

**BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ İLE ÜRETİLEN DOĞAL TETRAPLOİD
TRIFOLIUM PRATENSE L. REJENERANTLARI ARASINDAKİ SOMAKLONAL
VARYASYONUN BELİRLENMESİ**

Yeşim KORKMAZ

**Bülent Ecevit Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalında
Yüksek Lisans Tezi
Olarak Hazırlanmıştır.**

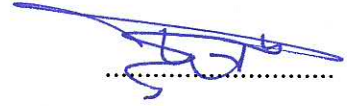
ZONGULDAK

Temmuz 2013

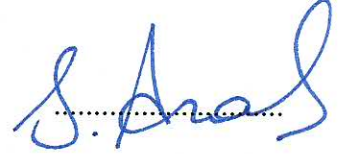
KABUL:

Yeşim KORKMAZ tarafından hazırlanan "BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ İLE ÜRETİLEN DOĞAL TETRAPLOİD *TRIFOLIUM PRATENSE* L. REJENERANTLARI ARASINDAKİ SOMAKLONAL VARYASYONUN BELİRLENMESİ" başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek, Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir.
08/07/2013


Başkan: Doç. Dr. Hatice ÇÖLGEÇEN (BEÜ)



Üye : Prof. Dr. E. Sümer ARAS (AÜ)



Üye : Prof. Dr. Güray UYAR (BEÜ)



ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım./..../2013



Prof. Dr. Özden ÖZEL GÜVEN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”



Yeşim KORKMAZ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ İLE ÜRETİLEN DOĞAL TETRAPLOİD *TRIFOLIUM PRATENSE* L. REJENERANTLARI ARASINDAKİ SOMAKLONAL VARYASYONUN BELİRLENMESİ

Yeşim KORKMAZ

Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hatice ÇÖLGEÇEN

Temmuz 2013, 57 sayfa

Avrupa ve Kuzey Amerika’da yaygın olarak tarımı yapılan çayır üçgülü *Trifolium pratense* L., doğal olarak Güneydoğu Avrupa ve Anadolu’da bulunmaktadır. Anadolu’da büyük bir form zenginliği gösteren *T. pratense* ’nin anavatanı Anadolu olarak kabul edilmektedir (Taylor and Smith 1979). Erzurum ilinin Tortum yöresinde Elçi (1982) tarafından bulunan *Trifolium pratense* doğal tetraploittir. Hücre veya dokulardan rejenera olan tüm bitkilerin ebeveyn bitki ile aynı özellikte olması beklenirken, bitki rejenerasyon süreci hücrelerin genetik stabiliteilerinin bozulması ve genetik varyasyon oluşumu için bir etkidir. Kültüre alınan hücrelerde kendiliğinden ortaya çıkan genetik varyasyon somaklonal varyasyondur. Çalışmada hormonsuz MS ortamında çimlendirilen aseptik fidelerin apikal meristemleri, 1 mg/l NAA ve 3 mg/l BAP içeren PC-L2 ortamına ekilerek rejenerasyon gerçekleştirilmiştir. Bu tezde somaklonal varyasyonun belirlenmesi için Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) tekniği kullanılmıştır. Kullanılan 8 farklı primerin hepsi polimorfizm göstermiştir.

ÖZET (devam ediyor)

En düşük polimorfizm oranı (%17,07) 2 numaralı klon ve donör arasında (D₂-C₂) görülürken, en yüksek polimorfizm oranı (%60,21) 4 numaralı klon ve donör arasında (D₄-C₄) görülmektedir. Donörler arasındaki en fazla varyasyon farkı D₂ (toplam 123 bant) ile D₆ (toplam 86 bant) arasında görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Doğal tetraploid *Trifolium pratense*, Bitki rejenerasyonu, Somaklonal varyasyon.

Bilim Kodu: 401.03.00

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

ANALYSIS OF SOMACLONAL VARIATION BETWEEN NATURAL TETRAPLOID *TRIFOLIUM PRATENSE* L. REGENERANTS WHICH ARE PRODUCING PLANT TISSUE CULTURE TECHNIQUES

Yeşim KORKMAZ

Bülent Ecevit University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Hatice ÇÖLGEÇEN

July 2013, 57 pages

Trifolium pratense L., is an agricultural legume which is common in Europe and North America and grown in inherently southeast Europe and Anatolia. Plant shows great diversity in Anatolia. Thus, Anatolia was accepted as a center of origin of *T. pratense* (Taylor and Smith 1979). *T. pratense* collected by Elci (1982) from Tortum vicinity of Erzurum province was determined as a natural tetraploid. It has been assumed that all the plants regenerate from cells or tissues that are identical with the motherplant. Although plant regeneration process is a factor that exchanges the genetic stability and genetic variation, in the culture genetic diversity is called somaclonal variation. In the study, regeneration completed with apical meristems of aseptical plants germinated on hormone-free MS medium, translated on PC-L2 medium containing 1 mg/l NAA and 3 mg/l BAP. In this thesis Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) techniques were used to detect somaclonal variation. 8 different primers were used. All of primers showed polymorphism. The lowest polymorphism range has seen between number 2 clone and donor with % 17,07 (D₂-C₂), the highest polymorphism

ABSTRACT (continued)

has seen between number 4 clone and donor with % 60,21 (D₄-C₄) . The highest variation difference has seen between D2 (total 123 bands) and D6 (total 86 bands) donors.

Keywords: Natural tetraploid *Trifolium pratense*, Plant regeneration, Somaclonal variation.

Science Code: 401.03.00

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım boyunca destek ve ilgisini esirgemeyen, tez konumun belirlenmesinde ve tez çalışmalarımnda hep yanımda olan değerli hocam Doç. Dr. Hatice ÇÖLGEÇEN'e çok teşekkür ederim.

Değerli hocam Prof. Dr. E. Sümer ARAS'a göstermiş olduğu ilgi ve yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Tezim, 2012-10-06-14 No'lu proje ile desteklenmiş olup, katkılarından dolayı Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (B.A.P)'ne teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Biyolog Ersin ALTUNKAYNAK, Biyolog Havva ATAR ve Yüksek Biyolog Yasin HAZER'e teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca desteklerini hiç esirgemeyen annem Şaziye KORKMAZ, babam A. Cemil KORKMAZ ve biricik kardeşim Yaşar KORKMAZ'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
BÖLÜM 1 GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2 KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 <i>Trifolium pratense</i> L. HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....	3
2.2 <i>Trifolium pratense</i> L.'DE DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI	5
2.3 SOMAKLONAL VARYASYON İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	7
2.4 <i>Trifolium pratense</i> L.'DE MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR.....	12
BÖLÜM 3 KURAMSAL BİLGİLER.....	15
3.1 BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ	15
3.1.1 Besin Ortamları.....	16
3.1.1.1 Makro Elementler	16
3.1.1.2 Mikro Elementler	17
3.1.1.3 Vitaminler	17
3.1.1.4 Şekerler	17
3.1.1.5 Jel Yapıcı Maddeler	17

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
3.1.1.6 Bitki Büyüme Düzenleyicileri	17
3.2 SOMAKLONAL VARYASYON	18
3.2.1 Doku Kültürü Tekniklerinin Varyasyona Etkileri	19
3.2.2 Somaklonal Varyasyonun Nedenleri	19
3.2.2.1 Hücre Organizasyonunun Varyasyonda Etkisi	19
3.2.2.2 Doku Kaynağındaki Varyasyon	19
3.2.2.3 DNA Metilasyonu	20
3.2.2.4 Nükleik Asit Öncüllerinin Kaybı	20
3.2.2.5 <i>In vitro</i> Hücre Bölünmesindeki Anormallikler	20
3.2.2.6 Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Etkisi	21
3.2.2.7 Kültür Süresi	21
3.2.2.8 Kromozomlardaki Sayısal ve Yapısal Değişiklikler	21
3.2.2.9 Gen Seviyesindeki Değişiklikler.....	21
3.3 MOLEKÜLER BELİRTEÇLER.....	22
3.3.1 Morfolojik Belirteçler	22
3.3.2 Protein Belirteçler	23
3.3.3 DNA Belirteçleri.....	23
3.3.3.1 Hibridizasyona Dayalı DNA Belirteçleri	23
3.3.3.1.1 RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Farklılığı)	23
3.3.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonuna Dayalı DNA Belirteçleri.....	24
3.3.3.2.1 AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Farklılığı)	24
3.3.3.2.2 RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)	25
3.3.3.2.3 SSR (Simple Sequence Repeat-Basit Dizi Tekrarları).....	26
3.3.3.2.4 SCAR (Dizi Karakterli Çoğaltılmış Bölge).....	26
BÖLÜM 4 MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
4.1 MATERYAL	27
4.2 YÖNTEM	28
4.2.1 Tohum Sterilizasyonu	28
4.2.2 Tohum Çimlendirme ve Rejenerasyon İçin Kullanılan Ortamlar.....	28

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
4.2.2.1 MS Ortamının Hazırlanması	29
4.2.2.2 PC-L2 Ortamının Hazırlanması	30
4.2.3 Genomik DNA İzolasyonu	32
4.2.4 RAPD Uygulamaları.....	34
4.2.4.1 RAPD Bileşenleri ve Koşulları	35
4.2.4.2 Agaroz Jel Elektroforezi ve Fotoğraflama	36
4.3 İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	36
4.3.1 Somaklonal Varyasyonun GKS ile Değerlendirilmesi	36
BÖLÜM 5 ARAŞTIRMA BULGULARI.....	37
5.1 RAPD SONUÇLARI.....	37
BÖLÜM 6 TARTIŞMA VE SONUÇ	47
KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
4.1 Deneme serasındaki doğal tetraploid <i>Trifolium pratense</i> L.'lerin genel görünüşü.....	27
4.2 Aseptik fidelerden rejenere bitkilerin üretimi	28
5.1 OPC 01 primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (M: markör, N: negatif)	42
5.2 OPC 02 primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (M: markör, N: negatif)	42
5.3 OPC 05 primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (M: markör, N: negatif)	43
5.4 OPC 06 primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (M: markör, N: negatif)	43
5.5 OPC 08 primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (M: markör, N: negatif)	44
5.6 OPC 09 primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (M: markör, N: negatif)	44
5.7 OPO 07 primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (M: markör, N: negatif)	45
5.8 Tube A08 primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (M: markör, N: negatif)	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>		<u>Sayfa</u>
2.1	<i>T. pratense</i> L. Sistematikteki Yeri	4
4.1	MS ortamında kullanılan stok çözeltiler	29
4.2	PC-L2 ortamında kullanılan stok çözeltiler	31
4.3	Nanodrop Sonuçları.....	34
4.4	Kullanılan primerler ve dizi bilgileri.....	35
5.1	Donör ve Klonlar arasındaki bant değişimleri.	38
5.2	Tüm primerler için GKS değerleri.	39

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- AFLP : oğaltılmış Parça Uzunluk Farklılığı (Amplified Fragment Length Polymorphism)
- BAP : 6-Benzilaminopürin
- CTAB : Setil Trimetil Amonyum Bromid
- DNA : Deoksiriboribonükleik Asit
- dNTP : Deoksiribonükleosid trifosfat
- EDTA : Etilen Diamin Tetraasetik Asit
- EtBr : Etidyumbromid
- GKS : Genomik Kalıp Stabilitesi
- MS : Murashige-Skoog (1962)
- NAA : Naftalenasetik Asit
- PC-L2 : Phillips-Collins (1979)
- PVVP : Polivinil poliprolidon
- PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- RAPD : Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA)
- RFLP : Restriksiyon Parça Uzunluk Farklılığı (Restriction Fragment Length Polymorphism)
- SCAR : Dizi Karakterli oğaltılmış Bölge (Sequence Characterized Amplified Region)
- SSR : Basit Dizi Tekrarları (Simple Sequence Repeat)
- Taq : *Thermus aquaticus*
- TBE : Tris Borat EDTA
- TE : Tris EDTA

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Bitki biyoteknolojisi bitki organ, doku ve hücrelerin steril ve yapay besi ortamlarında kültüre alınmasını, bunların çoğaltılmasını ve genetik olarak değiştirilmesini kapsamaktadır. Bu teknolojinin bitkilere uygulanmasındaki amaç; bitki üretiminde bilinen klasik yöntemlerle çözümü güç olan, çözümü mümkün olmayan veya çok uzun zaman alan problemlerin çözümüne olanak sağlayarak kalite ve miktar yönünden yüksek ürün elde etmektir.

Bitki biyoteknolojisi bitkilerin verim ve kalitesini artırmak, hastalık ve stres faktörlerini engellemek, azaltmak ya da ortadan kaldırmak için moleküler, hücre ve doku kültürü temelli teknolojilerin kullanıldığı bir süreçtir.

In vitro kültür sırasında ortaya çıkan ve rejenere olan bitkilerde gözlenen değişiklikler somaklonal varyasyon olarak adlandırılmaktadır. *In vitro* kültürde rejenere olan bitkilerin genetik yapılarındaki değişiklik nedeniyle ortaya çıkan varyasyon kalıtsaldır ve bu değişiklikler dölden döle aktarılır. *In vitro* kültürde bitkinin genetik yapısında ortaya çıkan değişiklikler; kromozom sayısı, yapısındaki değişiklikler ve gen mutasyonları şeklinde ortaya çıkar. Bitki biyoteknolojisi çalışmalarında yaygın olarak kullanılan metot polimeraz zincir reaksiyonudur (PZR). *In vitro* koşullarda DNA polimeraz enzimi tarafından primerler kullanılarak DNA (deoksiribonükleik asit)'nin çoğaltılmasını kapsar. Kısa süre içinde çok küçük miktar DNA baz dizisinden milyonlarca defa DNA parçacığı çoğaltmak mümkündür. Tekniğin en önemli özellikleri; güvenilir, hızlı ve spesifik olmasıdır. PZR, ilk bulunduğu 1985 yılından itibaren hızlı bir gelişme göstermiş olup, günümüzde bitki biyoteknolojisinin her alanında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Mullis *et al.* 1986).

Vücutta östrojen eksikliği; kemik yoğunluğunun azalması, sıcak basması, terleme, huzursuzluk, el ve ayaklarda karıncalanma, uykusuzluk, baş ağrısı, sinirlilik hali, kas ve eklem ağrıları gibi tipik belirtilere yol açar. Fonksiyonel olarak memeli östrojenini taklit eden,

östrojen benzeri biyolojik aktivitelere sahip olan fitoöstrojenler, menopozal şikayetleri gidermek üzere yaygın olarak kullanılmaktadır. Fitoöstrojenlerin kanser, kalp hastalıkları ve osteoporozun önlenmesinde etkili oldukları bildirilmiştir. *T. pratense* östrojenik etkiden sorumlu izoflavonoidler bakımından oldukça zengindir (Çölgeçen vd. 2011).

Çiçeklenme döneminde sürülüp toprağa gömülen baklagillerden yem bitkileri köklerinde havanın serbest azotunu tespit ederek toprağı azot bakımından zenginleştirir. Yeşil gübre olarak kullanılan yem bitkileri topraktaki organik madde miktarını artırır ve erozyon ile oluşan toprak kaybını azaltır (Elçi 2005).

Doğal tetraploid *T. pratense* L.'nin tohum tutma sorunu bulunmakta, bu da bitkide üreme problemine neden olmaktadır. Bu problemin nedenleri embriyolojik çalışmaları ile gösterilmiş olup, (Algan ve Büyükkartal 1999) üreme probleminin çözümü için rejenerasyon alternatif bir yol olarak görülmüştür (Çölgeçen ve Toker 2008).

Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L.'nin *in vitro* rejenerasyonu ile üretilen rejenerant bitkiler ile donör bitkiler arasındaki somaklonal varyasyonun RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) tekniği ile belirlenmesi tezin amacını oluşturmaktadır.

BÖLÜM 2

KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *Trifolium pratense* L. HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Ülkemiz florasında *Trifolium* cinsi 96 tür, 4 alttür ve 39 varyete ile temsil edilmektedir. Anadolu'da büyük bir form zenginliği gösteren *Trifolium. pratense* 'nin üç varyetesi bulunur ve bunlar diploiddir. *T. pratense* çok yıllık, 20-60 cm gövde uzunluğuna sahip otsu bir bitkidir. Korolla alacalı mor renkte, çiçekler kömeç (kapitatus) halinde ve terminal durumludur (Davis 1970). Meyveler çok küçük olup, içerisinde birden fazla tohum bulunur. Bitkide çok yıllık ve 20-60 cm ye ulaşan gövde uzunluğu görülür. Stipullar ovat-lanseolat, yaprakçıklar 1,5-3,0 cm abovattan geniş eliptiğe, 0,7-2,2 cm genişliğinde, sapsız veya nadiren saplı, genellikle indirgenmiş yaprakların stipulları vardır. Kaliks tüpsü-kampanulat, 10-damarlı, nadiren tüsüzdür. Çiçeklenmeleri 5. ve 9. ay arasında gerçekleşir. Normal olarak diploid bir bitki olan *T. pratense*'nin kromozom sayısı $2n=14$ tür. Fabaceae (Leguminosae) familyasına ait olan doğal tetraploid *Trifolium pratense* L. (çayırüçgülü) ($2n=4x=28$) ülkemizde doğal olarak yetişebilen, tetraploid bitki özellikleri ve yüksek protein içeriğine sahip, ekonomik değeri yüksek olan bir yem bitkisidir. Kuzey Yarımkürenin ılıman bölgelerinde, tropiklerdeki dağlara kadar geniş bir alanda yayılış gösterir. Avrupa ve Kuzey Amerika'da yaygın olarak tarımı yapılan *T. pratense* doğal olarak Güneydoğu Avrupa ve Anadolu'da bulunur (Elçi 1982). Elçi (1982) tarafından Erzurum'un Tortum yöresinden toplanan ve kültüre alınan *T. pratense* var. *pratense* L. ise doğal tetraploiddir. Tetraploid formlar, diploid formlara göre daha üstün özelliklere sahiptir. Diploid form, 3-4 yıl yaşarken, doğal tetraploid *T. pratense* tarlada 7 yıla kadar yaşayabilmektedir. Doğal tetraploid çayır üçgülünde çiçekler daha büyüktür.

Çizelge 2.1 *T. pratense* L. sistematikteki yeri (Davis 1970).

Kingdom: Plantae
Subkingdom: Tracheobionta
Division: Magnoliophyta
Class: Magnoliopsida
Subclass: Rosidae
Family: Fabaceae
Genus: <i>Trifolium</i>
Species: <i>Trifolium pratense</i>
Taxon: <i>Trifolium pratense</i> var. <i>pratense</i>

Tür Tayin Anahtarı:

1. Gövde genellikle 20-40 cm, yoğun tüylü; yaprakçıklar 1,5-3,0 cm var. ***pratense***
1. Gövde 40-70 nadiren 100 cm, belirgin tüylü veya tüsüz; yaprakçıklar 3-5 cm
 2. Gövde tüylü; korolla koyu kırmızı var. ***americanum***
 2. Gövde tüsüz; korolla genellikle pembe var. ***sativum***

2.2 *Trifolium pratense* L.'DE DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

Phillips and Collins (1979), çalışmalarında diploid *T. pratense*'nin 5 çeşidi üzerinde çalışmalar yapmışlardır ve *in vitro* doku kültürü çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Çayır üçgülü için genel bir kallus kültürü kurmak için uygun bir ortam (PC-L2) oluşturmuşlardır. Bu yeni ortamı sıvı kültür ortamına çevirerek hücre bölünme hızını artıran hücre süspansiyon kültürlerini kurmuşlardır. Kallus kültürleri organogeneze teşvik edilmiş ve bu beş çeşitte kallusta bitki rejenerasyonu gerçekleştirilmiştir. Hipokotil, epikotil, kotiledon, ilk yaprak ve apikal meristem eksplantlarında kallus oluşturmak amacıyla SH, GB5, MS ve PC-L2 ortamlarını kullanmışlar, en iyi ortamın PC-L2 olduğunu göstermişlerdir.

Wang and Hall (1988), $2n=2x=14$ kromozom sayılı *Trifolium pratense* Altaswede ve $2n=4x=28$ kromozom sayılı *Trifolium. pratense* Norseman çeşitlerini somaklonal varyasyon ve bitki rejenerasyonu bakımından incelemişler ve doku kültürü çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Organogenezis yoluyla bitki rejenerasyonunu sağlamak amacıyla çok sayıda sürgün oluşturarak rejenerasyon işlemini tamamlamışlardır.

Maclean and Nowak (1989), diploid *T. pratense* fidelerinin hipokotillerinden rejenerasyon yeteneği olduğunu bildirmişlerdir. Kallus elde etmek için kullanılan petiyol eksplantlarından bitkilerin oluşumu yalnızca F49 klonunda başarıya ulaşmıştır. Kallustan bitki oluşturma yeteneğinde epikotil eksplantlarının başarısız olduğunu bildirmişlerdir. En iyi ortamların kallus oluşumu için B5C, bitkicik oluşumu için SPL olduğunu göstermişlerdir.

Cebat (1990), diploid üçgülde sürgün ucu, kotiledon ve hipokotilleri eksplant olarak kullanmış ve *in vitro* organogenezis gerçekleştirmiştir. *T. pratense*'nin çiçek tomurcuklarından mikro üretimi başarmışlardır. Vejetatif çoğaltımı çiçek tomurcuğu kullanarak gerçekleştirmişlerdir.

Radionenko (1994), $2n=14$ kromozom sayılı *T. pratense* türünde direkt somatik embriyogenez çalışmalarını tamamlamış olup, protoplastlardan rejenerasyon işlemleri gerçekleştirmiştir. İlk embriyoidler kırmızı üçgül mezofil hücrelerinden izole edilen protoplastlardan elde edilmiştir. Protoplastlar 3,5-4,0 ml Kao ve Michayluk (KM8p) ortamında süspansiyon edilmiştir. 8 ila 10 gün içerisinde protoplastlar gözlenmiş olup süspansiyona 1ml taze ortam eklenmiştir. 1 aydan sonra embriyoidler sıvı hormonsuz MS ortamına transfer edilmiştir. Deneyde 0,5 mg/l 2,4-D

ve 0,5 mg/l Kinetin kullanılmıştır. Bu çalışma protoplastlardan rejenerasyon işleminin gerçekleşebileceğini göstermiştir.

Algan ve Büyükkartal (1999), doğal tetraploid *T. pratense* L'nin tohum tutma sorununu yaptıkları embriyolojik çalışmalar ile göstermişlerdir. Doğal tetraploid çayırüçgülü E2 çeşidinde apomiktik gelişmenin tohum oluşumu üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak *Taraxacum* tipi ve *Ixeris* tipi gelişmeye benzer bazı gelişme evreleri elde edilmiştir. Embriyo kesesinin aposporik olarak meydana gelmediği diplosporik olarak gelişebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Çölgeçen (2005), doğal tetraploid *T. pratense*'de indirekt organogenezis gerçekleştirmiş ve doku kültürü ortamı olarak MS ve PC-L2 ortamlarında BAP ve NAA hormonlarının farklı konsantrasyonlarını kullanmıştır. Eksplant kaynağı olarak ilk yaprak, epikotil, kotiledon, apikal meristem ve hipokotil kullanmıştır. Çalışmada kallus ve sürgün oluşumunda en iyi eksplantın apikal meristem olduğunu göstermiştir.

2.3 SOMAKLONAL VARYASYON İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Larkin and Scowcroft (1981), somatik hücrelerden herhangi bir doku kültürü tekniği ile elde edilen bitkileri somaklon olarak adlandırmışlardır. Protoplasttan gelişen bitkilerdeki varyasyonu protoklonal varyasyon, anter kültüründen elde edilen bitkilerde gözlenen varyasyonu gametoklonal varyasyon olarak tanımlamışlardır. Genel olarak hepsi için somaklonal varyasyon terimi kullanmışlardır. Bu nedenle somaklonal varyasyonu doku kültürlerinde ortaya çıkan kalıtsal değişiklik olarak tanımlamışlardır. Somaklonal varyasyonu ilk olarak şeker kamışı bitkisinde yüksek frekanslı genetik değişimler olarak gözlemlenmişler ve yapmış oldukları morfolojik, sitogenetik ve izozim çalışmalarıyla varyasyonu göstermişlerdir.

Williams and arkadaşları (1990), tarafından Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA basit, kısa primerler kullanılarak genomik DNA'nın tesadüfi olarak dağılmış parçalarla amplifikasyonu olarak tanımlanmıştır. Elde edilen çoğaltma ürünü radyoaktif olmayan jel elektroforezinde yürütülür ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenmiştir. Sonuçların değerlendirilmesi bantların varlığı ya da yokluğuyla belirlenmiştir. Genetik polimorfizmi belirleyen yeni bir kaynak olarak görülmüştür. PZR metoduna dayanan bu teknikte, reaksiyonun gerçekleşmesi için araştırılan genomun baz dizilimi hakkında herhangi bir ön bilgiye ihtiyaç duyulmamaktadır.

Soniya et al. (2001) domates bitkisinde RAPD yöntemi kullanarak genetik kararlılığı belirlemişlerdir. Domates bitkilerini 8.88 μM BA and 4.13 μM pikloram içeren MS kültür ortamına kültüre almışlardır. Rejenerasyon 17.7 μM BA içeren MS ortamında gerçekleşmiştir. Ana bitkiden ve 11 tane rastgele seçilmiş rejenerant bitkiden alınan örnekler RAPD analizine maruz bırakılmıştır. Altı primer polimorfik ürünler üretmiştir. Bu denemelerde ebeveyne ait olmayan bant gözlenmiştir. Bunlardan üçü paylaşılmış, on ikisi tektir. RAPD yöntemi ile anlaşılan genetik benzerlik sayesinde on rejenerant bitkinin ana bitkiye benzerliği %95' den daha fazla olduğu görülmüştür.

Polanco and Ruiz (2002) *Arabidopsis thaliana* bitkisinin köklerinden organogenez ile rejenerant edilmiş bitkiler arasındaki DNA varyasyonlarını değerlendirmek için AFLP analizi yapmışlardır. 51 tane rejenerant bitki 12 primer kullanılarak AFLP analizi gerçekleştirilmiştir. Bitkiler 5 farklı fideciktan alınan kök eksplantlarından elde edilmiştir. Aynı eksplanttan elde

edilen rejenerant bitkiler ile karşılaştırıldığında, çalışılan bitkilerden en az biri % 66,6 varyasyon göstermiştir. Rejenere edilmiş bitkiler arasındaki varyasyon dağılımı düzenli değildir ve sadece üç rejenere bitkide % 40 varyasyon gözlenmiştir. Toplam 778 markör dışında üç AFLP markörü farklı kalluslardan elde edilen çeşitli bitkiler için polimorfiktir. Bu markörler *Arabidopsis* genomunun en yüksek varyasyon bölgelerini göstermiştir. Rejenere bitkilerin her grubu için tahmin edilen nükleotid dağılım değerleri *A. thaliana* ekotipleri için tanımlanmış doğal varyasyondan daha küçüktür.

Fras and Maluszynska (2003) *Arabidopsis thaliana* bitkisinin diploid ve tetraploid eksplantlarını aynı durumlar altında aynı *in vitro* kültür ortamına kültüre almışlardır. Rejenerantların poliploidi seviyeleri ve rejenerasyon kapasitesi sekiz kallus ırkında incelenmiştir. *In vitro* lar için eksplant cevapları donör bitkilerin poliploidi seviyesi ve eksplant tipine bağlıdır. Tetraploid bitkilerin yaprak kallusları en yüksek rejenerasyon yeteneği göstermiştir. Somatik embriyolar tetraploid bitkilerden oluşturulmuş kalluslarda daha sık gözlenmiştir. Rejenerant bitkiler diploid, triploid ve tetraploittir. Diploid bitkilerden rejenere edilmiş kalluslar diploittir, fakat tetraploid bitkilerden elde edilen rejenerantlar arasında diploid kalluslar görülmüştür.

Hossain et al. (2003) rejenere *Capsicum annuum*'da morfolojik ve genetik varyasyonu incelemişlerdir. Rejenerasyonda eksplant kaynağı olarak kotiledonları kullanmışlardır. Rejenerasyon ortamı olarak 5 mg/l BA (benziladenin) içeren MS ortamı kullanmışlardır. Köklendirme çalışmaları 0,1 mg/l NAA ve 0,05 mg/l IBA (indol-3 bütirik asit) içeren ortamlarda gerçekleştirilmiştir. DNA ekstraksiyonu modifiye CTAB (Konisho *et al.* 2000) metoduyla yapılmıştır. Morfolojik karakter olarak gövde, korolla, anter, filament, stigma kullanılmış olup, renklerdeki farklılıklar fenotipik varyasyonlara sebep olmuştur. Kullanılan 80 primerden yalnızca OPA-18, OPB-18 ve OPC-02 primerleri bant oluşturmuş ve polimorfizm yüzdesi % 1,3 ile % 3,8 arasında değişkenlik göstermiştir.

Chen and Yamaguchi (2005) türler arası düzeyde çay germplazmlarını ayırt etmek için RAPD markörlerini kullanmışlardır. 20 yabancı tür ve onlarla akraba varyeteler (*Camellia sinensis*, *C. sinensis* var. *assamica*, *C. sinensis* var. *pubilimba*, *C. sinensis* var. *kucha*) ile dört çay türü, türler arası düzeyde çay germplazmlarının ayrımı için Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Markörlerini kullanarak (RAPD) incelemişlerdir. RAPD amplifikasyonlarına göre ayrılan 61 tane içinden, 15 primer seçmişlerdir. Türler arası düzeyde RAPD primerlerinin ortalama

polimorfik DNA frekansları 0.16'dan 0.60'a kadar değişmekte olup 0.30 ile tür içindekinden daha düşük bulunmuştur. OPO-13, OPO-18, OPG-12 ve OPA-13 yoluyla üretilen spesifik RAPD markerlerine dayalı, DNA parmak izi veya örnek bant kombinasyonu incelenen 24 germplazmın tamamını ayırmayı sağlamıştı. Bu nedenle, RAPD markerleri, türler arası düzeyde çay germplazmlarını ayırmak için güçlü birer araçtır.

Poncaloni and Camadro (2005) *Asparagus officinalis* bitkisinin uzun dönem kültüre alınmış kalluslarından organogenez ile elde ettikleri somaklonlar; bitki fenotipi, ploidi, mayotik davranış, polen yaşayabilirliği ve AFLP profili ile karakterize edilmiştir. Donörlerdeki fenotipik sapmalar yaprak rengi, çiçek büyüklüğü ve çiçek morfolojisi ile belirlenmiştir. Ploidi değişikliği 37 rejenerantın % 37.8'inde gözlenmiştir. Mayotik değişimler; gecikmeler, disentrik köprüler, çekirdek onarımını içerir. 408 AFLP markörü 43 rejenerant ve donörde görülmüştür, AFLP markörlerinin % 2.94'ü polimorfizm göstermiştir. Yüksek polen yaşayabilirliği 22 rejenerantta gözlenmiştir. Pistil oluşturmuş bitkiler ve 35 rejenerantın hepsi kontrol grubunda olduğu gibi meyve ve tohum üretebilmiştir, fakat normal tohumlar ile karşılaştırıldığında rejenerant tohumların % 35.3'ü dolgun tohum oluşturmamıştır, % 12.5'inin ise tohum çimlenmesi gerçekleşmemiştir.

Masoud and Hamta (2008) *Trifolium alexandrinum* L. bitkisini rejenere etmek için farklı doku kültür ortam ve farklı eksplant kaynağı kullanmışlardır. Petiyol ve internod eksplantlarından kallus üretilenmiştir. En iyi kallus büyümesi içeriğinde 2 mg/l NAA + 30 gr sakkaroz bulunan MS ortamında görülmüştür. İçerisinde 0,5 mg/l NAA + 0,5 mg/l KIN bulunan MS ortamlarındaki kalluslardan bitkiler üretilenmiştir. İçeriğinde 0,15 mg/l BAP+1 mg/l IAA bulunan kökler ise analiz için kullanılmıştır. Kromozom sayısı $2n=2x=16$ olan Berseem yoncasının karyotipik analizi ile 1 çift submetasentrik ve 7 çift metasentrik kromozoma sahip olduğu bulunmuştur. Kromozom büyüklüğü $2 \pm 0,62 \mu\text{m}$ - $3,66 \pm 0,18$ arasındadır. Doku kültürü ile rejenere edilmiş bitkilerin sitogenetik analizi $2n=16$ ve $2n=48$ arasında değişen farklı somatik kromozom sayıları olduğu görülmüştür.

Abu-Qaoud et al. (2010) *Petunia hybrida* 'da *in vitro* rejenerasyonu gerçekleştirmiş ve somaklonal varyasyonu değerlendirmiştir. Rejenerasyon ortamı olarak 3 farklı konsantrasyon 0,2 mg/l, 0,4 mg/l ve 0,8 mg/l BA ve 0,1 mg/l NAA kullanılmıştır. Yapraklar eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. En iyi rejenerasyon ortamı 0,8 mg/l BA içeren ortam olarak bildirilmiştir. Deneyde 60 bitkide yaprak morfolojisine bakılmış, 43 bitki orijinal ovat şeklini

korurken, 11 bitki orbikular yaprak ve 6 bitki eliptik yaprak varyasyonu göstermiştir. 40 bitkide çiçek rengi morfolojisi incelenmiş, 27 çiçek orijinal rengi olan pembeyi korurken, 8 çiçek koyu pembe, 3 çiçek viyola, 2 çiçek mor renkte gözlenmiştir.

Munir et al. (2011), yaptıkları çalışmada *Solanum tuberosum* var. *desiree* ' de Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA yöntemi ile somaklonal varyasyonu değerlendirmişlerdir. Kallus kültür koşulları farklı hormonal konsantrasyonlarda optimize etmişlerdir. Üç bitki büyüme düzenleyicisi, 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), 6-benzilaminopurin (BAP) ve zeatin farklı konsantrasyonlarda ve bileşimlerde kullanmışlardır. En yüksek kallus rejenerasyonu (%90) 2.5 mg/l 2,4-D konsantrasyonunda, en düşük büyüme ise 1.5 mg/l zeatin ve 1.0 mg/l BAP bileşiminde gözlemiştir. Kallus hücrelerinden patates bitkisinin rejenere edilmesinde en iyi sonuç 1.0 mg/l BAP ve 1.5 mg/l indol asetik asit eklenen Murashige ve Skoog temel besiyerinde elde etmişlerdir. *In vitro* kültürde farklı hormonal konsantrasyonlarda büyütülen kalluslardaki genetik varyasyonu, RAPD yöntemi ile değerlendirmişlerdir. On farklı dekamer oligonükleotid primeri, 111 tekrarlanabilir amplifiye ürün oluşturmuştur. Multivaryasyonun numerik taksonomi sistemi yazılımındaki Simqual alt-programı ile hesaplanan benzerlik katsayı değerlerini 0.419 ile 0.838 arasında bulmuşlardır. Küme analizi sonucu 5 örnek, iç ve dış olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır. Maksimum polimorfik bantlar, kallus kültürlerinde 1,5 mg/l zeatin ve 1,0 mg/l BAP bileşimi kullanımında gözlenmiştir. *In vitro* kültürde büyütülen kalluslardaki genetik varyasyonun değerlendirilmesinde, RAPD'nin etkili bir yöntem olduğunu göstermişlerdir.

Bouiamrine et al. (2012) üç buğday kültürvarından (Karim, Sebou ve Isly) rejenere edilmiş somaklonların morfolojik karakterleri ve farklı tarımsal özelliklerini değerlendirmişlerdir. Kalluslar 2,4-D (2 mg/l) içerikli modifiye edilmiş MS kültür ortamında olgunlaşmamış embriyodan başlatılmıştır. Rejenerasyon ortamı için bitki büyüme düzenleyicisi olarak BAP (10 µM) ve NAA (5 µM) kullanılmıştır. Gövde kallusları hormonsuz MS ortamına transfer edilmiştir. İyi gelişmiş köklü fideler saksılara transfer edilmiş ve iklimlendirilmesi yapılmıştır. İklimlendirilmeden sonra bitkiler toprağa transfer edilmiştir. Rejenere edilmiş bitkilerin çoğu fenotipik olarak normaldir. Fakat bazı bitkilerin morfolojisindeki anormallikler deforme olmuş yapraklar ve albinoluluk ile ifade edilmiştir. Varyasyon R1 rejenerantlarında kaydedilmiştir. Somaklonlar ve onların ebeveynleri (doku kültüründe üretilmeyenler) arasında morfolojik karakterleri açısından karşılaştırma yapılmıştır. Belirgin farklılıklar görülmüştür.

Chamandoosti and Azad (2012) *Brassica napus* L. bitkisinin farklı yaşlardaki aseptik fidelerinin hipokotillerini farklı pH aralıkları ve farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS kültür ortamına kültüre almışlardır. 7 gün sonra 6 mg/l IBA, 2 mg/l IBA ve pH= 5.5 olan kültür ortamında en yüksek gövde rejenerasyonu gözlenmiştir. Rejenere edilmiş gövdeler 0.1 mg/l IBA olan MS kültür ortamında köklendirilmiştir ve *Sclerotinia sclerotiorum* fungusunun miselleri saksılara ekilmiştir. Rejenerantlar somatik varyasyon sayesinde misellere karşı direnç göstermişlerdir.

Patil et al. (2013) *Vigna unguiculata* L' da (börülce) RAPD markörleri kullanarak genetik çeşitlilik araştırması yapmışlardır. DNA izolasyonunu Doyle and Doyle (1990) protokolüyle gerçekleştirmişlerdir. Kullanılan OPD-14, OPD-18 OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-5, OPA-07, OPA-08, OPA-09, OPA-10, OPC-01, OPC-02, OPC-05, OPC-07, OPC-08, OPD-10 primerlerinin hepsinde polimorfizm görülmüş olup, ortalama polimorfizm oranı % 72,82 olarak hesaplanmıştır.

2.4 *Trifolium pratense* L.'DE MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR

Wang and Holl (1988), $2n=2x=14$ kromozom sayılı *Trifolium pratense* Altaswede ve $2n=4x=28$ kromozom sayılı *Trifolium pratense* Norseman çeşitlerini kullanarak bitki rejenerasyonunu gerçekleştirmişler ve somaklonal varyasyonun varlığını saptamışlardır. Gamborg B5 ortamında kültüre alınan kalluslarda organogenesis ve embriyogenesis gözlenmemiştir. Ortamdaki tuzlar ve vitaminler yarıya indirildiğinde rejenerasyonun gerçekleştiği bildirilmiştir. Eksplant kaynağı olarak hipokotil kullanılmıştır. Rejenere edilen bitkiler morfolojik ve sitogenetik olarak normal bulunmuştur. Somaklonal varyasyonun belirlenmesinde kromozom sayısına, morfolojiye ve izozim analizine bakılmıştır. Sonuç olarak somaklonal varyantların oluşmasının genotipe bağlı olduğu, varyasyonda kültür şartları ve çevresel faktörlerin etkili olduğu açıklanmıştır.

Kongkiatngam et al. (1995) morfolojik, izozim, RAPD DNA markörlerini, *Trifolium pratense* kültürlerinin içinde veya arasında genetik varyasyonu tahmin etmek için kullanmışlardır. *T. pratense*'nin iki kültürü (Avrupa' dan Essi ve Kanada' dan Ottawa) değerlendirilmiştir. Bu iki kültürün her biri için 80 bitki 6 monogenik morfolojik karakterler açısından incelenmiştir. Sadece 4 lokus Ottawa kültürlerinde polimorfikken, Essi kültürlerinde altı lokusun hepsi polimorfiktir. Her kültürden kırk bitki izozim markörleri için denenmiştir. Yirmi enzim sistemi kullanılarak 43 alleli 21 kodlanmış enzim lokusu belirlenmiştir. Bu karakterlerin 13 ve 9'uncu lokusu Essi ve Otawa' da karakteristiktir. Her lokus için allel sayılarının ortalaması Essi' de 1,81, Ottawa' da 1,67' dir. 17 tane RAPD primeri kullanılmıştır. Çoğaltılmış ürünler veren dokuz primer her kültürden 20 bireye denenmek için kullanılmıştır. Her primer 14,8 bant olmak üzere ortalama 7 ile 20 arasında bantlar vermiştir. Yüz ve sekizinci lokuslar Essi' de polimorfiktir, doksan ve doksan sekizinci lokuslar Ottawa' da polimorfiktir. En yüksek kültür varyasyonu hem izozim hem de RAPD markörlerinde gözlenmiştir.

Compos-de-Quiroz and Ortega-Klose (2001), tarafından yapılan çalışmalar sonuç seçilen *T.pratense* ebeveynleri arasındaki genetik değişimler RAPD markörleriyle belirlenmiştir. Kullanılan 55 primerden 21 tanesi tekrarlanabilir sonuçlar vermiştir. 4 ebeveynin her birinden 4 alt grup oluşturulmuşlardır. Toplam 181 RAPD bantı ebeveynler arasındaki genetik uzaklığı tahmin etmek için kullanılmıştır. Bunlardan 135' i güvenilir ve polimorfik RAPD bantları olarak belirlenmiştir. Nei ve Li' in değerlerine benzer değerler bulunmuştur. Düşük

seviyelerdeki genetik çeşitlilik, polimorfik lokuslar ve ortalama heterogenik değerler ile belirlenmiştir.

Dias et al. (2007) kırmızı üçgülün morfolojik ve moleküler ayrımını yapmışlardır. Tarla ve seradan toplanan yirmi bir farklı morfolojik özelliğe sahip olan bitkiler ve 7 SSR markörü 57 eki tanımlamak için kullanılmıştır. Ekler arasındaki varyasyon oldukça fazla çıkmıştır. 7 SSR lokusu her lokus başına ortalama 11.1 alleldir. SSR markörler ile ölçülen genetik çeşitlilik yüksektir. Moleküler varyans analizi populasyon içerisindeki varyansın (% 83,6) en büyüğünü oluşturmuştur.

Isobe et al. (2009), *T. pratense* varyantları arasında bağlantı haritaları oluşturmuşlardır. 1391 mikrosatellit, 251 AFLP, 121 RFLP, 6 RAPD ve 1 STS markörü olmak üzere toplam 1770 markör kullanılarak bağlantı haritası oluşturulmuştur.

BÖLÜM 3

KURAMSAL BİLGİLER

3.1 BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ

Yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin elde edilmesi amacıyla, bütün bir bitki ya da hücre, doku ve organ gibi bitki kısımlarının steril şartlarda ve yapay besin ortamlarında kültüre alınması işlemine bitki doku kültürü denir. Bitkilerin klonal olarak hızlı çoğaltılması, geleneksel yöntemlerle kolay çoğaltılmayan bitkilerin çoğaltılması, patojenlerden arı bitki elde edilmesi, ıslah amaçlı çalışmalar, somaklonal varyasyonların oluşturulması, haploid bitkilerin elde edilmesi, bitki gen kaynaklarının korunması, biyokimyasal ürünlerin (sekonder metabolitlerin vb.) elde edilmesi amaçlarıyla doku kültürü teknikleri kullanılmaktadır.

Bitki doku kültürü işlemlerinde ve genetik iyileştirmelerde kullanılan temel sistem bitki rejenerasyonudur. Bitki rejenerasyonu, kültürü yapılan hücrelerin özellikleri itibariyle üç kısımda incelenir;

- 1- Organize olmuş meristematik hücreleri içeren somatik dokulardan rejenerasyon,
- 2- Meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon,
- 3- Mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden rejenerasyon.

Birinci tip rejenerasyonda bitkiler uç ve yan meristemlerden çoğaltılır. Bu işleme meristem kültürüyle klonal çoğaltım denir. Elde edilen hücreler tamamen donör bitkiye benzerler. İkinci tip rejenerasyon, doğrudan bir bitki eksplantının kesilmiş yüzeyindeki belirli somatik hücrelerin bir kısmının genellikle bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi sonucu bölünerek ve organize olarak, organları daha sonra da bitkiyi veya bir somatik hücrenin sürekli bölünerek embriyo ve sonra tam bir bitkiyi oluşturması şeklinde olabilir. Her iki durum, belirli bir kallus, proto-kallus veya hücre süspansiyonu oluşumu evresinden sonra da ortaya çıkabilir.

Ortaya çıkan bitkilerde bazı kalıtsal veya geçici varyasyonlar görülebilir. Son olarak normal kromozom sayısının yarısını içeren hücrelerden de direkt veya dolaylı yollarla bitki

rejenerasyonu olabilir. Bu durumda donör bitkinin kromozom sayısının yarısına sahip, genellikle steril olan haploid bitkiler elde edilebilir (Babaoğlu vd. 2001).

3.1.1 Besin Ortamları

Kallus kültürü, hücre süspansiyonu, protoplast kültürleri ve bitki rejenerasyonu gibi doku kültürü işlemlerinde kullanılacak ortamın seçimi çok önemlidir. Çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilen çok sayıda besin ortamı formülasyonu bulunmakla birlikte en sık kullanılan ortamlar aşağıdaki gibidir.

MS (Murashige and Skoog 1962), tütün için geliştirilmiş, yüksek tuz içerikli bir ortamdır. Özellikle düşük yoğunluklarda köklendirme çalışmalarında başarıyla kullanılmaktadır. WH (White 1963), düşük tuz içeriği ile domates köklerinin kültürü için geliştirilmiş bir ortamdır. LS (Linsmaier and Skoog 1965), MS ortamının organik bileşikler bakımından farklı bir çeşididir. B5 (Gamborg et al. 1968), soya kallus kültürleri için geliştirilmiş nitrat azotu yüksek bir ortamdır. NN (Nitsch and Nitsch 1969), anter kültürü için geliştirilmiş bir ortam olup, tuz içeriği MS ve WH arasındadır. SH (Schenk and Hilderbrandt 1972), hem monokotiledonlar hem de dikotiledonlar için uygun bir ortamdır.

Bitki besin ortamlarında bulunan bileşenler kullanım sıklığına göre; su, makro elementler, mikro elementler, vitaminler, şekerler, yarı katılaştırıcılar, bitki büyüme düzenleyicileri, tamponlar, amino asitler ve kimyasal olarak tanımlanamayanlardır (George 1993, Franklin and Dixon 1994, Gamborg and Philips 1995).

Sıvı ortamlar için makro ve mikro elementler, bazı vitaminler ve karbon kaynağı, yarı-katı ortamlar için ek olarak agar veya agaroz içeren ortamlara temel besin ortamları denir. Temel besin ortamına bitki büyüme düzenleyicileri ilavesiyle her türlü bitki, her bitki parçası, dokusu veya hücresi için farklı ve özel besin ortamları hazırlanabilir (Babaoğlu vd. 2001).

3.1.1.1 Makro Elementler

Azot temel besin ortamı içindeki en önemli bileşendir. Diğer makro elementler ise fosfor, sodyum, magnezyum, kükürt ve kalsiyumdur (George 1993).

3.1.1.2 Mikro Elementler

Demir, manganez, çinko, bor, molibden, kobalt ve iyot en çok kullanılan mikro elementlerdir (Gamborg and Philips 1995).

3.1.1.3 Vitaminler

Bitki kültürleri için en gerekli olan thiamin, nikotinic asit, pridoksin enzim reaksiyonlarında katalitik etkiye sahip vitaminlerdir (George 1993).

3.1.1.4 Şekerler

Kültüre alınan bitki hücre ve dokuları yeterli miktarda karbohidrat sentezi yapamadıklarından enerji kaynağı olarak çeşitli şekerler kullanılır. En çok kullanılanı sakkaroz olup glikoz, maltoz, rafinoz ve fruktoz da kullanılabilir (George 1993).

3.1.1.5 Jel Yapıcı Maddeler

Besin ortamlarını yarı-katı hale getirmek amacıyla kullanılan bileşenlerdir. Genellikle kırmızı deniz alglerinden çıkarılan polisakkarit bileşimlerdir. En çok kullanılanlar agar, agaroz, aljinat, silikajel, jelatin ve nişastadır (George 1993).

3.1.1.6 Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Oksinler; doku kültüründe tek başına kullanıldığında kallus uyarımını, hücre süspansiyonlarının elde edilmesini, somatik embriyo oluşumunun uyarımını sağlar. Sitokininlerle birlikte kullanıldığında kallus oluşumunu, sürgün rejenerasyonunu, somatik embriyo oluşumunun uyarılmasını sağlar (Smith 1992).

Sitokininler; hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma, bitki rejenerasyonu, sürgün çoğaltımında etkilidir. Antioksidan etki göstererek yaşlanmayı geciktirir. Sürgünlerde köklenmeyi, embriyogenezisi engeller (Smith 1992).

Gibberellinler; meristemlerden bitki rejenerasyonunun uyarılmasında, sürgünlerin boylarının uzatılmasında, embriyo ve ovül kültürlerinde kullanılmaktadır. Kallus gelişimini, organogenezisi, adventif kök oluşumunu engeller (Smith 1992).

Absisik Asit; strese maruz kalmış yapraklarda, dormant tomurcuklarda bulunur. Somatik embriyoların olgunlaştırılmasında kullanılmaktadır. Yaprak ve meyve dökümünde, dormanside, stomaların kapanmasının düzenlenmesinde etkili olup, ışığa karşı hassastır (Smith 1992).

3.2 SOMAKLONAL VARYASYON

Kallus oluşturan veya totipotent olup, yeni bitkiler meydana getirebilen hücreler uzun süreli veya kısa süreli kültürlerde yüksek bitki büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda bu yeteneklerini yitirebilmektedirler. Bu hücrelerden oluşan yeni bitkilerde gen veya kromozom bozuklukları sonucu kalıtsal ve fenotipik varyasyonlar ortaya çıkmaktadır. Bu tür değişiklikler somaklonal varyasyon olarak adlandırılmaktadır. Bu varyasyonlar yeni çeşit geliştirme ve ıslahçılar tarafından kullanılmaktadır (Chrispeels and Sadova 1994).

Somaklonal varyasyon sonucu ortaya çıkan değişiklikler arasında, bazı pigmentlerin yapısındaki farklılaşmalar sonucu çiçek renginin, yaprak ve çiçek morfolojisinin, tohum veriminin, bitki canlılığı ve iriliğinin, uçucu yağ içeriği ve hastalıklara tolerans veya dayanıklılığın değişmesi sayılabilir (Brown and Thorpe 1995).

Bitki hücre ve doku kültürü çalışmaları *in vitro* şartlarda gerçekleştirildiği için, rejenerasyonun yapıldığı fiziki şartlardan veya ortamda kullanılan kimyasal maddelerden kaynaklanan gen düzeyinde birtakım farklılıkların meydana gelmesi olasıdır. Bu değişiklikler doku kültürü çalışmalarının her aşamasında meydana gelebilir. Somaklonal varyasyonun nedenleri; bitkinin genotipi, ortam bileşenleri ve kullanılan doku kültürü yöntemleri olabilir (George and Sherrington 1984, Karp 1989).

Larkin and Scowcroft (1989), somaklonal varyasyonu bitki doku kültüründe genetik kararsızlık sonucu ortaya çıkan kalıtsal değişiklikler olarak ifade etmişlerdir.

3.2.1 Doku Kültürü Tekniklerinin Varyasyona Etkileri

Doku kültüründen elde edilen bitkilerin, fenotipik ve genetik açıdan değişme olasılıkları bitkiciklerin hangi metotla üretildiğine bağlıdır. Sürgün kültürlerinde görülen varyasyonlar ansızın oluşan mutasyonlardır. Görülen çoğu değişiklik geçici özelliktedir. Bu değişikliklerin genotipik ya da epigenetik olduğu dikkatli bir analiz yapılmadan belirlenemez. Hücrelerin totipotent olması nedeniyle somatik hücrelerden bitki rejenerasyonu ortaya çıkmaktadır. Bu yetenekteki bir hücre, farklılaşmamış bir hücre yığını meydana getirip sonra tekrar farklılaşarak tam organizasyonlu bireyleri meydana getirmektedir. Böyle bir yöntemde varyasyon meydana gelir ve varyasyonun derecesi doku kültürü tekniğine göre değişir. Kallus kültürleri gibi organize olmamış, düzensiz kültürlerde somaklonal varyasyonun ortaya çıkma frekansı yüksektir. Bitkinin genetik yapısının, onun doku kültürlerinden oluşan somaklonal varyasyonun derecesi üzerinde güçlü bir etkisi bulunmaktadır. Rejenere edilen bitkiler arasındaki genetiksel değişim derecesi kallustan veya süspansiyon kültürlerinden üretilme metotlarına bağlı olabilir. Monokotil ve dikotil bitkilerin, somatik embriyolarından elde edilen bitkilerde somaklonal varyasyon gözlenmiştir (Bürün 1996).

3.2.2 Somaklonal Varyasyonun Nedenleri

3.2.2.1 Hücre Organizasyonunun Varyasyonda Etkisi

Çeşitli doku kültürü sistemlerinde kallus fazından sonra adventif meristemlerin formasyonu ile kültürde somaklonal varyasyon gözlenmektedir. Burada, hücre organizasyonu kritik bir durum olarak ortaya çıkmakta ve düzensiz büyümeye bağlı olarak somaklonal varyasyon beklenmektedir. Eğer düzensiz faz uzun sürerse somaklonal varyasyon şansı daha yüksek olmaktadır ve böyle uzun bir fazdan sonra organize olan yapılarda daha büyük bir sapma görülmektedir. Oysa kültüre alınan bitki dokularından yapıların direkt oluşumu kararsızlık şansını en aza indirmektedir (Karp 1994).

3.2.2.2 Doku Kaynağındaki Varyasyon

Somaklonal varyasyon donör bitkide meydana gelen somatik mutasyonlardan ortaya çıkmaktadır. Bitkilerin vejetatif parçaları aynı genetik potansiyele sahip hücreleri içermektedir. Fakat bitkide farklı genetik yapıda hücreler de bulunmaktadır. Genetik olarak

farklı hücreleri taşıyan stok bir bitkinin dokularından kültür başlatılırsa genetik olarak farklı bitkilerin üretilmesi mümkün olabilir. Kültüre alınan hücrelerdeki varyasyonun büyüklüğü kültürü başlatmak için seçilen eksplantın kaynağına göre değişir. Somaklonal varyasyonun frekansında eksplantın kaynağı ve ploidi seviyesi önemli bir etkiye sahiptir. Başlangıç eksplantının ploidi seviyesinin düşük olması varyant bitkilerin miktarını artırabilmektedir (George 1993).

3.2.2.3 DNA Metilasyonu

DNA yüksek oranda metillendiğinde gen aktivitesi baskılanmaktadır. Metilasyondaki bir azalma gen aktivitesinin artması anlamına gelmektedir. Değişen metilasyon durumunun genetik varyasyona sebep olmasından sorumlu olarak *in vitro*' da doğal olmayan koşullar nedeniyle hücrenin fizyolojisini karıştıran stres veya şok geçirmesi gösterilmiştir (George 1993).

3.2.2.4 Nükleik Asit Öncüllerinin Kaybı

Doku kültürlerinde meydana gelen nükleik asit biyosentezi için gerekli öncüllerin eksikliğinin, bazı mutasyonların ortaya çıkmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu yüzden genellikle adenin bazı, bitki doku kültürü ortamına ilave edilmektedir (George 1993).

3.2.2.5 *In vitro* Hücre Bölünmesindeki Anormallikler

Kültür sırasında genellikle stabil kalan, aktif olarak bölünen meristematik hücrelerde geniş vakuollü hücrelerde değişimler görülmektedir. Parankimatik dokularda değişik ploidi düzeylerine sahip hücreler bulunmaktadır. Kültürde poliploid hücrelerin meydana gelmesinin nedeni mitoz boyunca iğ ipliği oluşumunun başarısızlığı veya bipolar iğ iplikleri yerine multipolar iğlerin meydana gelmesidir. Diğer bir neden de hücre bölünmesinin interfazın G2 alt devresinde geçici olarak durması ve sonra normal mitoz olmadan hücrenin tekrar G1 'de hücre döngüsüne girmesidir (Karp 1994).

3.2.2.6 Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Etkisi

Oksinler, kallus ve hücre süspansiyonlarının başlatılmasına sebep olduklarından ve gelişmeyi sağladıklarından kültür ortamına mutlaka eklenmelidir. Oksin ilaveli kültürlerde genetik değişimler de yüksek olmaktadır. Oksinlerin mutajenik olduğu ve DNA metilasyonunu artırdığı bilinmektedir. Sitokininler, kültüre alınan dokularda hücre bölünmesini artırmaktadırlar. Düşük konsantrasyonlarda sitokininler kararlı meristematik hücrelerin bölünmesini teşvik ederken yüksek oranda poliploid hücrelerin frekansını artırmaktadır (De Klerk 1990, George 1993).

3.2.2.7 Kültür Süresi

Kültürler uzun bir süre alt kültürler yoluyla korunduğunda ve alt kültürler arasındaki süre uzadığında genellikle mutasyona uğrayan hücrelerin oranı ile genetik değişim artmaktadır (George 1993).

3.2.2.8 Kromozomlardaki Sayısal ve Yapısal Değişiklikler

Doku kültüründe poliploidi ve aneuploidi gibi sayısal değişiklikler ile inversiyonlar, delesyonlar, translokasyonlar ve izokromozomlar gibi yapısal değişiklikler sıklıkla meydana gelmektedir. Somaklonal varyasyonun meydana gelmesinden sorumlu olan kromozomlardaki sayısal varyasyonlardan en yaygın görüleni poliploididir (Larkin 1989).

3.2.2.9 Gen Seviyesindeki Değişiklikler

Doku kültürü nokta mutasyonları olarak adlandırılan DNA'daki baz sıralarının artması ya da eksilmesine ve buna bağlı olarak spesifik gen ürünlerinin miktarının değişmesine sebep olabilir. Bu değişiklik fenotipe yansiyarak varyabilite meydana getirmektedir. Somaklonal varyasyonun meydana gelmesinden sorumlu diğer bir mekanizma ise, taşınabilir DNA'nın mobilizasyonudur. Taşınabilir DNA (gezici gen) yeni genlerin regülasyonuna, gen fonksiyonundaki inaktivasyona ya da reaktivasyona, translokasyonlar ve inversiyonlar gibi DNA'da yeniden şekillenmelere sebep olmaktadır (Larkin 1984).

3.3 MOLEKÜLER BELİRTEÇLER

Moleküler belirteçler, farklılığı DNA düzeyinde ölçen ve araştırılan genotiplerde istenen bir geni ya da özelliği izlemek için kullanılabilen belirteçlerdir. Moleküler belirteçler, gözlenebilir karakterlere dayanan morfolojik belirteçlere ve temeli proteine dayanan biyokimyasal belirteçlere göre oldukça güvenilirdir. Sayıları fazladır ve çevreden etkilenmezler. Moleküler belirteçlerin verimli ve etkin olabilmesi için; polimorfik, kalıtılabilir, tekrarlanabilir ve kolay yorumlanabilir özellikleri taşıması gerekmektedir. Moleküler belirteçlerle çalışılırken, bir türe ait genotipler arasındaki varyasyonların genomik analizler için önemli ham bilgiler içerdiği göz önünde bulundurulmalı ve kullanılacak belirteç sistemi, seçilen test örneklerinde mevcut olan varyasyonları saptayabilmelidir. Protein ya da DNA'da bulunan polimorfizmlere dayanan moleküler belirteçlerin geliştirilmesi; taksonomi, filogeni, genetik, bitki ıslahı ve ekoloji gibi bilim alanlarına büyük oranda katkı sağlamıştır. Bitki dokularında moleküler belirteçler ile yapılan çalışmalarda DNA profillerinin çıkarılması ve spesifik DNA parmak izlerinin elde edilmesi için;

- Bitki materyali seçilir.
- Bitkiden DNA izolasyonu gerçekleştirilir.
- Uygulanacak yöntemle göre genetik materyalin PZR ile çoğaltımı yapılır.
- Bireyler arası polimorfizm farklı moleküler belirteç teknikleri ile belirlenir (RAPD, AFLP, SCAR, RFLP)
- DNA bant profilleri analiz edilir.

Genomun özgün bir bölgesini tanımlamak amacıyla birçok belirteç sistemi kullanılmaktadır. Genom analizleri ve genetik çalışmalar başta olmak üzere moleküler çalışmalarda morfolojik, protein ve DNA belirteçleri olmak üzere üç tip belirteç kullanılmaktadır (Williams 1980).

3.3.1 Morfolojik Belirteçler

Bilgi eksikliğinden dolayı genler ve kromozomlar hakkındaki ilk çalışmalar, göz rengi, kanat yapısı, deri rengi gibi basit Mendel kalıtımı gösteren özellikler üzerinde yapılmıştır. Böyle morfolojik karakterler, özgün genler için güvenilir indikatör olarak kullanılabilirler ve bu özellikleri kodlayan genlerin kromozom üzerindeki yerlerinin tanımlanmasında faydalı

olmaktadırlar. Morfolojik belirteçlerin gözlenmesi kolay olmasına rağmen allel sayılarının nispeten az olmasından dolayı kullanımı kısıtlı kalmaktadır (Franklin 1970).

3.3.2 Protein Belirteçler

Amino asit bileşimi, moleküler ağırlıkları ve antikor-antijen ilişkilerindeki farklılıklar nedeniyle proteinler için farklı alleller bulunabilmektedir. Moleküler büyüklük ve amino asit bileşimi farklılıklarından dolayı proteinler, jel elektroforez yöntemi kullanılarak kolaylıkla ortaya çıkarılabilir ve genetik belirteç olarak kullanılabilirler. Genetik çalışmalarda ilk zamanlarda protein polimorfizmlerinin araştırılması amacıyla kan antijenleri ve izozim belirteçleri yaygın olarak kullanılmıştır (Bernatzky and Tankley 1989).

3.3.3 DNA Belirteçleri

DNA belirteçleri, bir tür içerisindeki farklı bireylerde dizi polimorfizmi gösteren DNA bölgeleridir ve varyasyonun belirlenmesinde en sık kullanılan yöntemdir. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun keşfinden sonra genetik çalışmalarda PZR temelli belirteçler daha çok tercih edilmeye başlanmıştır. 1985 yılında ilk kez Karl Mullis tarafından ortaya konulan bu teknoloji sayesinde genomun özgün bölgelerinin *in vitro* şartlarda çoğaltılabilmesi ve elektroforez teknikleri ile görüntülenmesi mümkün hale gelmiştir. DNA teknolojisi ve moleküler biyolojideki hızlı gelişmeye paralel olarak daha ekonomik, kolay ve polimorfik olmalarından dolayı özellikle PZR temelli DNA belirteç sistemleri (RFLP, RAPD, EST, STS, SSCP, AFLP, STR, SNP) genetik çalışmalarda daha yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır (Chao et al. 1989).

DNA belirteçleri, hibridizasyona dayalı ve PZR'a dayalı belirteçler olmak üzere ikiye ayrılabilir.

3.3.3.1 Hibridizasyona Dayalı DNA Belirteçleri

3.3.3.1.1 RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Farklılığı)

RFLP tekniğinde genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri kullanılarak spesifik bölgelerden kesilmesi sağlanır ve çok sayıda DNA fragmentleri elde edilir. DNA fragmentleri agaroz jel

elektroforezi ile ayrıldıktan sonra southern blot tekniğiyle selüloz veya uygun bir membrana transfer edilir. Radyoaktif işaretlenmiş bir prob ile hibridizasyon yapılır (Botstein 1980).

RFLP tekniğinin avantajları;

- Güvenilirdir,
- Kodominant özellikte olduklarından dolayı, heterozigotların belirlenmesinde ve karakterizasyonunda kullanılırlar.

RFLP tekniğinin dezavantajları;

- Analizler pahalı, fazla zaman ve iş gücü gerektirir.
- Radyoaktif etiketleme yöntemi kullanılır.
- Yüksek kalitede ve fazla miktarda DNA'ya ihtiyaç duyulur.

3.3.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonuna Dayalı DNA Belirteçleri

3.3.3.2.1 AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Farklılığı)

AFLP tekniği RAPD tekniği ile RFLP tekniğinin birleştirilmiş formu olup, RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek amacıyla geliştirilmiştir. DNA iki kesim enzimi tarafından kesilir ve kesilen her bir parçanın üzerine sentetik nükleotid dizilimli adaptör DNA'lar eklenir. Böylece spesifik DNA çoğaltımı yapılır. Bu teknikte, restriksiyon enzimleriyle kesilen DNA fragmentlerinin adaptör DNA ile birleştirilmesini ard arda yapılan iki PZR reaksiyonu izler. Elde edilen ürünler poliakrilamid jelde yürütülür, gümüş boyama ile gözlenir (Ergül 2000).

AFLP tekniğinin avantajları;

- Polimorfizm oranı yüksektir,
- Laboratuvarlar arası cihaz farklılığı sonucu etkilemez.

AFLP tekniğinin dezavantajları;

- Dominant belirteçlerdir,

- Radyoaktif işaretleme yapılır.

3.3.3.2.2 RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)

RAPD tekniğinde, 6-10 nükleotid uzunluğundaki başlatıcı DNA'lar kullanılarak genom üzerinde rastgele bölgelerin amplifikasyonu gerçekleştirilir. Diğer PZR uygulamalarının aksine iki değil bir primer kullanılır, bu primer her iki yöndeki DNA çoğaltımı için de kullanılır. Dolayısıyla kullanılan primerin DNA üzerinde birbirine yakın iki bölgeye bağlanabildiği genom bölgelerinin amplifikasyonu yapılır. Üretimi yapılan DNA dizileri için agaroz jel elektroforez uygulanır ve bazı dizilerin çoğaldığı, bazılarının ise çoğalmadığı gözlenir. Bu gözlem polimorfizmin göstergesidir (Welsh and McClelland 1990). RAPD analizinde kontrol grubuna göre farklı bant profillerinin görülmesi, kalıp DNA üzerinde primerlerin bağlanma bölgelerinde meydana gelen mutasyonlardır. Mutasyonlar, primerlerin bu bölgeler ile eşlenmesini engeller ve fragmanlar çoğaltılamaz. Primerlerin bağlanma bölgelerinde oluşmuş kırıklar da fragmanların çoğalmasını engelleyebilir. Kalıp DNA üzerindeki mutasyonlar primerler için yeni bağlanma bölgeleri de oluşturabilir.

RAPD tekniğinin avantajları;

- Çabuk sonuç verir, ucuzdur, az iş gücü gerektirir,
- Az miktarda ve düşük kalitede DNA yeterlidir,
- Polimorfizm oranı yüksektir,
- Evrensel primer seti kullanılır,
- Radyoaktivite gerektirmez.

RAPD tekniğinin dezavantajları;

- Güvenirliği sınırlıdır,
- Farklı laboratuarlarda farklı sonuçlar gözlenebilir,
- Dominant belirteçlerdir.

3.3.3.2.3 SSR (Basit Dizi Tekrarları)

DNA'da sık tekrarlayan basit dizilere mikrosatellit denir. Ökaryotik kromozomlarda yaygın olarak bulunurlar. Tekrarlı bölgelerin her iki yanındaki dizilere komplementer primer kullanılarak bu bölgelerin çoğaltılması amaçlanır (Michelmore 1993).

SSR tekniğinin avantajları;

- Polimorfiktir,
- Kodominant belirteçlerdir.

SSR tekniğinin dezavantajları;

- Fazla iş gücü gerektirir,
- Maliyeti yüksektir.

3.3.3.2.4 SCAR (Dizi Karakterli Çoğaltılmış Bölge)

Belirli büyüklükteki bir RAPD bandının klonlanması ve uç bölgelerinden dizi belirlendikten sonra, bu fragmente yönelik RAPD primerlerini içeren primer çiftleri ile geliştirilen bir tekniktir (Paran 1993).

SCAR tekniğinin avantajı;

- Kodominant belirteçlerdir.

SCAR tekniğinin dezavantajları;

- İş gücü fazladır,
- Uzun zaman alır.

BÖLÜM 4

MATERYAL VE YÖNTEM

4.1 MATERYAL

Bu tez çalışmasında, Bülent Ecevit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü deneme serasında yetiştirilen $2n=4x=28$ kromozomlu doğal tetraploid *Trifolium pratense* L. (çayırüçgüllu, kırmızı çiçekli tırfıl) E2 çeşidi kullanılmıştır (Elçi 1982).



Şekil 4.1 Deneme serasındaki doğal tetraploid *Trifolium pratense* L.'lerin genel görünüşü.

4.2 YÖNTEM

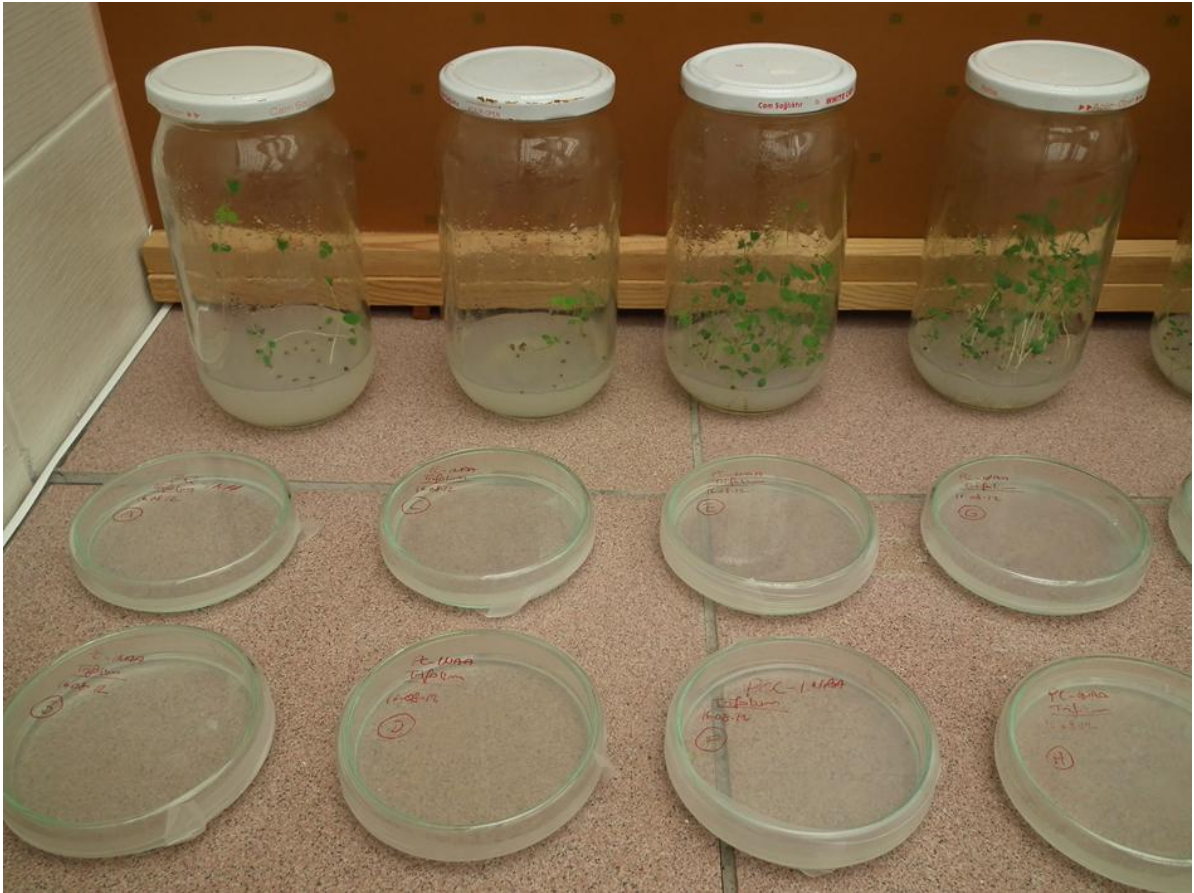
4.2.1 Tohum Sterilizasyonu

Yüzey sterilizasyonunu sağlamak için tohumlar, %10 'luk sodyumhipoklorit (NaOCl) çözeltisi ile 10 dakika muamele edilmiş ve 3 kez distile su ile durulanmıştır.

4.2.2 Tohum Çimlendirme ve Rejenerasyon İçin Kullanılan Ortamlar

Tohum çimlendirme ortamı olarak hormonsuz MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamı kullanılmıştır (Çizelge 4.1). Ortamlar steril şartlarda kavanozlara dökülüp, tohumlar kavanozlarda çimlendirilmiştir. (Şekil 4.2)

Rejenerasyon çalışmaları için Çölgeçen (2008)'in modifiye ettiği PC-L2 ortamı kullanılmıştır.



Şekil 4.2 Aseptik fidelerden rejenera bitkilerin üretimi.

Çölgeçen, çalışmasında doğal tetraploid *Trifolium pratense* eksplantlarının farklı konsantrasyonlarda BAP (6-Benzilaminopürin) ve NAA (Naftalenasetik asit) içeren ortamlara ekimini gerçekleştirmiştir. Rejenerasyonda en başarılı eksplant kaynağını apikal meristem olarak bildirmiştir (Çölgeçen ve Toker 2008).

4.2.2.1 MS Ortamının Hazırlanması

Hazırlanan stok çözeltilerden uygun hacimler alınarak MS ortamı hazırlanmıştır. pH ayarı yapıldıktan sonra agar eklenip, otoklavda 121°C’de 15 dk sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Stok çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan maddeler çizelgelerde gösterilmiştir. (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 MS ortamında kullanılan stok çözeltiler.

MAJÖR STOK	g/l (X10)
KNO ₃	19
NH ₄ NO ₃	16,5
CaCl.H ₂ O	4,4
MgSO ₄	3,7
KH ₂ PO ₄	1,7

MİNÖR STOK	g/l (X10)
H ₃ BO ₃	62
KI	8,3
MnSO ₄ .4H ₂ O	168
Na ₂ NaO ₄ .2H ₂ O	2,5
ZnSO ₄ .7H ₂ O	86
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25

DEMİR STOK	g/l (X10)
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,278
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,372

VİTAMİN STOK	g/l (X10)
Tiamin-HCl	1
Nikotinic asit	5
Piridoksin-HCl	5

MS ortamını hazırlamak için;

- 20 gr sakkaroz tartılır, balon jodede çözülür,
- 100 ml majör stok çözeltisi eklenir,
- 10 ml minör stok çözeltisi eklenir,
- 10 ml vitamin stok çözeltisi eklenir,
- 10 ml demir stok çözeltisi eklenir,
- Tohum çimlendirmede kullanılan hormonsuz MS ortamı için bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmaz,
- 1000 ml ye tamamlanan çözeltinin pH ayarı 1M HCl ve 1M NaOH kullanılarak yapılır,
- pH 5,80 e ayarlanır ve 7 gr agar eklenir,
- Otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilir,
- Soğuduktan sonra kavanozlara dökülür.

4.2.2.2 PC-L2 Ortamının Hazırlanması

Rejenerasyon çalışmaları için kullanılan PC-L2 ortamı Çölgeçen (2008) tarafından modifiye edilmiş olup, en başarılı ortam 1 mg/l NAA ve 3 mg/l BAP içeren ortam olarak bildirilmiştir. Hazırlanan stok çözeltilerden uygun hacimlerde alınıp, ortam hazırlanmıştır (Çizelge 4.2)

Çizelge 4.2 PC-L2 ortamında kullanılan stok çözeltiler.

MAJÖR STOK	g/l (X10)
NH ₄ NO ₃	10
CaCl ₂ . 2H ₂ O	6
MgSO ₄ .7H ₂ O	4,35
KH ₂ PO ₄	3,25
KNO ₃	21
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,85

MİNÖR STOK	g/l (X10)
H ₃ BO ₃	50
KI	10
MnSO ₄ .H ₂ O	150
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	4
ZnSO ₄ .7H ₂ O	50
CoCl ₂ .6H ₂ O	1
CuSO ₄ .5H ₂ O	1

DEMİR STOK	g/l (X10)
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,1069
Na ₂ EDTA.7H ₂ O	0,143

VİTAMİN STOK	g/l (X10)
Tiamin-HCl	20
Pridoksin-HCl	5

PC-L2 ortamını hazırlamak için;

- 25 gr sakkaroz tartılır, balon joje içinde çözülür,
- Majör stok çözeltiden 100 ml eklenir,
- Minör stoktan 10 ml eklenir,
- Demir stoktan 10 ml eklenir,
- Vitamin stoktan 1 ml eklenir,
- 25 mg myo-inositol tartılıp, ortama eklenir,
- Bitki büyüme düzenleyicileri olarak 1 mg/l NAA ve 3 mg/l BAP eklendikten sonra son hacim 1000 ml ye tamamlanır,
- pH 5.80 e ayarlanır,
- 8 gr agar eklenip, otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilir.
- Soğuduktan sonra petrilere dökülür.

4.2.3 Genomik DNA İzolasyonu

Bitkilerden DNA izolasyonu genel olarak bazı prensiplere göre yapılmaktadır. Bitkisel hücreler selülozdan yapılmış bir hücre duvarı içermektedir. Bu hücre duvarı, sıvı azot ya da kuru buz içerisinde öğütülerek, kırılır. Hücre duvarı kırıldıktan sonra, CTAB (CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide), SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) PVP (Polyvinylpyrrolidone) gibi deterjanlar ve β -merkaptoetanol gibi protein indirgeyici ajanlar birlikte kullanılarak hücre zarı parçalanır. DNA'ya bağlı proteinler, parçalanmış doku veya hücre parçaları kloroform ya da fenol karışımının eklenmesi ve santrifüj ile uzaklaştırılır. RNA'yı yıkan RNaz enzimi kullanılarak solüsyon içerisindeki RNA'lar uzaklaştırılır. Pelleti temizlemek için etil alkol ile yıkama yapılır. Kirlilik ve tuzlar uzaklaştırılmış olur. RAPD analizlerini gerçekleştirmek amacıyla doğal tetraploid *T. pratense* donör ve klon bitki örneklerinden DNA izolasyonu Lefort (1998) tarafından belirlenen protokole göre yapılmıştır. İzolasyonu gerçekleştirilen DNA'ların kalitesi ve miktarları nanodrop ile ölçümler yapılarak belirlenmiştir. Nanodrop sonuçları çizelge 4.3 'de verilmiştir.

Lefort et al. (1998) protokolüne göre;

- 0,1 gr yaprak havanda sıvı azot yardımıyla ezildi ve 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı,
- Üzerine 1 ml ekstraksiyon tamponu ve 10 μ L β -merkaptoetanol eklendi,
- Vorteks ile 30 sn karıştırıldı,
- 65°C'de 15 dk su banyosunda bekletildi,
- 0,5 ml kloroform : izoamilalkol (24:1) eklenip, hafifçe karıştırıldıktan sonra -20°C'de 15 dk bekletildi,
- Örnekler 14.000 rpm 'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst sıvı yeni 1,5 ml'lik tüpe aktarılıp, üzerine 1 ml soğuk izopropanol eklendi,
- DNA'nın çöktürülmesi amacıyla , -20°C'de 1 saat bekletildi,
- 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi,
- Üst sıvı uzaklaştırılarak pellet %70'lik etanol ile yıkandı,
- 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve üst faz uzaklaştırıldı,
- DNA 100 μ L TE tamponunda çözdürüldü,
- Üzerine 1 μ L RNaz A eklendi, 37°C'de 15 dk bekletilerek RNA'nın uzaklaştırılması sağlandı,
- Örnekler -20°C'de saklandı.

Çizelge 4.3 Nanodrop Sonuçları

Örnek	mg/µl	260/280	260/230
C1	364,5	1,70	0,66
D1	118	2,02	0,90
C2	452,6	1,92	0,76
D2	28,9	1,73	0,55
C3	185,5	1,68	0,53
D3	58,2	1,49	0,63
C4	283,5	1,80	0,63
D4	159,5	1,83	0,99
C5	217,7	1,69	0,61
D5	115,5	2,07	1,00
C6	328,4	1,81	0,74
D6	39,8	1,81	0,68

Çözeltiler

Kloroform:İzoamilalkol : 24:1 (hacim/hacim)

Ekstraksiyon Tamponu: 50mM EDTA ve 50mM Tris-HCl (pH:8), 4M LiCl, %1 CTAB, %2 PVPP ve %0,5 Tween 20

TE Tamponu: 1mM EDTA ve 10 mM Tris-HCl (pH:8)

RNaz A: 10mg/mL

4.2.4 RAPD Uygulamaları

Çalışmada Williams (1980) tarafından geliştirilen RAPD-PCR yöntemi kullanıldı. 8 farklı primer kullanılmış olup, primerlerin isimleri ve dizileri belirtilmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Kullanılan primerler ve dizi bilgileri.

Primer	Nükleotid dizisi(5'→3')
OPC 01	TTCGAGCCAG
OPC 02	GTGAGGCGTC
OPC 05	GATGACCGCC
OPC 06	GAACGGACTC
OPC 08	TGGACCGGTG
OPC 09	CTCACCGTCC
OPO 07	CAGCACTGAC
TUBE A08	GTGACGTAGG

4.2.4.1 RAPD Bileşenleri ve Koşulları

Bitkiden izole edilen genomik DNA kullanılarak yapılan RAPD-PCR reaksiyonları toplam hacim 25µL olacak şekilde düzenlendi. Aşağıdaki bileşenlere standart hacme ulaşacak şekilde ultra distile su ilave edildi.

- 20 ng genomik DNA
- 2.5 µL 10x reaksiyon tamponu,
- 2.5 mM MgCl₂,
- 20 µM dNTPs,
- 0.2 µM primer,
- 0.5 ünite Taq polimeraz

PCR Döngü Şartları;

- 95°C 2 dakika (ön denatürasyon)
 - 94°C 30 saniye (denatürasyon)
 - 36°C 1,5 dakika (bağlanma)
 - 72°C 1,5 dakika (uzama)
 - 72°C 5 dakika (son uzama)
- } 40 döngü

4.2.4.2 Agaroz Jel Elektroforezi ve Fotoğraflama

RAPD-PCR sonucunda oluşan bantların gözlenebilmesi için % 1,6'lık agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bunun için 1,6 gr agaroz tartıldı ve 10 ml 10X TBE tamponu ile karıştırılarak son hacim saf suyla 100 ml'ye tamamlandı, kaynatılarak çözüldü. Karışım soğutulmuş içerisine 5 µL EtBr ilave edildi. Önceden tarakları yerleştirilmiş jel kasetine döküldü ve polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra kasetten taraklar çekilerek çıkartıldı. Hazırlanan jel, elektroforez tankına yerleştirilerek üzeri kapanıncaya kadar 1X TBE tamponu ile dolduruldu.

12 µL örnek için 3 µL yükleme boyası karıştırılarak jelde oluşturulan kuyucuklara pipet yardımıyla yüklendi. Örnekler 100 voltta yaklaşık olarak 1,5 saat yürütüldü.

Yürütme tamamlandıktan sonra RAPD-PZR ürünleri jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiş (Gene Genius, Syngene) ve fotoğrafları çekilmiştir (GyneSnap Software, Synaptics).

4.3 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

4.3.1 Somaklonal Varyasyonun Genomik Kalıp Stabilitesi (GKS) ile Değerlendirilmesi

Genomik Kalıp Stabilitesi (GKS), RAPD profillerinin sayısındaki belirgin değişimi gösteren nicel bir ölçümdür. RAPD profillerindeki değişimler, GKS oranındaki değişmeyi ifade eder. RAPD profillerindeki polimorfizm, kontrol grubuna göre kaybolan bantlar ve yeni oluşan bantların kontrol grubundaki toplam bant sayısına oranı ile belirlenir (Atienzar et al. 1999; Liu et al. 2007).

$$GKS = (1 - a/n) \times 100$$

a: her örnekteki ortalama polimorfik bant sayısı

n: kontroldeki toplam bant sayısı

BÖLÜM 5

ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1 RAPD SONUÇLARI

Polimorfizm hesaplamaları her primer için örneklerin bant profilleri ile kontrolün bant profilleri karşılaştırılarak yapılmıştır. Kontrolde bulunup örneklerde bulunmayan ve kontrole göre yeni oluşan bantlar polimorfik olarak değerlendirilmiştir. Polimorfizm yüzdeleri, polimorfik bant sayısına toplam bant sayıları oranlanarak hesaplanmıştır. Çizelge 5.1 'de kontrole göre yeni ortaya çıkan bantları belirtmek için a, kaybolan kontrol bantlarını belirtmek için b, kullanılmıştır. Donör örnekler D, Klon örnekler C ile ifade edilmiştir.

Çizelge 5.1 Donör ve klonlar arasındaki bant değişimleri.

	1			2			3			4			5			6		
Primer	D ₁	C ₁		D ₂	C ₂		D ₃	C ₃		D ₄	C ₄		D ₅	C ₅		D ₆	C ₆	
		a	b		a	b		a	b		a	b		a	b		a	b
OPC 01	14	4	2	16	1	0	13	7	0	7	6	1	13	5	1	12	1	4
OPC 02	17	3	1	12	0	1	14	2	1	10	8	2	12	3	2	14	0	0
OPC 05	11	3	2	14	0	1	15	2	4	11	5	0	14	2	1	10	0	2
OPC 06	14	1	3	15	0	0	18	0	6	15	1	3	17	0	11	9	4	2
OPC 08	14	0	0	14	0	1	9	3	0	11	2	0	9	4	4	11	1	4
OPC 09	11	4	3	10	3	1	12	5	1	11	4	4	8	1	1	9	0	1
OPO 07	14	4	5	20	5	0	12	2	0	15	6	3	17	2	2	14	6	4
TUBE A08	20	0	0	22	0	8	19	2	3	13	8	3	17	5	3	7	7	0
TOTAL	115	19	16	123	9	12	112	23	15	93	40	16	107	22	25	86	19	17
a+b		35			21			38			56			47			36	
Donör ve Klonlar Arasındaki Toplam Bant Değişiminin (Polimorfizm) Oranı (%)	30,43			17,07			33,92			60,21			43,92			41,86		

a:Kontrole göre (D=Donöre göre) yeni ortaya çıkmış bant sayısı, b:Kontrole göre (D=Donöre göre)kaybolan bant sayısı

Çizelge 5.2 Tüm primerler için GKS değerleri.

Gruplar	OPC 01 % GKS	OPC 02 % GKS	OPC 05 % GKS	OPC 06 % GKS	OPC 08 % GKS	OPC 09 % GKS	OPO 07 % GKS	TUBE A08 % GKS	Ortalama % GKS
1	57,14	76,47	54,54	71,42	100	36,36	35,71	100	66,45
2	93,75	91,66	92,85	100	92,85	60	75	63,63	83,72
3	46,15	78,57	60	66,66	66,66	50	83,33	73,68	65,63
4	0	0	54,54	73,33	81,81	27,27	40	15,38	36,54
5	53,84	58,33	78,57	35,29	11,11	75	76,47	52,94	55,19
6	58,33	100	80	33,33	54,54	88,88	28,57	0	55,45

% GKS: $(1 - a/n) * 100$ a: polimorfik bant n: Kontroldeki (Donör) toplam bant

Bu çalışmadaki örnekleri 6 adet doğal tetraploid *T. pratense* aseptik donör ve 6 adet klon bitkicik oluşturmaktadır. Donör örnekler D, klon örnekler C ile ifade edilmiş olup, RAPD analizi için OPC 01, OPC 02, OPC 05, OPC 06, OPC 08, OPC 09, OPO 07 ve Tube A08 olmak üzere 8 primer kullanılmıştır.

Çizelge 5.2 'e göre D1 örneğinde OPC 01 primeri 14 bant, OPC 02 primeri 17 bant, OPC 05 primeri 11 bant, OPC 06 primeri 14 bant, OPC 08 primeri 14 bant, OPC 09 primeri 11 bant, OPO 07 primeri 14 bant ve Tube A08 primeri 20 bant oluşturmuş olup, toplam bant sayısı 115 dir. C1 örneğinde OPC 01 primerinde donöre göre 4 yeni bant ortaya çıkmış, 2 bant kaybolmuştur. OPC 02 primerinde donöre göre 3 yeni bant oluşmuş, 1 bant kaybolmuştur. OPC 05 primerinde donöre göre 3 yeni bant oluşmuş, 2 bant kaybolmuştur. OPC 06 primerinde donöre göre 1 yeni bant oluşmuş, 3 bant kaybolmuştur. OPC 08 primerinde donöre göre yeni oluşan ve kaybolan bant görülmemiştir. OPC 09 primerinde donöre göre 4 yeni bant oluşmuş, 3 bant kaybolmuştur. OPO 07 primerinde donöre göre 4 yeni bant oluşmuş, 5 bant kaybolmuştur. Tube A08 primerinde donöre göre yeni oluşan ve kaybolan bant yoktur. D1 donörü ve C1 klonu arasındaki polimorfizm yüzdesi 30,43 olarak bulunmuştur.

D2 örneğinde OPC 01 primeri 16 bant, OPC 02 primeri 12 bant, OPC 05 primeri 14 bant, OPC 06 primeri 15 bant, OPC 08 primeri 14 bant, OPC 09 primeri 10 bant, OPO 07 primeri 20 bant ve Tube A08 primeri 22 bant oluşturmuş olup, toplam bant sayısı 123'tür. C2

örneğinde OPC 01 primerinde donöre göre 1 yeni bant ortaya çıkmış, kaybolan bant görülmemiştir. OPC 02 primerinde donöre göre 12 yeni bant oluşmuş, kaybolan bant yoktur. OPC 05 primerinde donöre göre 14 yeni bant oluşmuş, kaybolan bant yoktur. OPC 06 primerinde donöre göre 15 yeni bant oluşmuş, kaybolan bant görülmemiştir. OPC 08 primerinde donöre göre yeni oluşan bant sayısı 14 olup, kaybolan bant görülmemiştir. OPC 09 primerinde donöre göre 10 yeni bant oluşmuş, 3 bant kaybolmuştur. OPO 07 primerinde donöre göre 20 yeni bant oluşmuş, 5 bant kaybolmuştur. Tube A08 primerinde donöre göre 22 yeni oluşan bant görülmüş olup ve kaybolan bant yoktur. D2 donörü ve C2 klonu arasındaki polimorfizm yüzdesi 17,07 olarak bulunmuştur.

D3 örneğinde OPC 01 primeri 13 bant, OPC 02 primeri 14 bant, OPC 05 primeri 15 bant, OPC 06 primeri 18 bant, OPC 08 primeri 9 bant, OPC 09 primeri 12 bant, OPO 07 primeri 12 bant ve Tube A08 primeri 19 bant oluşturmuş olup, toplam bant sayısı 112'dir. C3 örneğinde OPC 01 primerinde donöre göre 7 yeni bant ortaya çıkmış, kaybolan bant görülmemiştir. OPC 02 primerinde donöre göre 2 yeni bant oluşmuş, kaybolan bant sayısı 1'dir. OPC 05 primerinde donöre göre 2 yeni bant oluşmuş, 4 bant kaybolmuştur.. OPC 06 primerinde donöre göre yeni bant oluşmamış, 6 bant kaybolmuştur. OPC 08 primerinde donöre göre yeni oluşan bant sayısı 3 olup, kaybolan bant görülmemiştir. OPC 09 primerinde donöre göre 5 yeni bant oluşmuş, 1 bant kaybolmuştur. OPO 07 primerinde donöre göre 2 yeni bant oluşmuş, kaybolan bant yoktur. Tube A08 primerinde donore göre 2 yeni oluşan bant görülmüş olup ve 3 bant kaybolmuştur. D3 donörü ve C3 klonu arasındaki polimorfizm yüzdesi 33,92 olarak bulunmuştur.

D4 örneğinde OPC 01 primeri 7 bant, OPC 02 primeri 10 bant, OPC 05 primeri 11 bant, OPC 06 primeri 15 bant, OPC 08 primeri 11 bant, OPC 09 primeri 11 bant, OPO 07 primeri 15 bant ve Tube A08 primeri 13 bant oluşturmuş olup, toplam bant sayısı 93'dür. C4 örneğinde OPC 01 primerinde donöre göre 6 yeni bant ortaya çıkmış, 1 bant kaybolmuştur. OPC 02 primerinde donöre göre 8 yeni bant oluşmuş, kaybolan bant sayısı 2'dir. OPC 05 primerinde donöre göre 5 yeni bant oluşmuş, bant kaybolmamıştır. OPC 06 primerinde donöre göre 1 yeni bant oluşmuş, 3 bant kaybolmuştur. OPC 08 primerinde donöre göre yeni oluşan bant sayısı 2 olup, kaybolan bant görülmemiştir. OPC 09 primerinde donöre göre 4 yeni bant oluşmuş, 4 bant kaybolmuştur. OPO 07 primerinde donöre göre 6 yeni bant oluşmuş, kaybolan bant sayısı 3'tür. Tube A08 primerinde donore göre 8 yeni oluşan bant görülmüş

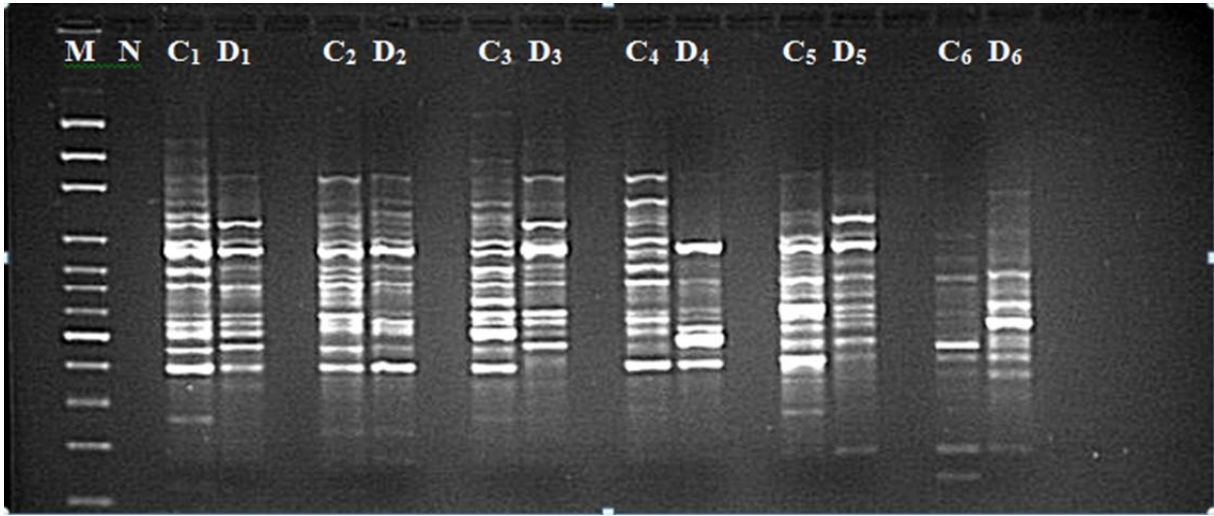
olup ve 3 bant kaybolmuştur. D4 donörü ve C4 klonu arasındaki polimorfizm yüzdesi 60,21 olarak bulunmuştur.

D5 örneğinde OPC 01 primeri 13 bant, OPC 02 primeri 12 bant, OPC 05 primeri 14 bant, OPC 06 primeri 17 bant, OPC 08 primeri 9 bant, OPC 09 primeri 8 bant, OPO 07 primeri 17 bant ve Tube A08 primeri 17 bant oluşturmuş olup, toplam bant sayısı 107'dir. C5 örneğinde OPC 01 primerinde donöre göre 5 yeni bant ortaya çıkmış, 1 bant kaybolmuştur. OPC 02 primerinde donöre göre 3 yeni bant oluşmuş, kaybolan bant sayısı 2'dir. OPC 05 primerinde donöre göre 2 yeni bant oluşmuş, 1 bant kaybolmuştur. OPC 06 primerinde donöre göre yeni bant oluşmamış, 11 bant kaybolmuştur. OPC 08 primerinde donöre göre yeni oluşan bant sayısı 4 olup, kaybolan bant sayısı 4'tür. OPC 09 primerinde donöre göre 1 yeni bant oluşmuş, 1 bant kaybolmuştur. OPO 07 primerinde donöre göre 2 yeni bant oluşmuş, kaybolan bant sayısı 2'dir. Tube A08 primerinde donöre göre 5 yeni oluşan bant görülmüş olup ve 3 bant kaybolmuştur. D5 donörü ve C5 klonu arasındaki polimorfizm yüzdesi 43,92 olarak bulunmuştur.

D6 örneğinde OPC 01 primeri 12 bant, OPC 02 primeri 14 bant, OPC 05 primeri 10 bant, OPC 06 primeri 9 bant, OPC 08 primeri 11 bant, OPC 09 primeri 9 bant, OPO 07 primeri 14 bant ve Tube A08 primeri 7 bant oluşturmuş olup, toplam bant sayısı 86'dır. C6 örneğinde OPC 01 primerinde donöre göre 1 yeni bant ortaya çıkmış, 4 bant kaybolmuştur. OPC 02 primerinde donöre göre yeni bant oluşmamış, kaybolan bant olmamıştır. OPC 05 primerinde donöre göre yeni bant oluşmamış, 2 bant kaybolmuştur. OPC 06 primerinde donöre göre 4 yeni bant oluşmuş, 2 bant kaybolmuştur. OPC 08 primerinde donöre göre yeni oluşan bant sayısı 1 olup, kaybolan bant sayısı 4'tür. OPC 09 primerinde donöre göre yeni bant oluşmamış, 1 bant kaybolmuştur. OPO 07 primerinde donöre göre 6 yeni bant oluşmuş, kaybolan bant sayısı 4'dir. Tube A08 primerinde donöre göre 7 yeni oluşan bant görülmüş olup ve kaybolan bant görülmemiştir. D6 donörü ve C6 klonu arasındaki polimorfizm yüzdesi 41,86 olarak bulunmuştur.

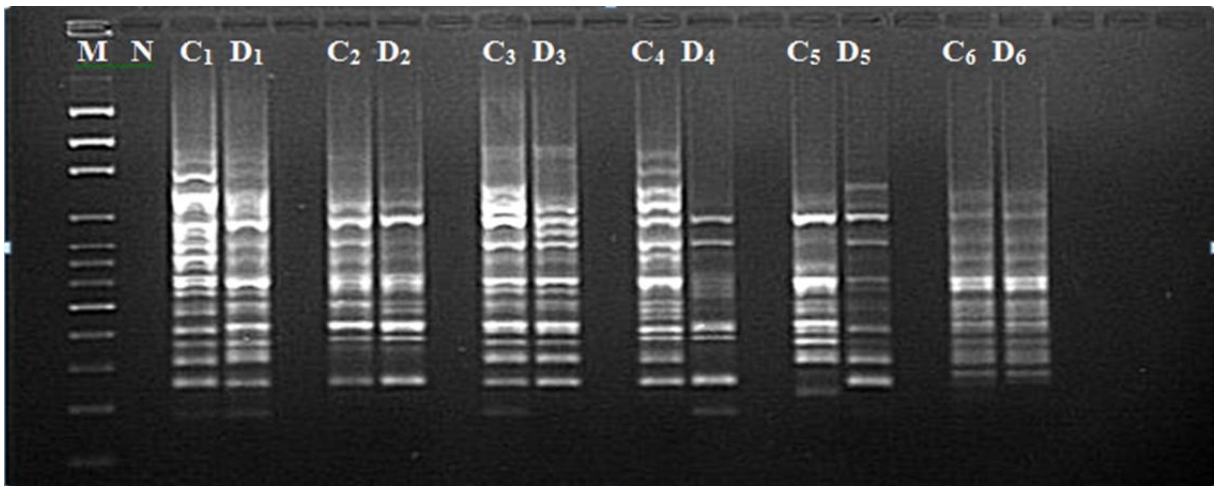
Çizelge 5.2'e en yüksek polimorfizm % 60,21 ile 4 nolu klon ve donör arasında görülmüş olup, 5 nolu klon ve donör arasında % 43,92, 6 nolu klon ve donör arasında % 41,86, 3 nolu klon ve donör arasında % 33,92, 1 nolu klon ve donör arasında % 30,43 ve en düşük polimorfizm % 17,07 ile 2 nolu klon ve donör arasında görülmüştür.

OPC 01



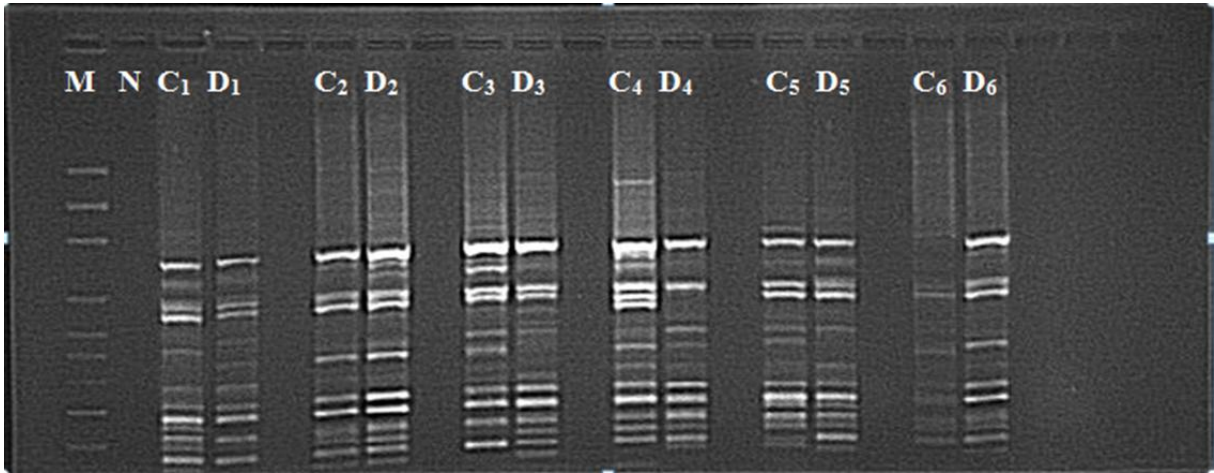
Şekil 5.1 OPC 01 primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (M: markör, N: negatif)

OPC 02



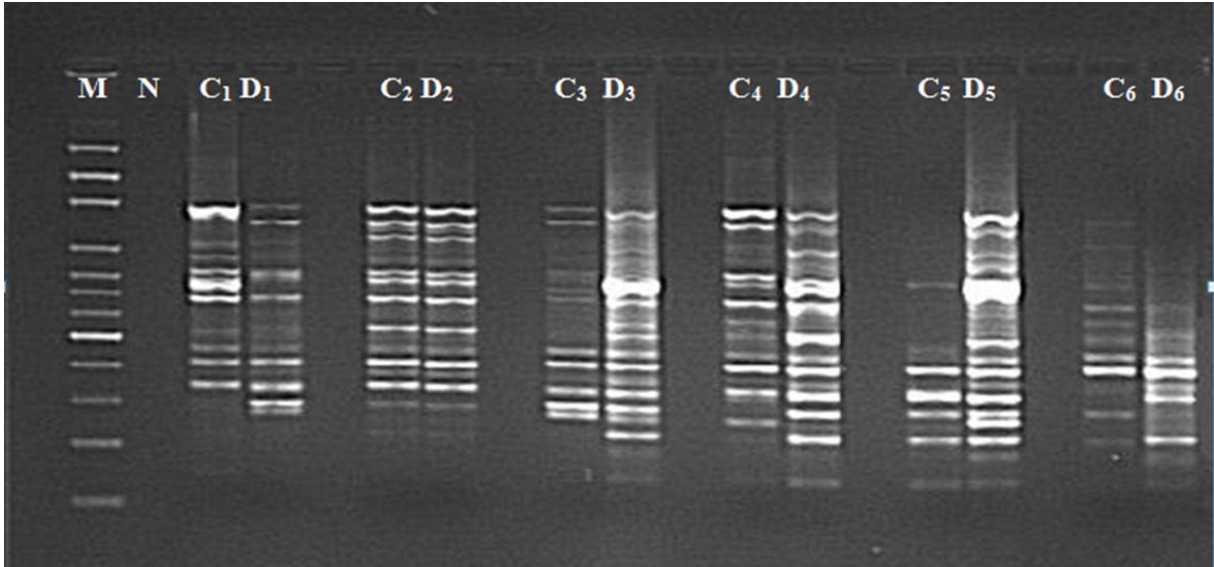
Şekil 5.2 OPC 02 primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (M: markör, N: negatif)

OPC 05



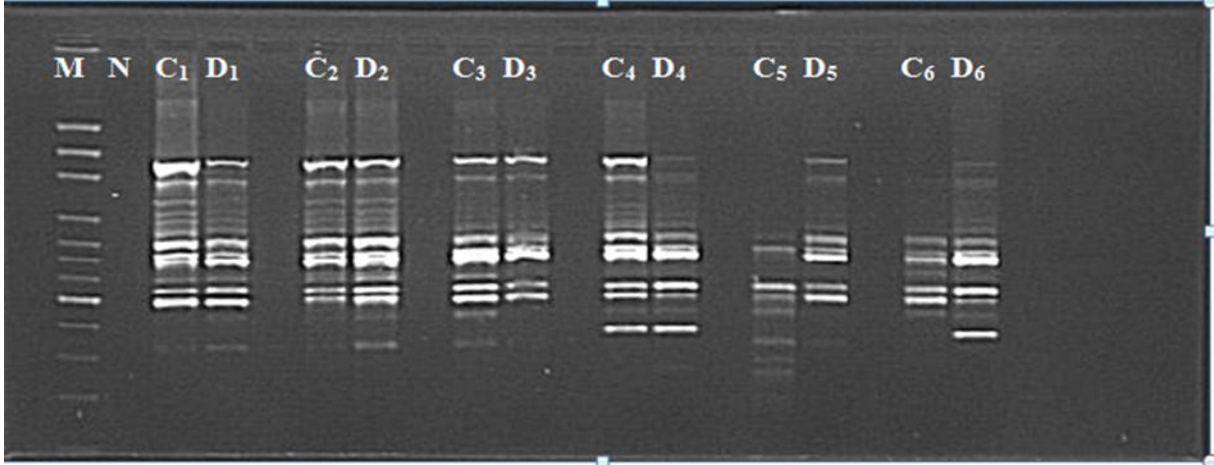
Şekil 5.3 OPC 05 primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (M: markör, N: negatif)

OPC 06



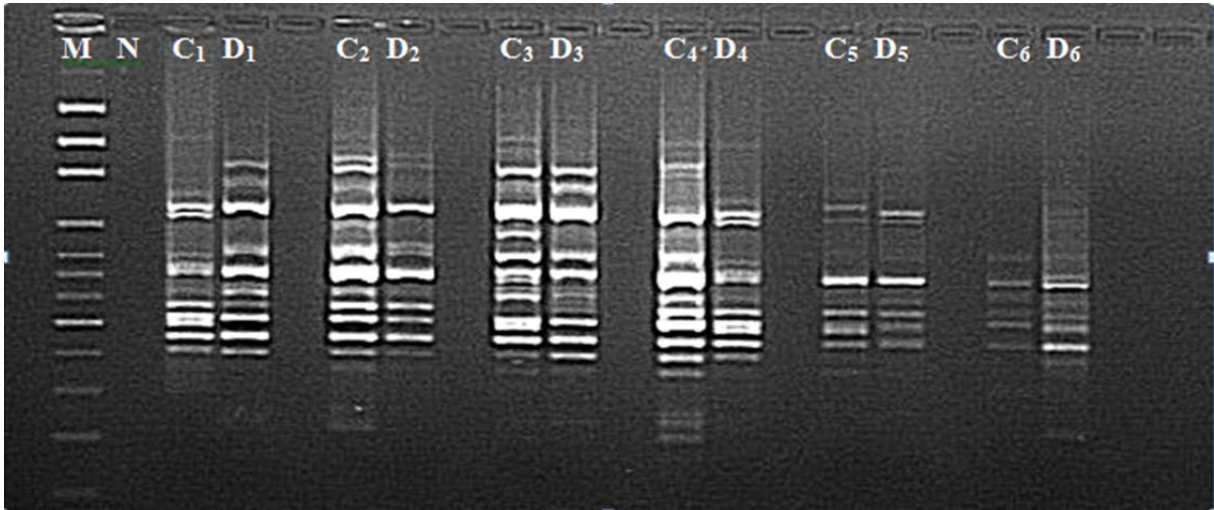
Şekil 5.4 OPC 06 primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (M: markör, N: negatif)

OPC 08



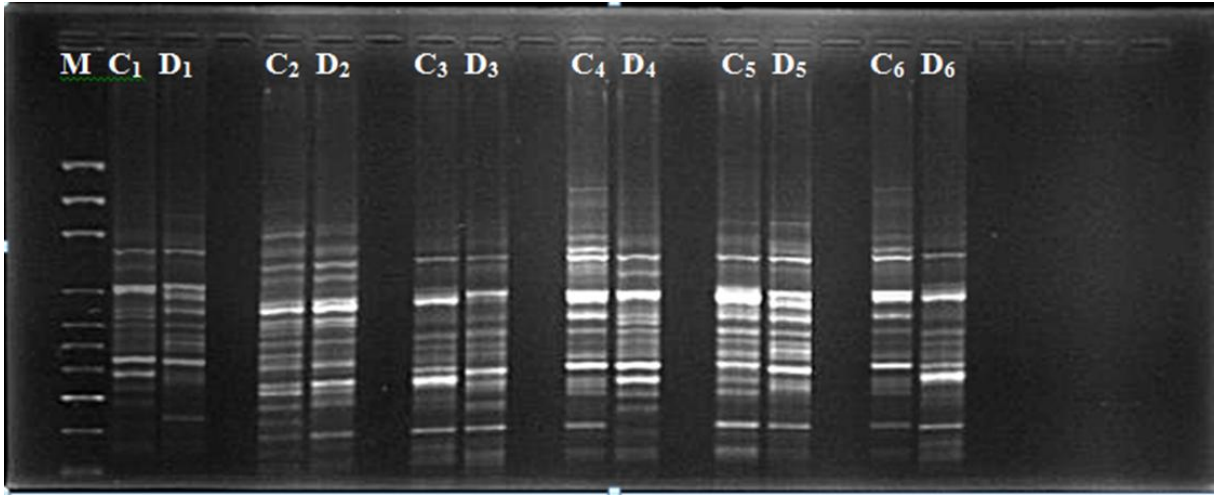
Şekil 5.5 OPC 08 primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (M: markör, N: negatif)

OPC 09



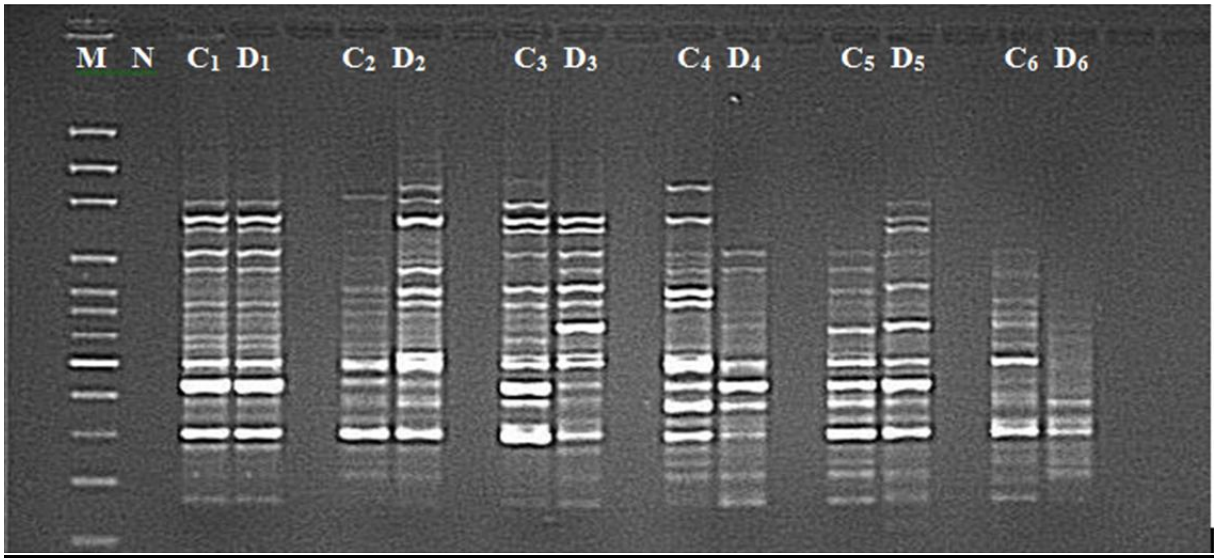
Şekil 5.6 OPC 09 primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (M: markör, N: negatif)

OPO 07



Şekil 5.7 OPO 07 primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (M: markör, N: negatif)

TUBE A08



Şekil 5.8 Tube A08 primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (M: markör, N: negatif)

BÖLÜM 6

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada doğal tetraploid *T. pratense* L.'de somaklonal varyasyon donör ve klon bitkiler arasında RAPD analizi ile belirlenmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında doğal tetraploid *T. pratense* tohumları kullanılarak aseptik fideler üretilmiş, rejenerasyon çalışmaları Çölgeçen ve Toker, 2008 'e göre yapılmıştır. Bitki doku kültürü teknikleriyle klon bitkileri üretmek için eksplant kaynağı olarak apikal meristem kullanılmıştır. Çalışmamızda rejenerasyon süreci kontaminasyon olmadan sorunsuz gerçekleştirilmiştir.

Bitki dokusunun yaşı DNA kalite ve miktarını etkilemektedir. Olgun yapraklardan elde edilen DNA'nın saflaştırılması, kalın hücre duvarı, polisakkaritler ve fenolik bileşikler nedeniyle zordur (Scarafani and Duranti 2001). Bu nedenle çalışmamızda genç aseptik fideler kullanılmıştır.

Bitkilerden DNA izolasyonu, moleküler düzeyde yapılacak analizlerin başlangıç noktasıdır. Bitkilerden DNA izolasyon metodu, bitkinin türüne ve dokusunun tipine göre belirlenmektedir. Bitkilerden genomik DNA izolasyonu için farklı protokoller bulunmaktadır. Ancak farklı bitkilerin kimyasal içerikleri de farklı olduğundan birbirine yakın türler için bile özel genomik DNA izolasyonu gerekli olabilmektedir. DNA izolasyonunda başarı; DNA'nın miktarı, kalitesi ve kullanılabilirliği ile ölçülmektedir (Kaçar 2003). Literatürde bulunan, bitkilere özgü DNA ekstraksiyon yöntemleri her zaman her bitki için aynı sonuçları vermemektedir. Bu durum bitkinin içerdiği fenolik bileşiklerden kaynaklanıyor olabilir. Modifiye CTAB yöntemi kullanarak *Trifolium* 'dan DNA izolasyonunu gerçekleştirilmiştir (Isobe et al. 2009) Fenolik bileşiklerin kirliliğe neden olmasından dolayı çalışmamızda genç fideler kullanılmış ve DNA izolasyon metodu olarak Lefort (1998) kullanılmıştır.

DNA'lar kalite bakımından değerlendirildiğinde, kaliteli DNA'larda saflığın A260/A280 oranının yaklaşık 1,8-2,0 civarında olması beklenmektedir. Elde edilen değerlerin 2'den

yüksek olması; örneğin RNA, kloroform ya da fenol ile kirli olduğunu ve 1,8 değerinden düşük olması örnek içinde proteinler ya da fenolik bileşikler bulunduğunun göstergesidir (Hoisington, 1992). Bu çalışmada uygulanan yöntemde elde edilen DNA saflık oranları 1,49-2,07 arasında bulunmuştur. Elde edilen genomik DNA'nın miktarı ve saflığı nanodrop ile ölçülmüştür (Çizelge 4.3). Aynı zamanda izolasyon sonucunda elde edilen DNA'ların agaroz jel görüntülerine bakıldığında, tek bir bant gözlenmiştir. Tek bant görülüyor olması RNA ve hücre sekonder metabolitlerinden arınmış, sarmal yapılarını koruyarak, parçalanmamış genomik DNA eldesinin göstergesidir (Karataş ve Ağaoğlu 2006).

In vitro ortamda yetiştirilen doğal tetraploid *T. pratense*'de görülen değişiklikler RAPD analizleri sonucunda 8 RAPD primerinde (OPC-01, OPC-02, OPC-05, OPC-06, OPC-08, OPC-09, OPO-07 ve Tube A08) gözlenen farklı DNA bantları ile genetik olarak tespit edilmiştir. Kullandığımız tüm primerler polimorfizm göstermiş olup, yapılan literatür çalışmasında Fabaceae familyasındaki farklı türlerde de kullanılan aynı primerlerin polimorfizm gösterdiği belirlenmiştir (Hossain et al. 2003, Patil et al. 2013). Kullanılan primerlerin amplifikasyon dereceleri ve bant sayıları farklı olup, bütün primerler polimorfizm göstermiştir. Genetik düzeyde incelenen bu değişiklikler elde edilen aseptik fidedelerde somaklonal varyasyonun varlığını göstermiştir.

Yaygın olarak moleküler tanımlamada kullanılan RAPD yönteminin başarısı, az miktardaki DNA ile yüksek oranda polimorfizm yakalamasıdır (Williams et al. 1990). Çalışmamızda az miktarda DNA ile RAPD analizi gerçekleştirilerek farklı oranlarda varyasyona rastlanmıştır. Somaklonal varyasyonun belirlenmesine yönelik çalışmamızda RAPD bant profillerinde farklı polimorfizm oranları görülmüştür. En düşük polimorfizm oranı (%17,07) 2 numaralı klon ve donör arasında (D₂-C₂) görülürken, en yüksek polimorfizm oranı (%60,21) 4 numaralı klon ve donör arasında (D₄-C₄) görülmektedir. Donörler arasındaki en fazla varyasyon farkı D₂ (toplam 123 bant) ile D₆ (toplam 86 bant) arasında görülmektedir. Yapılan literatür araştırmasında da farklı polimorfizm oranlarına sahip örneklerle rastlanılmıştır. Domateste rejenerant bitkinin ana bitkiye benzerliği % 95 'den fazla olarak bildirilmiştir (Soniya et al 2001). *Arabidopsis thaliana* 'da aynı eksplanttan elde edilen rejenerant bitkiler arasındaki polimorfizm oranı % 66,6, rejenerant bitkiler arasındaki polimorfizm oranı ise % 40 olarak bulunmuştur (Polanco and Ruiz 2002). *Capsicum annuum* rejenerantları arasındaki varyasyon yüzdesi % 1,3 ile % 3,8 arasında değişkenlik göstermiştir (Hossain et al. 2003). *Vigna unguiculata* 'da polimorfizm oranı % 72,82 olarak bulunmuştur (Patil et al. 2013).

Çalışmamızda görülen yüksek polimorfizm yüzdeleri somaklonal varyasyonun nedenlerinden biri olan ploidi kaynaklı olarak yorumlanabilir. Deney bitkimiz olan *T. pratense* 'nin doğal tetraploid olması polimorfizm yüzdesini artırmış olabilir.

Sonuç olarak doğal tetraploid *T. pratense* 'de rejenerasyon çalışmaları yapılmış olmasına rağmen literatürde doku kültürü teknikleriyle üretilmiş donör-rejenerantlar arası somaklonal varyasyonun belirlenmesine dair bir çalışma bulunmamaktadır. Mevcut çalışmamızla donör ile rejenerantlar arası varyasyon belirlenmiş, aynı zamanda çalışmamız genotip üzerinden tamamlanmıştır.

Çalışmamızda tohum tutma problemi bulunan doğal tetraploid *T. pratense* L.'nin bitki doku kültürü yöntemleriyle üretiminde somaklonal varyasyon oranları belirlenmiştir. Bu noktadan itibaren bu bitkinin yem ve tıbbi bitki olarak kullanılması sırasında varyasyonun oranları bilindiği için rejenerantlar ile üretimi yapılabilir. Yüksek oranda somaklonal varyasyon gösteren bireyler ürettikleri ilaç hammaddesi olabilecek sekonder metabolitler açısından farklı değerler gösterirlerse, yeni çeşitlerin üretimi de mümkün olabilir. Böylece bu tez çalışmasıyla ortaya konulan veriler doğal tetraploid *T. pratense* 'nin yem bitkisi ve tıbbi bitki açısından farklı kullanım alanlarındaki veriminin optimizasyonuna yardımcı olacaktır. Düşük oranda varyasyon gösteren klonların çoğaltılması optimizasyon işlemlerinin daha rahat yapılmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Abu-Qaoud H, Abu-Rayya A, Yaish S** (2010) *In vitro* regeneration and somaclonal variation of *Petunia hybrida*. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 18: 71-81.
- Algan G, Bakar HN** (1996). Light and electron microscopic examination of the embryo and endosperm development in the natural tetraploid *Trifolium pratense* L. *Israel J. Plant Science*, 44: 273-288.
- Algan G, Büyükkartal NH** (1999) Tetraploid Çayırüçgülü (*Trifolium pratense* L.)'nde apomiktik gelişme. *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, 23: 519-525.
- Babaoğlu M, Gürel E ve Özcan S** (2001) Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları. *Selçuk Üniversitesi Basımevi*, 374.
- Bernatzky R, Tanksley SD** (1989) Restriction fragments as molecular markers for germplasm analysis and utilization. *The Use of Plant Genetic Resources*, Cambridge University Pres., Cambridge. 253-362.
- Bhojwani SS** (1981) A tissue culture method for propagation and low temperature storage of *Trifolium repens* genotypes. *Physiol. Plant.*, 52: 187-190.
- Bhojwani SS, Mullins K and Cohen D** (1984) Intra-varietal variation for *in vitro* plant regeneration in the genus *Trifolium*. *Euphytica*, 33: 915-921.
- Bond JE, Webb KJ** (1989) Regeneration and analysis of plants from stolon segments of *Trifolium repens* (white clover). *Plant Science*, 61: 119-125.
- Bouman H, DeKlark GJ** (2001) Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions, comparison of three assays. *Theor Appl.Genet.*, 102: 111-117.
- Bouiamrine E. H, Diouri M, Halimi R. E** (2012) Assessment of somaclonal variation in regenerated plants from immature embryos culture of durum Wheat. *International Journal of Agriculture and Biology*, 14: 941- 946.
- Bürün B** (1996) Doku Kültürü ve Bitki Islahı. *Hasad*, 133: 35-36.
- Büyükkartal NH** (2012) *Trifolium pratense* L. (Elçi çayırüçgülü-Fabaceae)' de integüment gelişimi. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 1: 51-59.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Campos-de Quiroz H, Ortega-Klose F** (2001) Genetic variability among elite red clover (*Trifolium pratense* L.) parents used in Chile as revealed by RAPD markers. *Euphytica*, 122: 61-67.
- Cebat J, Kruczkowska H, Miszke W, Pawlowska H and Skucinska B** (1990) Micropropagation of red clover (*Trifolium pratense* L.) from flower heads. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 32: 236- 242.
- Chamandoosti F, Azad H. A** (2012) Somaclonal variation in resistance of canola (*Brassica napus* L.) to sclerotinia stem root. *International journal of Agronomy and Plant Production*, 12: 613- 617.
- Chen L, Yamaguchi S** (2005) RAPD markers for discriminating tea germplasm at the inter specific level in China. *Plant Breeding*, 124: 404-409.
- Chao S, Sharp PJ, Worland AJ, Worham EJ, Koeber RMD, Gale MP** (1989) RFLP-based genetic maps of wheat homeologous group 7 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.*, 78: 495-504.
- Choo T M** (1988) Plant regeneration in zigzag clover (*Trifolium medium* L.). *Plant Cell Reports*, 7: 246-248.
- Cloutier S, Landry BS** (1994) Molecular markers applied to plant tissue culture. *In vitro Cell Dev. Biol Plant.*, 30: 32-39.
- Çölgeçen H and Toker MC** (2008) Plant regeneration of natural tetraploid *Trifolium pratense* L. *BiolRes.*, 41: 25-31.
- Çölgeçen H, Koca U, Büyükkartal HN** (2011) Use of Red Clover (*Trifolium pratense* L.) seeds in Human Therapeutics. *Nuts and Seeds in Health and Disease Provention* Chapter 115: 975-980.
- De Klerk GJ** (1990) How to measure somaclonal variation. *Acta bot. Neerl.*, 39(2): 129-144.
- Dias PMB, Julier B, Sampaux JP, Barre P, Agnol MD** (2008) Genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) revealed by morphological and microsatellite (SSR) markers. *Euphytica*, 160: 189-205.
- Emiroğlu Ü, Gürel A** (1993) Bitki Islahında Modern Biyoteknoloji. The Biotechnology Revolution Short Course, February 8-12, s.94-125, Bornova, İzmir.
- Evans DA, Sharp WR, Medina-Filho HP** (1984) Somaclonal and Gametoclonal Variation. *Amor.J.Bot .*, 71(6): 759-774.
- Evans DA, Sharp WR** (1986) Applications of somaclonal variation. *Nature Biotechnology*, 4: 528-532.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Evans DA** (1989) Somaclonal variation-Genetic basis and breeding applications. *Trends in Genetics*, 5: 46-50.
- Fras A, Maluszynska J** (2003) Regeneration of diploid and tetraploid plants of *Arabidopsis thaliana* Via Callus. *Acta Biology Cracoviensiaa Series Botanica*, 45/2: 145- 152.
- Greene SL, Gritsenko M, Vandemark G** (2004) Relating morphologic and RAPD marker variation to collection site environment in wild populations of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51: 643-653.
- Gresshoff PM** (1980) In vitro culture of white clover: Callus, suspension, protoplast culture, and plant regeneration. *Bot. Gaz.*, 141: 157-164.
- Grosser JW and Collins GB** (1984) Isolation and culture of *Trifolium rubens* protoplasts with whole plant regeneration. *Plant Science Letters*, 37: 165-170.
- Gonzales AI, Pelaez MI, Ruiz ML** (1996) Cytogenetic variation in somatic tissue cultures and regenerated plants of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Euphytica*, 91: 37-43.
- Hossain A, Konisho K, Minami M, Nemoto K** (2003) Somaclonal variation of regenerated plants in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Euphytica*, 130: 233-239.
- Isobe S, Kölliker R, Hisano H, Sasamoto S, Wada T, Klimenko I, Okumura K, Tabata S** (2009) Construction of a consensus linkage map for red clover (*Trifolium pratense* L.). *BMC Plant Biology*, 9: 57.
- Kaepler SM, Kaepler H, Rhee Y** (2000) Epigenetic aspect of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*, 43: 179–188.
- Karataş A, Ağaoğlu YS** (2006). Güneydoğu Anadolu Bölgesi Üzüm Çesitlerine Ait DNA'ların Miktar ve Saflikları Üzerine Bir Araştırma. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 10: 83-90.
- Keyes GJ, Collins GB, Taylor NL** (1980) Genetic variation in Tissue Cultures of Red Clover. *Theor.Appl.Genet.*, 58: 265-271.
- Kongkiatngam P, Waterway MJ, Fortin MG, Coulman BE** (1995) Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) comparisons of morphological, isozyme and RAPD markers. *Euphytica*, 84: 237-246.
- Kongkiatngam P, Waterway MJ, Coulman BE, Fortin MG** (1996) Genetic variation among cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) detected by RAPD markers amplified from bulk genomic DNA. *Euphytica*, 89: 355-361.
- Konieczny R** (1995) Plant regeneration in callus culture of *Trifolium nigrescens* Viv. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 37: 47-53.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Larkin PJ, Scowcroft WR** (1981) Somaclonal variation-A novel Source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor.Appl.Genet.*, 60: 197-214.
- Lee M, Philips RL** (1988) The chromosomal basis of somaclonal variation. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 39: 413-437.
- Lefort F, Lally M, Thompon D, Douglas GC** (1998) Morphological traits microsatellite fingerprinting and genetic relatedness of a stand of elite Oaks. *Silvae Genetica*, 47: 5-6. Ireland.
- MacLean NL, Nowak J** (1989) Plant regeneration from hypocotyls and petiole callus of *Trifolium pratense* L. *Plant Cell Reports*, 8: 395-398.
- Masoud S, Hamta A** (2008) Cytogenetic analysis of somaclonal variation in regenerated plants of Berseem clover (*Trifolium alexandrium* L.). *Caryologia*, 4: 392-396.
- Munir F, Naqvi SMS, Mahmood T** (2011) *In vitro* culturing and assessment of somaclonal variation of *Solanum tuberosum* var. desiree. *Turkish Journal of Biochemistry*, 36: 296-302.
- Munthali MT, Newburry HJ, Ford-Lloyd BV** (1996) The detection of somaclonal variants of beet using RAPD. *Plant Cell Reports*, 15: 474-478.
- Murashige T and Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15: 473-497.
- Orton TJ** (1983) Experimental Approaches to the study of somaclonal variation. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1: 67-76.
- Radionenko MA, Kuchuk NV, Khvedynich OA, Gleba YY** (1994) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplast of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Plant Science*, 97: 75-81.
- Ruiz ML, Rueda J, Pelaez MI, Espino FJ, Candela M, Sendino AM, VazquezAM** (1992) Somatic embryogenesis, plant regeneration and somaclonal variation in barley. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 28: 97-101.
- Patil D M, Sawardekar SV, Gokhale NB, Bhawe SG, Sawant SS, Sawantdesai SA, Lipne KA, Sabale SN and Joshi SN** (2013) Genetic diversity analysis in cowpea by using RAPD markers. *International Journal of Innovative Biotechnology and Biochemistry*, 1: 15-23.
- Peschke VM, Philips RL** (1992) Genetic implications of somaclonal variation in plants. *Advances in Genetics*. 30: 41-75.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Phillips GC, Collins GB** (1979) In vitro tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Science*, 19: 59-64.
- Phillips GC, Collins GB** (1979) Virus symptom-free plants of red clover using meristem culture. *Crop Science*, 19: 213-216.
- Pontaroli A. C, Camadro E. L** (2005) Somaclonal variation in *Asparagus officinalis* plants regenerated by organogenesis from long-term callus cultures. *Genetics and Molecular Biology*, 3: 423- 430.
- Polanco C, Ruiz ML** (2002) AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. *Plant Science*, 162: 817-824.
- Sahrijram L, Soneji JR, Bollamma KT** (2003) Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.) *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 39: 551-556.
- Saker MM, Bekheet SA, Taha HS, Fahmy SA, Moursy HA** (2000) Detection of somaclonal variations in tissue culture-derived date palm plants using isoenzyme analysis and RAPD fingerprints. *Biologia Plantarum*, 43: 347-351.
- Soniya EV, Banerjee NS, Das MR** (2011) Genetic analysis of somaclonal variation among callus-derived plants of tomato. *Current Science*, 80: 1213-1215.
- Vazquez AM** (2001) Insight into somaclonal variation. *Plant Biosystems*, 135: 57-62.
- Veilleux RE, Johnson AAT** (1998) Chapter 6. Somaclonal variation: Molecular Analysis, Transformation Interaction, and Utilization. *Plant Breeding Reviews*, Volume 16.
- Wang H, Holl FB** (1988) *In vitro* culture and the incidence of somaclonal variation in regenerated plants of *Trifolium pratense* L. *Plant Science*, 55: 159-167.
- White DWR, Bhojwani SS** (1981) Callus formation from *Trifolium arvense* protoplast-derived cells plated at low densities. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.*, 102: 257-261.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV** (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6531-6535.
- Zagorska N, Abadjieva M, Chalukova M, Achkova Z, Nikova V**(1985) Somaclonal variation in tobacco and tomato plants regenerated from tissue cultures. Proceedings of an International Symposium on Nuclear Techniques and *in vitro* Culture for Plant Improvement, pp. 349-356, Vienna, 19-23 August, 1985.

ÖZGEÇMİŞ

Yeşim Korkmaz, 1986 yılında Zonguldak Devrek'te doğdu. Fatih ilköğretim Okulundan mezun olduktan sonra orta ve lise öğrenimini tamamladığı Devrek Anadolu Lisesi'ni kazandı. 2007 yılında Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2011 yılında Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı.

ADRES BİLGİLERİ

Adres : Aydoğmuş Sok. İncivez Mah. Mevsim Evleri B Blok Kat:5 No:13
67100 Merkez/Zonguldak

Tel : (532) 391 67 47

E-posta: ysmkorkmazfb@hotmail.com