kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion", *Genome Research*, 10, 908-915.

Slater R., Russ K., Blake J. H. (2007), "Home and Garden Information Center 1081", *Clemson University*.

Smýkal P., Hýbl M., Corander J., Jarkovský J., Flavell A. J., Griga M. (2008), "Genetic diversity and population structure of pea (*Pisum sativum* L.) varieties derived from combined retrotransposon, microsatellite and morphological marker analysis", *Theoretical and Applied Genetics*, 117, 413-424.

Smýkal P., Kalendar R., Ford R., Macas J., Griga M. (2009), "Evolutionary conserved subfamily of Copia-Angela retrotransposons as a genome-wide microsatellite repeat dispersal agent", *Heredity*, 103, 157-167.

Smýkal P., Bačová N., Kalendar R., Corander J., Schulman A., Pavelek M. (2011), "Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) germplasm assessed by retrotransposon-based markers", *Theoretical and Applied Genetics*, 122, 1385-1397.

Solov'eva A. I., Dolgikh Y. I., Vysotskaya O. N., Popov A. S. (2011), "Pattern of ISSR and REMAP DNA markers after cryogenic preservation of spring wheat calli by dehydration method", *Russian Journal Plant Physiology*, 58, 423-430.

Suoniemi A., Tanskanen J., Schulman A. H. (1998), "Gypsy-like retrotransposons are widespread in the plant kingdom", *The Plant Journal*, 13, 699-705.

Suzerer V., (2013), "Mikroaşılanan ve Mikroçoğaltılan Ticari Öneme Sahip Badem [*Prunus Dulcis* (Mill) D.A. Webb] Çeşitlerine Ait Klonların Genetik Kararlılıklarının Moleküler Belirteçler ile İncelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.

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.

Swan T. W., O'Hare D., Gill R. A., Lynch P. T. (1999), "Influence of preculture conditions on the post-thaw recovery of suspension culture of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.)", *CryoLetters*, 20, 325-336.

Tahtamouni R. W., Shibli R. A. (1999), "Preservation at low temperature and cryopreservation in wild pear (*Pyrus syriaca*)", *Advances in Horticultural Science*, 13, 156-160.

Tahtamouni R. W., Shibli R. A., Ajlouni M. M. (2001), "Growth responses and physiological disorders in wild pear (*Pyrus syriaca* Boiss) during slow-growth *in vitro* preservation on osmostressing media", *Plant Tissue Culture*, 11, 15-23.

Tanaka D., Niino T., Isuzugawa K., Hikage T., Uemura M. (2004), "Cryopreservation of shoot apices of *in vitro* grown gentian plants: comparison of vitrification and encapsulation-vitrification protocols", *CryoLetters*, 25, 167-176.

Tanhuanpää P., Kalendar R., Laurila J., Schulman A. H., Manninen O., Kiviharju E. (2006), "Generation of SNP markers for short straw in oat (*Avena sativa* L.)", *Genome*, 49, 282-287.

Tanhuanpää P., Kalendar R., Schulman A. H., Kiviharju E. (2007), "A major gene for grain cadmium accumulation in oat (*Avena sativa* L.)", *Genome*, 50, 588-594.

Tanhuanpää P., Kalendar R., Schulman A. H., Kiviharju E. (2008), "The first double haploid linkage map for cultivated oat", *Genome*, 51, 560-569.

- Teo C. H., Tan S. H., Ho C. L., Faridah Q. Z., Othman Y. R., Heslop-Harrison J. S., Kalendar R., Schulman A. H. (2005), "Genome constitution and classification using retrotransposon-based markers in the orphan crop banana", *Journal of Plant Biology*, 48, 96-105.
- Thorpe T. (2007), "History of Plant Tissue Culture", *Molecular Biotechnology*, 37, 169-180.
- Touchell D. H., Dixon K. W. (1994), "Cryopreservation for seedbanking of Australian species", *Annals of Botany*, 74, 541-546.
- Towill L. E. (2002), "Cryopreservation of plant germplasm II", *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 50, 3-21.
- Turner S., Krauss S. L., Bunn E., Senaratna T., Dixon K., Tan B. (2001), "Genetic fidelity and viability of *Anigozanthos viridis* following tissue culture, cold storage and cryopreservation", *Plant Science*, 161, 1099-1106.
- Vertucci C. W. (1989), "Effects of cooling rate on seeds exposed to liquid nitrogen temperatures", *Plant Physiology*, 90, 1478-1485.
- Vicient C. M., Kalendar R., Schulman A. H. (2001), "Envelope-class retrovirus-like elements are widespread, transcribed and spliced, and insertionally polymorphic in plants", *Genome Res.* 11: 2041-2049
- Villalobos V. M., Engelmann F. (1995), "*Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology", *World Journal of Microbiology and 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.
- von Aderkas P., Bonga J. M., (2000), "Influencing micropropagation and somatic embryogenesis by manipulation of phase change and culture environment. *Tree Physiology*, 20, 921-928.
- Voytas D. F., Cummings M. P., Konieczny A. K., Ausubel F. M., Rodermel S. R. (1992), "Copia -like retrotransposons are ubiquitous among plants", *Proceeding of the National Academy of Science*, 89, 7124-7128.
- Vujovic T., Sylvestre I., Ruzic D., Engelmann F. (2011), "Droplet-vitrification of apical shoot tips of *Rubus fruticosus* L. and *Prunus cerasifera* Ehrh.", *Scientia Horticulturae*, 130, 222-228.
- Vukich M., Schulman A. H., Giordani T., Natali L., Kalendar R., Cavallini A. (2009), "Genetic variability in sunflower and in the *Helianthus* genus as assessed by retrotransposon-based molecular markers", *Theoretical and Applied Genetics*, 19, 1027-1038.

Wessler S. R. (1996), "Turned on by stress. Plant retrotransposons", *Current Biology*, 8, 959-961.

Williams J. G. K., Kubelik A. R., Liva K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. (1990), "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers", *Nucleic Acid Research*, 18, 6531-6535.

Withers L. A., Engelmann F. (1998), "*In vitro* conservation of plant genetic resources", *Agriculture Biotechnology*, New York, pp, 57-87.

Withers L. A. (1991), "*In vitro* conservation", *Biological Journal of the Linnean Society*, 43, 31-42

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.

Yang X. J., Tang D. Q., Wang X. H., Pan G. H. (2004), "Characters of greening tree species in heavy metal pollution protection in Shanghai", *Chinese Journal of Applied Ecology*, 154, 687-690.

Yoon J. W., Kim H. H., Ko H. C., Hwang H. S., Hong E. S., Cho E. G., Engelmann F. (2006), "Cryopreservation of cultivated and wild potato varieties by droplet vitrification: effect of subculture of mother-plants and of preculture of shoot tips. *CryoLetters*, 27, 211-222.

Zarghami R., Pirseyedi M., Hasrak S., Sardrood B. P. (2008), "Evaluation of genetic stability cryopreserved *Solanum tuberosum*", *African Journal of Biotechnology*, 7, 2798-2802.

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.

Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. (1994), "Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification", *Genomics*, 20, 176-183

Zimmermann U. (1978), "Physics of turgor and osmo- regulation", *Annual Review of Plant Physiology*, 29, 121-148.

ÖZGEÇMİŞ

Muhammed Hamit EKİNCİ, 26 Ağustos 1987’de Diyarbakırda doğdu. 2005 yılında Zonguldak Karaelmas (Bülent Ecevit) Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitime başladı. Lisans eğitimini 2010 yılında tamamladıktan sonra 2011 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime başladı. Halen yüksek lisans eğitime devam eden Muhammed Hamit EKİNCİ, 2013 güz dönemi itibariyle doktora eğitimi için Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden kabul almıştır.