

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANA BİLİMDALI

RELİKT-ENDEMİK TIBBİ-AROMATİK *Liquidambar
orientalis* Miller'İN MERİSTEM KÜLTÜRÜ
YÖNTEMİYLE GENETİK OLARAK KARARLI *IN*
VITRO PROPAGASYONU ÜZERİNDE BOR
TUZLARININ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Taner MERCAN

Haziran 2022
MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANA BİLİMDALI

RELİKT-ENDEMİK TIBBİ-AROMATİK *Liquidambar*
***orientalis* Miller'İN MERİSTEM KÜLTÜRÜ**
YÖNTEMİYLE GENETİK OLARAK KARARLI *IN*
***VITRO* PROPAGASYONU ÜZERİNDE BOR**
TUZLARININ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Taner MERCAN

Haziran 2022
MUĞLA

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

Taner MERCAN tarafından hazırlanan **RELİKT-ENDEMİK TIBBİ-AROMATİK *Liquidambar orientalis* Miller'İN MERİSTEM KÜLTÜRÜ YÖNTEMİYLE GENETİK OLARAK KARARLI *IN VITRO* PROPAGASYONU ÜZERİNDE BOR TUZLARININ ETKİSİNİN İNCELENMESİ** başlıklı tezin 14/06/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Doç. Dr. Rukiye BORAN GÜLEN (**Jüri Başkanı**)

İmza:

Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Bölümü
Aksaray Üniversitesi, Aksaray

Doç. Dr. Ergun KAYA (**Danışman**)

İmza:

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Dr. Öğr. Üyesi Filiz ALTAN (**Üye**)

İmza:

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

BÖLÜM BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Reşat ÜNAL (**Bölüm Başkanı/Anabilim Dalı Başkanı**) İmza:

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Doç. Dr. Ergun KAYA (**Danışman**)

İmza:

Danışman, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Savunma Tarihi: 13/06/2022

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Taner MERCAN

13/06/2022

ÖZET

RELİKT-ENDEMİK TIBBİ-AROMATİK *Liquidambar orientalis* Miller'İN MERİSTEM KÜLTÜRÜ YÖNTEMİYLE GENETİK OLARAK KARARLI *IN VITRO* PROPAGASYONU ÜZERİNDE BOR TUZLARININ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Taner MERCAN

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ergun KAYA

Haziran 2022, 92 sayfa

Altinigaceae familyasına ait Anadolu Sığlası (*Liquidambar orientalis* Miller) dere yatakları ve bataklıklar başta olmak üzere sulak alanlarda yetişen relikt-endemik, tıbbi aromatik bir bitkidir. Doğal plantasyon olarak sadece Türkiye'nin güneybatısında, özellikle Muğla ilinde yetişen Anadolu Sığlası'na antik dönemden beri ilgi duyulmuştur. Özellikle Muğla bölgesi için son derece önemli olan bu bitkinin doğada devamlılığı su kaynaklarının yok olması ve kontrolsüz tarım uygulamaları sebebiyle tehlike altındadır. Genellikle tohumla çoğaltımının yapılması sebebiyle generatif çoğaltım sonucunda ana materyalin karakteristik özelliklerinde oluşabilecek kayıpları en aza indirmek adına *Liquidambar orientalis* bitkisinin klonal üretimlerinin daha çok tercih edilmesi gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında relikt-endemik bir bitki türü olan *Liquidambar orientalis* (Anadolu Sığlası)'ın meristem kültürü yöntemi ile genetik olarak kararlı *in vitro* çoğaltımında bor tuzlarının etkileri incelenmiştir. Anadolu Sığlası (*L. orientalis*) popülasyonun doğal yayılış alanlarından toplanan tohumlar, başarılı bir yüzey sterilizasyonunun ardından, WPM besin ortamında çimlendirilerek başarılı bir şekilde *in vitro* kültür başlatılmıştır. Tohum çimlenmesinin ardından gelişen mikro-sürgünler 6-8 ay düzenli aralıklarla alt kültürlenerek temel bor tuzu uygulamalarında kullanılabilecek sayıda mikro-sürgün elde edilmiştir. En iyi gelişim gösteren bitkiye ait 3 klon seçilerek, farklı derişimlerde 4 farklı bor tuzu uygulaması yapılmıştır. Meristematik gelişim sonrası, 4 farklı bor tuzu, her bor tuzunun 1, 3 ve 5 mg/l dozları ve hiçbir tuz uygulanmayan kontrol grubuna aither bir örnekten toplamda 37 DNA örneği izole edilmiştir. Başarılı bir şekilde izole edilen DNA'lar kalıp olarak kullanılarak 10 farklı ISSR primeri ile gerçekleştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) sonrasında en fazla bant profili veren 5 ISSR primeri seçilmiştir. Bu beş primer kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonrası elde edilen ürünler etidyum bromür ile boyandıktan sonra UV transilluminator jel görüntüleme cihazında görüntülenmiştir.

Görüntülenen bant profillerinin 1/0 skorlanması sonucu elde edilen veriler analiz edilmiştir.

Çalışmamızda üç farklı konsantrasyonda dört farklı bor tuzu (borik asit, sodyum perborat, sodyum metaborat ve disodyum oktaborat) bor mikroelement kaynağı olarak kullanılmış olup, kontrol grubu ile kıyaslandığında 3mg/l borik asit ve 5mg/l sodyum perborat uygulamalarında oluşan gövde sayılarında bir artış görülürken, 5mg/l disodyum oktaborat uygulamasının da gövde uzaması üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Eksplant kaynağı olarak meristem dokuları kullanılan Anadolu Sığılası bitkilerinin in vitro rejenerasyonu sonrası sürgünlerinden izole edilen DNA'lar kullanılarak gerçekleştirilen ISSR PCR reaksiyon analizlerinde, 5mg/l disodyum oktaborat uygulama sonrası en düşük (%30,77), 1 mg/l borik asit uygulama sonrası ise en yüksek (%49,45) oranlarda polimorfizm belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Endemik, ISSR, mikroçoğaltım, bor, meristem, *Liquidambar orientalis*



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF BORON SALTS ON GENETICALLY STABLE *IN VITRO* PROPAGATION BY RELIKT- ENDEMIC MEDICAL-AROMATIC *Liquidambar orientalis* Miller'S MERISTEM CULTURE METHOD

Taner MERCAN

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ergun KAYA

June 2022, 92 pages

Anatolian Sweetgum (*Liquidambar orientalis* Miller), belonging to the Altingiaceae family, is a relict-endemic, medicinal aromatic plant that grows in wet areas, especially in stream beds and marshes. Anatolian Sweetgum, which grows as a natural plantation only in the south-west of Turkey, especially in the province of Muğla, has been of interest since ancient times. The continuity of this plant, which is extremely important especially for the Muğla region, is in danger due to the destruction of water resources and uncontrolled agricultural practices. Due to the fact that it is usually propagated by seeds, clonal production of *Liquidambar orientalis* plant should be preferred more in order to minimize the losses that may occur in the characteristic properties of the parent material as a result of generative propagation.

In this thesis, the effects of boron salts on the genetically stable *in vitro* propagation of *Liquidambar orientalis* (Anatolian Sweetgum) that a relict-endemic plant species by meristem culture method, were investigated. Seeds collected from the natural distribution areas of the Anatolian Sweetgum (*L. orientalis*) population were successfully germinated in WPM nutrient medium after successful surface sterilization and *in vitro* culture was successfully started. Micro-sprouts developed after seed germination were subcultured at regular intervals of 6-8 months to obtain a sufficient number of micro-sprouts that could be used in basic boron salt applications. Three clones of the best growing plant were selected and 4 different boron salts were applied at different concentrations. After meristematic development, a total of 37 DNA samples were isolated from each sample of 4 different boron salts, 1, 3 and 5 mg/l doses of each boron salt, and the control group to which no salt was administered. After the Polymerase Chain Reaction (PCR) performed with 10 different ISSR primers, using successfully isolated DNAs as templates, 5 ISSR primers with the highest band profile were selected. The products obtained after PCR using these five

primers were visualized in a UV transilluminator gel imaging device after staining with ethidium bromide. The data obtained as a result of 1/0 scoring of the displayed band profiles were analyzed.

In our study, four different boron salt (boric acid, sodium perborate, sodium metaborate and disodium octoborate) were used as a boron microelement source in three different concentrations, compared with the control group, while an increase in the number of body in 3mg/l boric acid and 5mg/l sodium perborate applications, 5mg/l Disodium octoborate application has also been found to have an effect on body elongation. In the ISSR PCR reaction analyzes performed using DNAs from the *in vitro* regeneration of the Anatolian Sweetgum plants used as the source of the Meristem tissues after *in vitro* regeneration, after the application of 5mg/l Disodium octoborate is the lowest (30.77%), application after the application of 1 mg/l boric acid at the highest (49.45%) polymorphism rates was determined

Keywords: Endemic, ISSR, micropropagation, boron, meristem, *Liquidambar orientalis*

Eşim, kızım ve oğluma...



ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince yardımlarını, desteğini ve en önemlisi güler yüzünü esirgemeyen sevgili danışman hocam Doç. Dr. Ergun KAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince bir süre beraber çalışma fırsatı bulduğum, bilgi ve birikimlerini benden esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Filiz ALTAN'a ve yoğun iş temposuna rağmen tez savunmamda jüri olarak değerli katkılar sağlayan saygıdeğer hocam Doç. Dr. Rukiye BORAN GÜLEN'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca her ihtiyacım olduğunda yanımda olan, beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum başta Araş. Gör. Selin GALATALI olmak üzere çok değerli laboratuvar arkadaşlarım Onur ÇELİK, Damla Ekin ÖZKAYA, Sevil AKYÜREK, Sevinç GÜLDAĞ, Bilge ÖZTÜRK, Hilal Büşra TOKGÖZ'e ve Bitki Biyoteknolojisi ve Genetiği laboratuvarımızın tüm üyelerine en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Tüm çalışmalarım benden desteklerini esirgemeyen, ikinci ailem, çalışma arkadaşlarım Muğla Büyükşehir Belediyesi Tarımsal Hizmetler Dairesi Başkanlığı personeline, kuruluşundan bu yana emek verdiğim ve en büyük desteği aldığım Muğla Büyükşehir Belediyesi Yerel Tohum Merkezi'ne tüm kalbimle teşekkür ediyorum.

En derin ve en hissiyatlı teşekkürlerimi ise, dualarıyla en büyük destekçim olan annem Ayşe MERCAN'a; beni her zaman yüreklendiren, sevgisini ve desteğini bir an bile benden esirgemeyen canım eşim Emine MERCAN'a ve en büyük hazinelerim, mutluluk ve enerji kaynaklarım kızım Elif Ayşe MERCAN ve oğlum Deniz Ege MERCAN'a sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	x
İÇİNDEKİLER	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xx
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	xxiv
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Liquidambar orientalis</i> ve Genel Özellikleri.....	1
1.2. <i>Liquidambar orientalis</i> 'in Morfolojik ve Anatomik Özellikleri	4
1.3. Sığla Yağı Üretimi	6
1.4. Mikroçoğaltım Yöntemleri.....	8
1.5. Genetik Kararlılığın Belirlenmesinde Moleküler Belirteçlerin Kullanılması.....	9
1.5.1. Moleküler belirteçler	10
1.5.1.1. Hibridizasyona dayalı belirteçler	10
1.5.1.2. PCR'a dayalı belirteçler	11
1.6. Bor Tuzlarının Bitki Büyüme Ve Gelişmesi Üzerindeki Etkileri	14
2. MATERYAL VE METOT.....	16
2.1. Bitki Materyali	16
2.2. Tohum Canlılık Testi	17
2.3. Tohum Çimlendirme	19
2.3.1. Kültür Kabı Seçimi	19
2.3.2. Besin Ortamlarının Hazırlanması.....	19
2.3.2.1. Murashige&Skoog Medium (MS) Besi Ortamı Hazırlığı.....	20
2.3.2.2. Woody Plant Medium (MS) Besi Ortamı Hazırlığı	21
2.3.2.3. Rugini Olive Medium (MS) Besi Ortamı Hazırlığı	22
2.3.3. Tohum Yüzey Sterilizasyonu	23

2.3.4. Tohum Ekimi	23
2.3.5. Çimlenme Sürecinin Takibi	24
2.4. Mikroçoğaltım Süreci	24
2.4.1. Kültür Kabı Seçimi	24
2.4.2. Besi Ortamı Hazırlığı	25
2.4.3. Eksplantların Hazırlığı ve Mikroçoğaltım	25
2.5. Meristem Kültürü Süreci	27
2.5.1. Bor Tuzları Seçimi	27
2.5.2. Kültür Kabı Seçimi	27
2.5.3. Deneme Deseninin Oluşturulması	27
2.5.4. Besi Ortamı Hazırlığı	28
2.5.5. Meristemlerin alınması ve Meristem Kültürü	28
2.6. Meristem kültürü yapılan <i>Liquidambar orientalis</i> bitkisinde genetik kararlılığın belirlenmesi	29
2.6.1. Genomik DNA İzolasyonu	29
2.6.2. DNA Konsantrasyonunun Tespiti	32
2.6.3. ISSR, PCR ve jel elektroforezi analizleri	32
2.6.4. Elektroforez aşaması	33
2.6.4.1. Agaroz jel hazırlanışı	33
2.6.5. Verilerin Değerlendirilmesi	33
3. BULGULAR	35
3.1. <i>In vitro</i> bor tuzu uygulamaları	35
3.1.1. Borik Asit Uygulamaları	36
3.1.2. Sodyum Perborat Uygulamaları	39
3.1.3. Sodyum Metaborat Uygulamaları	42
3.1.4. Disodyum Oktaborat Uygulamaları	45
3.2. Moleküler Analizler	48

3.2.1. ISSR Primeri Kullanılarak Gerçekleştirilen PCR Sonrasında Elde Edilen Örneklerle Ait Jel Elektroforezi Sonuçları.....	482
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	65
4.1. Bor tuzlarının <i>L. orientalis</i> mikro-sürgün gelişimi üzerinde etkileri	65
4.2. Bor tuzu uygulama sonrası <i>L. orientalis</i> mikro-sürgünlerinde genetik kararlılık	67
KAYNAKÇA	71
ÖZGEÇMİŞ.....	83



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Liquidambar cinsine bağlı türler ve dünyadaki yayılış alanları (Küçükala,A., ve ark., 2010))	2
Çizelge 1.2. Yıllara göre Sığla Yağı Üretimi (Bozkurt vd., 1989; Ürker, 2014).....	8
Çizelge 1.3. PCR temelli tekniklerin karşılaştırılması (Li ve Quiros 2001; Hilooğlu 2012)	12
Çizelge 2.1.Murashige&Skoog Medium (MS) Hazır Besi Ortamı içeriği.....	20
Çizelge 2.2.Woody Plant Medium (WPM) Hazır Besi Ortamı içeriği	21
Çizelge 2.3.Rugini Olive Medium (OM) Hazır Besi Ortamı içeriği.....	22
Çizelge 2.4. Meristem kültürü deneme deseni	28
Çizelge 2.5. DNA ekstraksiyonu için kullanılan CTAB solüsyonunun hazırlanması	31
Çizelge 2.6. CTAB solüsyon bileşenlerinin hazırlanması	31
Çizelge 2.7. DNA izolasyonu için kullanılan bileşenlerin uygulamadan önceki solüsyon karışım oranı	32
Çizelge 2.8. Williams ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve Martins-Lopes ve arkadaşlarına göre modifiye edilen PCR protokolü (Williams vd., 1990; Martins-Lopes vd., 2009).....	32
Çizelge 2.9. Martin-Lopez ve arkadaşları (Martins-Lopes vd., 2009) tarafından geliştirilmiş ISSR primerlerden proje çalışması için seçilen primerler ve dizileri.	33
Çizelge 2.10. Williams ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve Martins-Lopes ve arkadaşlarına göre modifiye edilen PCR protokolünün bileşenlerinin derişimleri (Kalendar vd., 2011; Smýkal vd., 2011)	33
Çizelge 3.1. 1mg/l benzil adenin ile desteklenen WPM besin ortamında gelişen kontrol grubu meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri	35
Çizelge 3.2. 1mg/l borik asit içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri...	36

Çizelge 3.3. 3mg/l borik asit içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri..	37
Çizelge 3.4. 5mg/l borik asit içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri...	38
Çizelge 3.5. 1mg/l sodyum perborat içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri.	39
Çizelge 3.6. 3mg/l sodyum perborat içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri.	40
Çizelge 3.7. 5mg/l sodyum perborat içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri.	41
Çizelge 3.8. 1mg/l sodyum metaborat içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri.	42
Çizelge 3.9. 3mg/l sodyum metaborat içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri.	43
Çizelge 3.10. 5mg/l sodyum metaborat içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri.	44
Çizelge 3.11. 1mg/l Disodyum Oktaborat içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri.	45
Çizelge 3.12. 3mg/l Disodyum Oktaborat içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri.	46

- Çizelge 3.13. 5mg/l Disodyum Oktaborat içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri. 47
- Çizelge 3.14. ISSR 1 primeri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin bant profillerinin 1/0 skor tablosu. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol. 50
- Çizelge 3.15. ISSR 1 primeri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin bant profillerinin 1/0 skor tablosu. SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol. . 51
- Çizelge 3.16. ISSR 1 primeri kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyon ürünlerinin jel görüntüsüne bağlı 1/0 skor değerlendirmesi sonucu kontrol grubu ile kıyaslanan bant profillerinden elde edilen polimorfizm değerleri. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l). 51
- Çizelge 3.17. ISSR 1 primeri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin bant profillerinin 1/0 skor tablosu. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol. 54
- Çizelge 3.18. ISSR 3 primeri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin bant profillerinin 1/0 skor tablosu. SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol. . 55
- Çizelge 3.19. ISSR 3 primeri kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyon ürünlerinin jel görüntüsüne bağlı 1/0 skor değerlendirmesi sonucu kontrol grubu ile

- kıyaslanan bant profillerinden elde edilen polimorfizm değerleri. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l). 56
- Çizelge 3.20. ISSR 7 primeri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin bant profillerinin 1/0 skor tablosu. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol. 59
- Çizelge 3.21. ISSR 7 primeri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin bant profillerinin 1/0 skor tablosu. SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol. . 60
- Çizelge 3.22. ISSR 7 primeri kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyon ürünlerinin jel görüntüsüne bağlı 1/0 skor değerlendirmesi sonucu kontrol grubu ile kıyaslanan bant profillerinden elde edilen polimorfizm değerleri. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l). 61
- Çizelge 3.23. ISSR 826 primeri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin bant profillerinin 1/0 skor tablosu. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.. 64
- Çizelge 3.24. ISSR 826 primeri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin bant profillerinin 1/0 skor tablosu. SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı

- bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol..... 65
- Çizelge 3.25. ISSR 826 primeri kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyon ürünlerinin jel görüntüsüne bağlı 1/0 skor değerlendirmesi sonucu kontrol grubu ile kıyaslanan bant profillerinden elde edilen polimorfizm değerleri. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l)..... 66
- Çizelge 3.26. ISSR E.D.4 primeri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin bant profillerinin 1/0 skor tablosu. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol..... 69
- Çizelge 3.27. ISSR E.D.4 primeri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin bant profillerinin 1/0 skor tablosu. SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol..... 70
- Çizelge 3.28. ISSR E.D.4 primeri kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyon ürünlerinin jel görüntüsüne bağlı 1/0 skor değerlendirmesi sonucu kontrol grubu ile kıyaslanan bant profillerinden elde edilen polimorfizm değerleri. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l)..... 71
- Çizelge 3.29. ISSR1, ISSR3, ISSR7, ISSR826, ISSRE.D.4 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyon ürünlerinin jel görüntüsüne bağlı 1/0 skor değerlendirmesi sonucu kontrol grubu ile kıyaslanan tüm bant

profillerinden elde edilen polimorfizm değerleri. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l)..... 72



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Türkiye’de Sığla yayılış alanları (Çengel ve ark., 2008)	2
Şekil 1.2. Liquidambar orientalis Miller yaprağı	5
Şekil 1.3. Liquidambar orientalis Miller meyvesi.....	5
Şekil 1.4. Anadolu Sığla ağacının gövdesi üzerinde yağ alımı için açılan yara dokusu ve yaralardan sızan sığla yağı	7
Şekil 2.1. Anadolu Sığlası (Liquidambar orientalis Mill.) tohumları	16
Şekil 2.2. Anadolu Sığlası (Liquidambar orientalis Mill.) tohumu	17
Şekil 2.3. Canlılık gösteren Anadolu Sığlası tohumu	18
Şekil 2.4. Canlılık göstermeyen Anadolu Sığlası tohumu	18
Şekil 2.5. SPL Life Science Plant Culture Dish.....	19
Şekil 2.6 Magenta® kültür kabı	24
Şekil 2.7. Anadolu Sığlası eksplantları	26
Şekil 2.8. Meristem kültürü için yetiştirilen Anadolu Sığlası bitkileri	26
Şekil 2.9. Anadolu Sığlası bitkisinden alınan meristem dokusu.....	29
Şekil 3.1. Kontrol grubu meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm)35	
Şekil 3.2. 1mg/l borik asit içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).....	36
Şekil 3.3. 3mg/l borik asit içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).....	37
Şekil 3.4. 5mg/l borik asit içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).....	38
Şekil 3.5. 1mg/l sodyum perborat içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).....	39
Şekil 3.6. 3mg/l sodyum perborat içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).....	40

Şekil 3.7. 5mg/l sodyum perborat içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).....	41
Şekil 3.8. 1mg/l sodyum metaborat içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).....	42
Şekil 3.9. 3mg/l sodyum metaborat içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).....	43
Şekil 3.10. 5mg/l sodyum metaborat içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).....	44
Şekil 3.11. 1mg/l Disodyum Oktaborat içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).....	45
Şekil 3.12. 3mg/l Disodyum Oktaborat içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).....	46
Şekil 3.13. 5mg/l Disodyum Oktaborat içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).....	47
Şekil 3.14. ISSR 1 primeri kullanılarak 3 farklı derişimde borik asit ve sodyum metaborat uygulaması sonrası örneklerden izole edilen DNA ile gerçekleştirilen PCR sonuçlarının jel görüntüsü. M1: 1kb belirteç, M2: 100bp belirteç; BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.	49
Şekil 3.15. ISSR 1 primeri kullanılarak 3 farklı derişimde sodyum perborat ve disodyum oktaborat uygulaması sonrası örneklerden izole edilen DNA ile gerçekleştirilen PCR sonuçlarının jel görüntüsü. M1: 1kb belirteç, M2: 100bp belirteç; SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.....	50
Şekil 3.16. ISSR 3 primeri kullanılarak 3 farklı derişimde borik asit ve sodyum metaborat uygulaması sonrası örneklerden izole edilen DNA ile	

gerçekleştirilen PCR sonuçlarının jel görüntüsü. M1: 1kb belirteç, M2: 100bp belirteç; BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol. 52

Şekil 3.17. ISSR 3 primeri kullanılarak 3 farklı derişimde sodyum perborat ve disodyum oktaborat uygulaması sonrası örneklerden izole edilen DNA ile gerçekleştirilen PCR sonuçlarının jel görüntüsü. M1: 1kb belirteç, M2: 100bp belirteç; SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol..... 53

Şekil 3.18. ISSR 7 primeri kullanılarak 3 farklı derişimde borik asit ve sodyum metaborat uygulaması sonrası örneklerden izole edilen DNA ile gerçekleştirilen PCR sonuçlarının jel görüntüsü. M1: 1kb belirteç, M2: 100bp belirteç; BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol. 57

Şekil 3.19. ISSR 7 primeri kullanılarak 3 farklı derişimde sodyum perborat ve disodyum oktaborat uygulaması sonrası örneklerden izole edilen DNA ile gerçekleştirilen PCR sonuçlarının jel görüntüsü. M1: 1kb belirteç, M2: 100bp belirteç; SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol..... 58

Şekil 3.20. ISSR 826 primeri kullanılarak 3 farklı derişimde borik asit ve sodyum metaborat uygulaması sonrası örneklerden izole edilen DNA ile gerçekleştirilen PCR sonuçlarının jel görüntüsü. M1: 1kb belirteç, M2: 100bp belirteç; BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); Kontrol

0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol. 62

Şekil 3.21. ISSR 826 primeri kullanılarak 3 farklı derişimde sodyum perborat ve disodyum oktaborat uygulaması sonrası örneklerden izole edilen DNA ile gerçekleştirilen PCR sonuçlarının jel görüntüsü. M1: 1kb belirteç, M2: 100bp belirteç; SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol. 63

Şekil 3.22. ISSR E.D.4 primeri kullanılarak 3 farklı derişimde borik asit ve sodyum metaborat uygulaması sonrası örneklerden izole edilen DNA ile gerçekleştirilen PCR sonuçlarının jel görüntüsü. M1: 1kb belirteç, M2: 100bp belirteç; BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol. 67

Şekil 3.23. ISSR E.D.4 primeri kullanılarak 3 farklı derişimde sodyum perborat ve disodyum oktaborat uygulaması sonrası örneklerden izole edilen DNA ile gerçekleştirilen PCR sonuçlarının jel görüntüsü. M1: 1kb belirteç, M2: 100bp belirteç; SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol. 68

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

°C	Santigrat Derece
mg	Miligram
g	Gram
µl	Mikrolitre
cm	Santimetre
dk	Dakika
ml	Mililitre
mm	Milimetre
L	Litre
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
OM	Rugini Olive Medium
MS	Murashige and Skoog Medium
WPM	Woody Plant Medium
BA	Benzil Adenin
Ch	Charcoal (aktif kömür)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
C ₂ H ₅ OH	Etanol
NaClO	Sodyum Hipoklorid
Rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı

1.GİRİŞ

1.1.*Liquidambar orientalis* ve Genel Özellikleri

Ülkemizde, eskiden “Amber-i Sail” olarak adlandırılmış (Acatay, 1963), ancak bugün Anadolu Sığla Ağacı, Amber Ağacı ya da sıklıkla Günlük Ağacı olarak bilinen *Liquidambar orientalis* Miller, Altingiaceae familyasına ait olan ve ülkemizin güneybatı bölgelerinde yayılış gösteren relik endemik ve tıbbi-aromatik bir bitki türüdür. Eski dönemlerden beri gövde kısımlarından Sığla Yağı denilen ekonomik olarak değerli reçinemsî bir yağ elde edilir. Bu bakımdan, “sıvı” anlamına gelen Latince “Liquidus” ve “güzel koku” anlamındaki Arapça “Amber” kelimelerinin biraraya getirilmesiyle, bu cinse “Liquidambar” (Güzel kokulu sıvı) adı verilmiştir. Bataklıklar, vadiler, akarsu ve dere kenarları, deniz kıyısı gibi nemli ve taban suyu yüksek yerlerin yanı sıra ender olarak kurak yamaçlarda da yetişebilen sucul bir ağaçtır. Coğrafi olarak, Muğla ilinde yoğun yayılış göstermekle birlikte, Aydın, Denizli, Burdur ve Antalya illerinde de görülmektedir. 0-400 m arası yetişmesi için en uygun yüksekliktir. Ancak 1100 m’de de yayılış alanları saptanmıştır. Literatürde *Liquidambar orientalis* Miller’in Türkiye dışında Rodos, Kıbrıs ve 12 Adalar’da da yayılışı olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır. Ancak bu adalarda doğal plantasyon olarak değil de kültüre alındıklarına dair ifadeler de mevcuttur. Bu adalardaki kültürel plantasyonu dışında ülkemiz için endemik bir türdür. Doğal yayılış alanı ve üretimde görülen düşüşün, tekniğine uygun olmayan yağ üretimi, otlatma, Anadolu sığla ağacının yetiştirme alanlarının tarım alanlarına dönüştürülmesi gibi nedenlerden kaynaklandığı öne sürülmektedir (Huş, 1949; Örtel, 1988; Akman 1995; Aslan ve Şahin, 2016; Alan vd., 2018). IUCN tehlike kategorileri listesinde Anadolu Sığlası “Doğada Orta Vadeli Gelecekte Yüksek Tehdit Altında” kategorisinde gösterilmektedir (Ekim ve ark. 2000). Ayrıca bu tür 2001 yılında EUFORGEN (European Forest Genetic Resources Program) tarafından değerli yapraklılar (Noble Hardwoods) grubuna alınarak, Avrupa çapında korunacak bir tür olarak kabul edilmiştir (Alan ve Kaya, 2003).

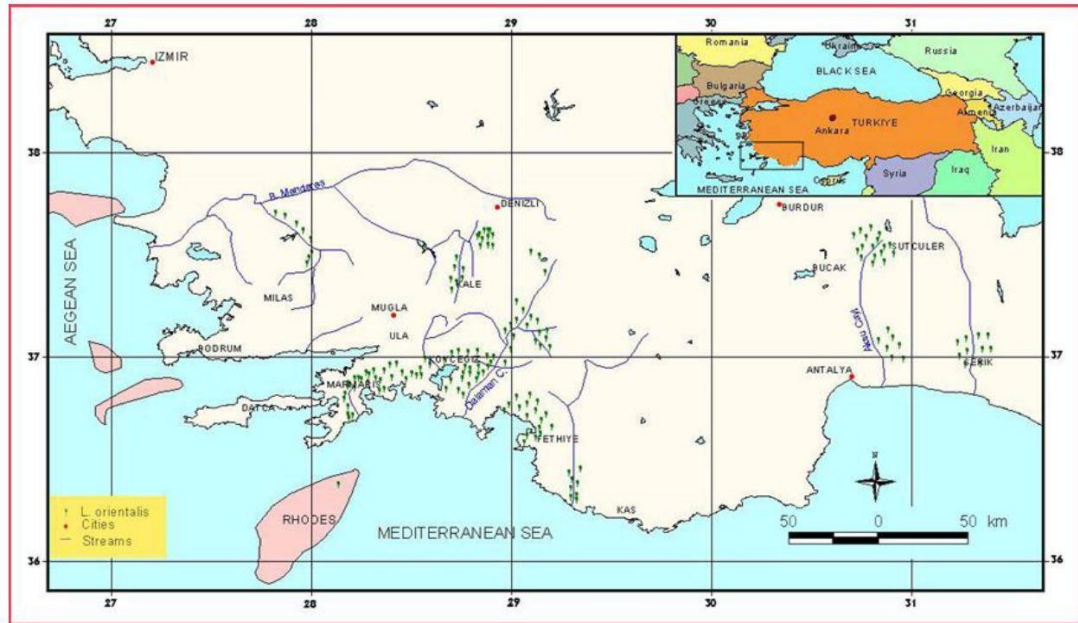
Sığla ormanlarının ülkemizde toplam sahası 1947 yılında yapılan çalışma ile yaklaşık 7.000 ha alanı kaplanmakta iken 1949 yılında 6.312 ha inmiştir. 1988 yılında bu rakam

hızlı bir düşüşle 1.215 ha kadar inmiş, günümüzde ise yıllık yağ üretimi 100 kg altında olup yayılış alanı ise 900 hektarın altındadır (Özmen, 2011).

Doğal ve yoğun yayılış gösterdiği bölgeler Muğla'nın Marmaris, Fethiye, Köyceğiz, Dalaman, Ortaca ve Ula İlçeleridir. Bunların dışında Aydın, Denizli, Burdur ve Antalya illerinin bazı bölgelerinde az miktarda da olsa yayılış göstermektedir. Liquidambar cinsinin *L.orientalis* dışında 4 tür daha bulunmakta ve dünyanın değişik bölgelerinde yayılış göstermektedir. (Çizelge 1.1) (Şekil 1.1)

Çizelge 1. 1.Liquidambar cinsine bağlı türler ve dünyadaki yayılış alanları (Küçükala vd., 2010)

Sığla Türü	Dünyadaki Yayılış Alanları
<i>Liquidambar orientalis</i> Miller	Türkiye
<i>Liquidambar styraciflua</i> L.	Amerika Kıtası
<i>Liquidambar macrophylla</i> Dest	Orta Amerika
<i>Liquidambar formosana</i> Hance	Çin
<i>Liquidambar attingia</i> Blume	Güneydoğu Asya



Şekil 1.1.Türkiye’de Sığla yayılış alanları (Çengel vd., 2008)

Buzul dönemlerinde dondurucu soğukların daha az hissedildiği Anadolu'nun diğer bölgelere göre daha korunaklı ve nemli-sıcak iklim koşullarının hüküm sürdüğü yerlere sahip olması, başta Anadolu Sığlası olmak üzere birçok tersiyer kökenli türü günümüze kadar getirebilmiştir. Anadolu Sığlası odun dokusunun iç morfolojik özellikleri, bu türün Angiospermae taksonlarının ilk görülmeye başladığı jeolojik dönemlerin sonuna doğru ortaya çıktığını kanıtlamaktadır (Efe, 1987).

Dünyada doğal orman alanı olarak sadece Fethiye, Marmaris ve Köyceğiz ilçelerinde yaşamını sürdürmekte ancak iklim, insan baskısı ve tarımsal üretime yer açma gibi sebeplerden dolayı yok olma tehlikesiyle karşı karşıya bir bitki türüdür. Anadolu Sığlası ormanları, üçüncül dönemden beri terkedilmiş bir miras olarak yaşamıştır ve yalnızca Türkiye için değil, dünya için de önemli bir genetik mirastır. Orman ağaçları arasında nadir görülen bir özellik olan, Sığla ağacı tarafından salgılanan balsam üretimi, *L. orientalis*'i ekonomik olarak önemli kılmaktadır. Sığla Yağı olarak bilinen bu balsam, *L. orientalis*'in gövdesinden elde edilir ve sinamik asit, stiren, storeinol ve stirojenin içerir. Tarihte geçmişte Mısır Kraliçesi Kleopatra'nın "aşk iksiri" ve parfüm olarak kullandığı sığla yağı, Hipokrat döneminden beri ilaç yapımında kullanılmaktadır. Tıbbi açıdan özellikle mide ve bağırsak rahatsızlıklarında kullanılırken parfümeri sektöründe koku sabitleyici olarak kullanılmaktadır. Batık Fenike gemilerinden çıkarılan içi sığla yağı dolu amforalar geçmişte Anadolu sığla yağının Akdeniz ticaretinde önemli bir yer tuttuğunu göstermektedirler. Eski Mısırlılar sığla yağını Fenikelilerden ithal etmiştir. Kleopatra'nın İksiri olan bu Sığla Yağı antik dönemlerde Kaunos Limanından ihraç edilmekteydi. Farmakolojik olarak geniş kullanım alanına sahip olan bu yağ, Avrupa'da ilaç olarak kullanılmaya 17. yüzyılda başlamıştır. Üretimi günümüzde de geleneksel yöntemlerle yapılan Sığla Yağı halen insanlığa şifa kaynağı olmaya devam etmektedir (Berkel ve Huş, 1944; Huş, 1949; Bayraktar vd., 2015). Sığla yağından su buharı destilasyonu ile elde edilen uçucu yağ da birçok değerli doğal esaslı parfümün bileşimine kullanılmaktadır (Gül, 1986).

Seyahatname'de Evliya Çelebi'nin aktardığı bilgilere göre o dönemde de sığla yağının önemi, kullanım amacı ve yağın üretiminden bahsedilmekte; hatta Menteşe toprağının haricinde herhangi bir yerde yetişmediğinin belirtilmesi ile de endemikliği anlaşılmaktadır:

“Ve bu yazılan kazaların mahsulatı cümlesinden ziyade olan beş kazadır. Evvela Gökabad (Gökova). Bunda Sığala yağı hasıl olur. Ve Purnaz kazasında da Sığala yağı hasıl olur. Ve Gökçeğöz (Gökçeova) ’de de hasıl olur. Ve Darende kazasında az hasıl olur. Bu beş kazadan gayri Menteşe toprağında değil hiçbir yerde hasıl olmaz.”(Ürker, 2014)

Anadolu Sığla ağacının optimum büyümeyi, nemli, alüvyonlu, kil ve balçık topraklarda ve nehir yataklarında yaptığı belirtilmektedir. Anadolu Sığla ağacı, yıllık ortalama 18 °C dolaylarında, kışın yumuşak geçtiği, soğuk ve kuru rüzgarlara karşı korunmuş sıcak yerlerde, yıllık ortalama 1000-1200 mm yağış alan, rutubetli ve taban suyu yüksek alanlarda, bataklık, vadi, deniz kıyısı, akarsu ve dere kenarı gibi yerlerde yayılış göstermektedir. Arazinin eğimi de, Anadolu sığla ağacının yayılımında bir diğer önemli husustur. Suyun yüzeye yakın ya da yüzeyde olduğu düz arazilerde orman kurabilmektedir. Eğimli yerlerde ise su boyunca şerit olarak görülmektedir. Yöre halkınca “Günlük Ağacı” olarak adlandırılan Anadolu Sığla ağacı yayılış gösterdiği mntıkalara göre değişik şekillerde isimlendirilmektedir. Deniz seviyesinden 15-20 m yükseklikte olan yerlerde bulunuyorsa “Taban Günlüğü”, 400-450 m yükseklikte yer alıyorsa “Dağ Günlüğü” şeklinde tanımlanmaktadır (Acatay, 1963; Atay, 1985; Efe, 1987; İktüeren, ve Acar, 1987; Günal, 1994; Özmen, 2011).

1.2. *Liquidambar orientalis*’in Morfolojik ve Anatomik Özellikleri

Anadolu sığla ağacı ortalama 30-35 m boy, 100 cm çap yapabilen ve 200-300 yıl yaşayabilen bir türdür. Uzun yapılı, yuvarlak tepeli, kalın dallı bir ağaç olup, genç gövde grimsi renkte ve düz, yaşlı gövde kahverengi ve çatlaklı kabuk yapısına sahiptir. Genç sürgünler çıplak yapıdadır. Yeşil renkte ve helezonik dizili tomurcuklar kenarı kirpikli 6-8 pulla örtülüdür. İnce ve uzun saplı yaprakları genellikle 5 loblu olmakla birlikte bazen 3 veya 7 loblu olarak da görülebilmektedir. (Şekil 1.2). Dişi çiçekler aşağıya doğru sarkık kümeler şeklinde bir aradadır. Erkek çiçekler genellikle dal uçlarında ve kümeler şeklindedir. Çiçeklenme dönemi Mart – Nisan aylarıdır. Meyveler 2-2,5cm çapında ve aşağıya doğru sarkıktırlar. 5-10 cm uzunluğundaki saplara taşınırlar. Meyve durumu, çınar meyve durumuna çok benzer. Kasım-Aralık ayında tohumları döküldükten sonra da uzun süre ağaç üzerinde kalırlar. Çınar meyvelerinden farkı sığla da meyve durumları saplarda tek tektir, ayrıca meyve durumu üzerinde güzdeki gibi çıkıntılar taşırlar. (Şekil 1.3) Çınarda ise sap üzerinde

birden fazla meyve başçığı vardır ve bunlar ponpon gibi yumuşak yapılıdır. (Atay, 1985; Yaltırık, ve Efe, 1994; Anşın ve Özkan, 1997; Alan ve Kaya, 2003; Küçükala vd., 2010; Özmen, 2011).



Şekil 1.2. *Liquidambar orientalis* Miller yaprağı



Şekil 1.3. *Liquidambar orientalis* Miller meyvesi

Monotipik bir tür olan *Liquidambar orientalis* ülkemizde iki varyeteye sahiptir:

1) *Liquidambar orientalis* Miller var. *orientalis*

2) *Liquidambar orientalis* Miller var. *integriloba* Fiori

Bu iki varyete birbirlerinden yaprak özellikleri ile ayrılırlar. *Liquidambar orientalis* var. *orientalis*'de yaprakların tümünde veya hiç olmazsa bir kısmında yaprak terminal loplu, kuneat-oblong olup geriye doğru üçgen loplara sahiptir. Oysa *Liquidambar orientalis* var. *integriloba*'da yaprakların tümünde loplar bölünmemiş, geniş ovat-oblong ve subakuminanttır. (Peşmen, 1972; Davis, 1982)

L. orientalis'in kromozom sayısının $2n=30$ olduğunu kromozom sayısının şekli ve büyüklüğünün *L. styraciflua*'ya çok benzerlik gösterdiği, morfolojisinde görülen bazı farklılıklarında ekolojik ortam farklılıklarından ortaya çıkabileceği kaydedilmiştir (Kesercioğlu, 1973).

1.3.Sığla Yağı Üretimi

Yüzlerce yıl öncesine dayanan Anadolu sığla yağı için öncelikle uygun ağaç seçimi yapılır. Gövde çapı taban günlüklerinde 15 cm, dağ günlüklerinde 10 cm'den fazla olan ağaçlar seçilir. Gövdesi anılan çaplardan küçük olan ağaçlarda hem verim az olmakta ve yağ alma işlemi ağacın gelişimini olumsuz etkilemektedir. Seçilen ağaçların gövdelerinde ağaç çapına göre değişen sayıda 10 cm genişlikte 50 cm uzunlukta şeritler şeklinde kambiyuma kadar ağaç kabuğu sıyrılır. (Kabuk soyma işlemi sırasında kambiyumun zedelenmemesine dikkat edilmelidir.) Yara açma işlemindeki amaç canlı odun dokusunu güneşin etkisine maruz bırakarak patolojik balsam kanallarının oluşmasını sağlamaktır. Yaklaşık bir ay sonra, mayıs ayı içerisinde kaşık ismi verilen bir alet ile yaraların tekrar açılması işlemine başlanır. Canlı odun dokusuna yaklaşık 3-4 mm girilerek 4-5 cm genişliğinde yara oluşturma işlemi damar açma denir. Bu işlem mayıs sonuna kadar devam eder. Sonra sur işlemine geçilir. Sur işlemi, damar açma işleminden 1 hafta sonra yara yüzeylerinin kaşıkla tekrar kazınması işlemidir. Bu işlemden 15 gün sonra yağ alma gerçekleşmekte ve bu işe de sur arkası denilmektedir. 15 gün sonra ise sefer adı verilen asıl yağ alma işlemi başlamakta ve bu işlem Temmuz ayından Ekim sonuna kadar her 15 günde bir damarlar kaşıkla sıyrılarak devam etmektedir. (Şekil 1.4) Bu süreçte ağaçta biriken

sızıntılar sıyrılarak çuvallara alınan sıyrıntılar su ile dolu kazanlarda yaklaşık 30 dk kaynatılır. Daha sonra çuvallar preslenerek yağ sıyrıntı kısmından ayrılır. Presten arta kalan, eser miktarda yağ içeren sıyrıntılara “buhur” ismi verilmektedir. Su ile karışık yağ presleme esnasında akarak beton havuzlara alınır. Su yüzeyinde biriken yağ alınarak kaplara konur. (Berkel, 1955; İktüeren ve Acar, 1987; Gül, 1986; Bozkurt ve ark., 1989; İstek, 1994)

Ülkemizde yıllara göre sığla yağı üretimi Çizelge 1.2’de verilmiştir.



Şekil 1.4. Anadolu Sığla ağacının gövdesi üzerinde yağ alımı için açılan yara dokusu ve yaralardan sızan sığla yağı

Anadolu Sığla ağacının asıl kullanımı odun üretiminden çok patolojik balsam kanallarından elde edilen yağıdır. Binlerce yıldır kullanılan ve ticareti yapılan Anadolu sığla yağı kozmetik, ilaç ve kimya sanayi için önemli bir hammadde kaynağıdır ve dünya piyasalarında “Türk sitiraksı” olarak isimlendirilmektedir. Roma ve Mısır’da parfüm yapımında, sağlık merkezlerinde kullanılan bir kaynak olmuştur. Mısır piramitlerindeki mezarlara gömülen Anadolu sığla yağı kokusunun günümüze kadar geldiği ileri sürülmektedir. (Huş, 1969; Örtel, 1988; Acar, 1989; Bozkurt ve ark., 1989; İstek, 1994).

Çizelge 1.2. Yıllara göre Sığıla Yağı Üretimi (Bozkurt vd., 1989; Ürker, 2014)

Yıl	Üretim Miktarı (Kg)	Yıl	Üretim Miktarı (Kg)
1947	200.000	2000	3.286
1950	181.279	2003	1.702
1955	100.000	2005	1.207
1960	93.000	2008	340
1968	63.100	2009	100
1970	60.000	2010	3.000
1975	19.627	2011	-
1980	19.515	2012	-
1985	8.000	2013	1.110
1990	2.000	2014	-
1995	4.000	2015	-
1997	3.000	2016	-

1.4. Mikroçoğaltım Yöntemleri

Mikroçoğaltım, bir doku kültürü tekniği olup, *in vitro* ortamda bir bitkinin yeni bir bitki oluşturabilme yeteneğine sahip sürgün, kök, gövde gibi organlarından, o bitki ile aynı genetik özelliğe sahip birden çok bitki üretme işleminin adıdır. Tohumla ya da çelikleme yöntemiyle üretime göre hem daha az materyal ihtiyacı duyar hem de daha hızlı bir üretim şeklidir (Özkaynak ve Samancı, 2005). Ticari sektörde de kullanılmaya başlanan bu teknik park-bahçe bitkileri, tarım ve ormancılıkta birçok bitki türünde kullanılmaktadır (Solarova ve Posposilova, 1997; Nquyen ve Kozai, 1998; Pospisilova ve ark., 1999a; Mansuroğlu ve Gürel, 2001). *in vitro* mikroçoğaltım işlemlerinde bitkilerin yapraklarında düşük mum tabakası oluşumu, zayıf kutikula

gelişimi, düşük stoma fonksiyonu gibi nedenlerden dolayı araziye aktarma işlemlerinde önemli kayıplar meydana gelmektedir. Bu kayıplar da mikroçoğaltım kullanımını sınırlamaktadır (Zobayed vd., 1999).

Bitkilerin uygun istekleri (hormon, besin, ortam vb) doğru şekilde bilindiğinde tüm bitki türlerinin mikro çoğaltılması mümkündür. Bu teknik sayesinde hem sağlıklı bitkiler üretilebilmekte hem de üretim diğer vejetatif üretim şekillerine göre daha hızlı seyretmektedir. Doku kültürü ile bitkilerin çoğaltılması pahalı olmasına karşın, otomasyon gibi tekniklerle üretimler daha uygun koşullara çekilebilir (Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

Liquidambar orientalis (Anadolu Sığlası) geleneksel olarak tohumla üretilir. Bazen tohum çimlenmesi 2 yıla kadar sürebilir. Çimlenme oranları ise genellikle zayıftır. Ayrıca tohum ekimleri mevsimsel olarak yapılmak zorundadır. Bu nedenle ticari olarak kitlesel üretim tercih edilmektedir. Yarı olgun odunsu çelikler yoluyla vejetatif çoğaltma sorunludur ve çoğaltım materyalinin uzun ağaçlardan toplanması çok zordur (Parlak, 2012). *in vitro* klonal çoğaltma, Anadolu Sığlası'nın ticari ve koruma amaçları için bir alternatif bir üretim modelidir (Bayraktar vd., 2015). Bitki genetik kaynaklarının korunmasında kullanılan mevcut *in situ* ve *ex situ* yöntemler *in vitro* tekniklerle pekiştirilmektedir (Krishnan vd, 2011). Apikal veya aksiller sürgün meristemi bazlı mikro çoğaltma, bitki biyoçeşitliliğinin korunmasında kullanılan *in vitro* tekniklerden biridir (Reed vd, 2011).

1.5.Genetik Kararlılığın Belirlenmesinde Moleküler Belirteçlerin Kullanılması

Moleküler belirteçler, genomda herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişkili DNA parçasıdır. Moleküler belirteçler; genetik belirteçlerin DNA tabanlı tipini oluşturdukları için DNA markörleri olarak da isimlendirilirler. Moleküler belirteç yöntemleri, DNA molekülündeki polimorfik bölgelerin saptanması prensibine dayanır. Popülasyonda her hangi bir genin veya özelliğin birden fazla formu bulunuyorsa o gen ya da fenotipik özellik polimorfik olarak kabul edilmektedir. Polimorfizm, DNA dizisi, kromozomal yapı, amino asit dizisi ya da fenotipik özellik varyantları gibi birkaç düzeyde görülebilir. DNA markörleri teorik olarak sınırsız sayıda kabul edilir. Morfolojik ve biyokimyasal markörlerin aksine, çevresel faktörlerden ve bitki gelişim

evrelerinden etkilenmezler. (Yorgancılar vd., 2016). Bütün bir genomun analiz edilebileceği DNA'yı elde etmek için bireyin herhangi bir bölümünden alınan doku parçası yeterli olmaktadır. (Botstein vd., 1980).

1.5.1. Moleküler belirteçler

Bu belirteçler genel olarak; çeşitlerin belirlenmesi, gen haritalama, yeni bitki çeşitlerinin korunması, tohum saflık analizleri, genetik kaynakların belirlenmesi, genetik uzaklığın (akrabalığın) belirlenmesi, genetik kararlığın tespiti, stres sonrası genetik yapıda meydana gelebilecek farklılıkların belirlenmesi gibi alanlarda kullanılmaktadır (Yorgancılar vd., 2016). Moleküller belirteçlerin yaygın olarak kullanılma sebebi diğer belirteç sistemlerine göre daha hızlı ve kesin olarak sonuç vermeleridir (Genişel, 2013).

Moleküler belirteçlerde bulunması gereken temel bazı özellikler:

- Bütün dokularda gözlemlenebilir olmalıdır,
- Polimorfik davranışı yüksek olmalı ve farklı genotipleri belirleyebilmelidir,
- Tekrarlanabilirliği yüksek olmalı,
- Düşük maliyetli olmalı ve kolayca ulaşılabilmelidir,
- Genomda düzgün dağılıma sahip olmalı ve sıkça bulunmalı,
- Seçici ve nötr özelliğe sahip olmalı,
- Hızlı ve kolay değerlendirilebilir özellikte ve otomasyona uygun olmalıdır, (Yorgancılar vd., 2016).

Moleküler belirteçler, iki ana grupta incelenir. Bunlar:

1.5.1.1. Hibridizasyona dayalı belirteçler

Hibridizasyona dayalı belirteçlere en iyi örneklerden biri olan RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, Sınırlı Parça Uzunluk Polimorfizmi), izole edilen DNA'nın özgün restriksiyon enzimleri ile kesilmesiyle ortaya çıkan farklı uzunluklarda DNA parçaları ile yapılan analizdir. RFLP belirteçleri kodominanttır ve PCR temelli olmayan ilk belirteçtir (Bark ve Havey, 1995). PCR temelli belirteçler

ortaya çıkana kadar yaygın olarak kullanılmış ancak PCR temelli belirteçlerin avantajlarına göre geri kaldığı için kullanımı sınırlı hale gelmiştir.

RFLP tekniğinin avantajları:

- Bu belirteçler kodominant özellikte oldukları için heterozigotların belirlenmesi ve karakterizasyonlarında kullanılırlar.
- Polimorfizm düzeyleri orta seviyedir.
- Farklı araştırmacı ve laboratuarda yapılan analizlerde aynı sonuçları verirler.
- Tür, cins ve familyalar arasında transfer edilebilir.

RPLF tekniğinin dezavantajları:

- Oldukça pahalı bir tekniktir, zaman ve işgücü gerektirir.
- Yüksek kalitede DNA'ya ihtiyaç duyar.
- Radyoaktif etiketleme yöntemi kullanılmaktadır.
- Genom üzerinde rastgele dağılım göstermezler ve dolayısıyla bu durum haritalamayı olumsuz etkiler (Yorgancılar vd., 2016).).

1.5.1.2. PCR'a dayalı belirteçler

PCR, az miktarda DNA varlığında bile hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılması işlemidir. 80'li yıllarda geliştirilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır. Çift iplik halindeki DNA molekülünün tek ipliğe ayrıştırılması, hedeflenen dizilere oligonükleotid primerlerin bağlanması ve uzaması şeklinde çalışır. PCR tekniği GDO tespiti, tanı-teşhis, moleküler klonlama, DNA baz dizilişinin belirlenmesi ve adli tıpta kullanılmaktadır. Bir PCR döngüsü 3 ana aşamadan oluşur:

- Denaturasyon (DNA iplikçiklerinin ayrılması),
- Annealing (Primerlerin bağlanması),
- Extention (Uzama)

İlk olarak 95 °C'de kalıp DNA'nın çift sarmal yapısı açılarak tek iplik haline gelir. Sonra 30-60 °C arasındaki bir sıcaklıkta primer tek zincir DNA'ya bağlanır. Ardından 72 °C'de TaqDNA polimeraz enzimi ortamdaki nükleotidleri (A,G,C,T) kullanarak uygun DNA dizisini çoğaltır. Bu üç adım bir döngü oluşturur ve 30 ile 45 defa

tekrarlanır. Döngüler arka arkaya birçok kez tekrarlanırken her bir döngünün ürünü, bir sonrakinde kalıp olarak kullanıldığı için her döngüde istenen DNA miktarı 2 katına çıkar.

PCR tekniğinde birden fazla genetik belirteç tipleri kullanılmaktadır. RAPD, AFLP, SSR, ISSR ve SRAP genetik belirteçleri PCR kullanımına dayalı belirteçlerdir (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3. PCR temelli tekniklerin karşılaştırılması (Li ve Quiros 2001; Hilooğlu, 2012)

Teknik	Polimorfizm	Dominantlık	Verimlilik	Otomasyon	Maliyet
RAPD	Orta/Yüksek	Dominant	Düşük	Orta	Düşük
AFLP	Yüksek	Dominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Orta
SSR	Yüksek	Kodominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Düşük
ISSR	Yüksek	Dominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Düşük
SRAP	Yüksek	Kodominant	Orta	Orta/Yüksek	Düşük

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA-Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA), 90'lerde ortaya çıkmış olan PCR temelli bir tekniktir. Temel prensibi bir türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9-10 bp oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanarak PCR ile çoğaltma yapmasıdır. Ardından elde edilen ürün radyoaktif olmayan jel elektroforezinde yürütülür ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde gözlemlenir. Bantların varlığı veya yokluğu şeklinde sonuçlar değerlendirilir (Öz Aydın, 2004)

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism-Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)'de DNA önce birisi altı, diğeri dört taban tanıyan iki kesim enzimi tarafından kesilir ve kesilen DNA parçacıkları primerlerle birleştirilir. Birleştirme ürünleri birer baz ilave edilmiş primerlerle PCR işlemine tabi tutulur ve elde edilen PCR ürünleri 3 baz ilave edilmiş primerlerle seçici PCR işlemine alınır. PCR ürünleri poliakrilamid jelde yürütüldüğünde oluşan bant profillerine sonucunda polimorfizm değerlendirilir. En büyük avantajı tek bir reaksiyonda 30-150 bölge tanımlanabilmesi ve elde edilen sonuçların tekrarlanabilir olmasıdır. En önemli dezavantajı pahalı bir işlem olmasıdır (Vos vd., 1995).

SSR (Simple Sequence Repeat-Basit Dizi Tekrarı), ökaryotik genomlar boyunca dağılmış ve ardışık olarak tekrarlanmakta olan 2-6 nükleotid dizilimlerinin iki yanına

bağlanan primerler ile PCR’da çoğaltılması prensibine dayanır. Agaroz jel veya poliakrilamid jelde yürütülerek parçaların büyüklüklerine göre sonuçlar değerlendirilir. SSR’ları çevreleyen korunmuş DNA dizileri primer olarak kullanılarak PCR yardımıyla bir lokustaki farklı alleller tespit edilebilir. Ancak bu metodun kullanılabilmesi için ilgili lokus bölgelerine ait primer sekanslarının önceden bilinmesi gerekir (Yorgancılar vd., 2016).

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat, Basit Dizi Tekrarları Arası Bölgeler), ökaryotik genomlarda tekrar eden 2, 3, 4, 5’li nükleotid birimlerinin lokustan bağımsız bir şekilde genomda rastgele dağılımlarını esas alan bir yöntemdir. ISSR tekniği bazı avantajları sebebiyle oldukça sık kullanılan bir tekniktir. Bu avantajlar:

- Az miktarda örnek ile de sonuç alınabilmektedir.
- Dominant marker olması, dizi bilgisi gerekmeden primer dizaynı yapılabilmesi açısından avantajlı bir tekniktir.
- Allel varyasyonları yüksek seviyededir.
- Maliyetleri oldukça düşüktür.
- Uygulaması hızlıdır.

SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism- Dizi ile İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm), açık okuma bölgelerini (ORF) amplifiye etmeye dayanan PCR temelli belirteç sistemleridir. Yaklaşık 1 nükleotidden oluşan ileri ve yaklaşık 18 nükleotidden meydana gelen geri primerlere sahiptir ve ileri primerler için CCGG, geri primerler için AATT dizisi gelerek devam eder. Verimliliği orta derece bir teknik olup basit, otomasyonu yüksek ve güvenilirdir. Bu sebeple DNA ile ilgili parmak izi ve işaretleme çalışmalarında tercih edilmektedir (Li, ve Quiros, 2001).

1.6.Bor Tuzlarının Bitki Büyüme Ve Gelişmesi Üzerindeki Etkileri

Bitkiler, yüksek düzeyde doğal olarak oluşan tuzluluk ve Bor içeren topraklara maruz kalma veya Bor dahil olmak üzere yüksek düzeyde tuz içeren sularla sulama nedeniyle eş zamanlı tuzluluk ve bor toksisite streslerinden etkilenebilir. Bitkilerin aşırı Bor ve tuzluluk kombinasyonuna bitki büyümesi ve verimi üzerindeki tepkisine ilişkin yetersiz bilgi mevcuttur ve tuzluluk stresi ile Bor toksisitesi arasındaki karşılıklı ilişkiler konusunda bir fikir birliği yoktur (Yermiyahu vd., 2008).

Tuzluluk ve bor stresleri ve bunların bitki büyümesi ve verimi üzerindeki bağımsız etkileri iyi araştırılmış ve literatürde iyi tanımlanmış olsa da (Munns ve Termaat 1986; Nable vd, 1997), Bitkilerin birleşik tuzluluk ve Bor tuzlarına tepkisine ilişkin henüz netleşmemiş noktalar vardır. Tahıllarda yüksek düzeyde tuz ve Bor içeren su ile sulama (Nable vd, 1997) veya doğal olarak oluşan yüksek düzeyde tuzluluk ve Bor, genellikle sızıntının çok az olduğu veya hiç olmadığı yarı kurak ve kurak bölgelerde bulunur (Keren ve Bingham, 1985). Yüksek Bor konsantrasyonları içeren tuzlu yeraltı suyu ile sulama, dünya çapında meydana gelir, dikkate değer örnekler Kaliforniya'daki San Joaquin Vadisi'nde (Wimmer vd., 2003), Teksas'taki Rio Grande Vadisi'nde (Picchioni vd., 2000) Kanada'daki Saskatchewan Eyaleti'nde bulunur (Nicholaichuk vd., 1988), İsrail'deki Negev bölgesi (Yermiyahu vd., 2006) ve Şili'deki Lluta Vadisi (Bastías vd., 2004b). Tuz ve Bor birikimi örnekleri, İsrail ve Ürdün'deki Ürdün Nehri Vadisi topraklarında ve altta yatan sık tuzlu-yüksek Bor su tablolarının yaygın olduğu Güney Avustralya topraklarında bulunur (Marcar vd., 1999). Sulama için sürekli artan bir su kaynağı olan geri dönüştürülmüş atık sularda yüksek seviyelerde tuz ve Borun ek bir kaynağı bulunur (Feigin vd., 1991; Tsadilas, 1997).

Şu anda, bitkilerin Bor toksisitesi ve tuzluluk kombinasyonuna bitki büyümesi ve verimi üzerindeki tepkisi hakkında sınırlı bilgi vardır ve tuzluluk stresi ile Bor toksisitesi arasındaki karşılıklı ilişkiler hakkında bir fikir birliği yoktur. Bingham vd. (1987), buğdayın sürgün ağırlığının, Bor konsantrasyonu ve tuzluluk arasındaki etkileşimden etkilenmediğini bulmuştur. Benzer bir sonuca Mikkelsen vd. (1998) yonca bitkileri için ve Grattan vd. (1997) okaliptüs için, Shani ve Hanks (1993), tarlada arpa ve mısır yetiştirmiş ve ozmotik ve Bor konsantrasyonu etkilerinin birbirine bağımlı olmaktan çok katkı maddesi olduğu sonucuna varmıştır. Holloway ve Alston (1992) ve Grieve ve Poss (2000), artan tuzluluk ile buğdayın Bora tepkisinin azaldığını göstermiştir. Benzer eğilimler domates için de bulunmuştur (Alpaslan ve Güneş, 2001; Ben Gal ve Shani, 2002). Ferreyra vd. (1997), 12 farklı bitki türünün büyümesinin, iki faktörün toplamından beklenenden daha yüksek olduğunu gösterdi; bu, toksisitenin düzeldiğini gösterdiği bildirilmiştir (antagonistik bir etki).

Bor ve Ca'nın birkaç ortak özelliği vardır (düşük hareketlilik, sitoplazmik içeriğe kıyasla yüksek ekstrasitoplazmik konsantrasyon, eksiklik sırasında büyüme değişiklikleri gibi). Bu besinlerden birinin miktarı, varlığı, dağılımı (Ramón vd., 1990)

ve diğlerinin optimal bitki büyümesi için gereksinimlerini (Teasdale ve Richards, 1990) etkiler.

IAA'nın hücre zarından taşınması için bir B-Ca etkileşiminin kanıtı rapor edilmiştir (Tang ve De la Fuente, 1986), ancak konuyla ilgili çoğu araştırma hücre duvarının yapısı ve işlevi ile ilgilidir. B-Ca etkileşiminin kimyası üzerine bir çalışmada, Van Duin vd. (1987), Ca^{2+} 'nın borat anyonu ile doğrudan etkileşim yoluyla borat-polihidroksi-karboksilatlarla nasıl kompleksler oluşturabildiğini açıklamıştır. Ayrıca, Kobayashi vd. (1999), Ca^{2+} 'nın borat-rhamnogalakturnII'nin dimerlerinin in vitro oluşumunu desteklediğini göstermiştir ve Ca^{2+} 'nın poligalakturnik asit bölgesindeki iyonik ve koordineli bağlanma yoluyla hücre duvarının pektin polisakkaritlerini stabilize ettiğini öne sürmüştür.

2.MATERYAL ve METOD

2.1.Bitki Materyali

Sığla tohumları 2019 yılı Ağustos ayında Muğla İli Köyceğiz İlçesi Toparlar Mahallesi sınırları içinde yer alan doğal sığla plantasyonundan toplanmıştır (36°59'28.63''K, 28°38'49.07''D). Toplanan yeşil sığla kozalakları plastik yayvan bir kap içerisine konularak üzeri tülbent ile örtülmüş ve kurumaya bırakılmıştır. 10 günlük kurutma işleminin ardından kozalaklardan kap içine dökülen tohumlar elenerek çöplerinden ayrılmış ve temiz bir kaba aktarılmıştır. (Şekil 2.1-Şekil 2.2)



Şekil 2.1. Anadolu Sığlası (*Liquidambar orientalis* Mill.) tohumları



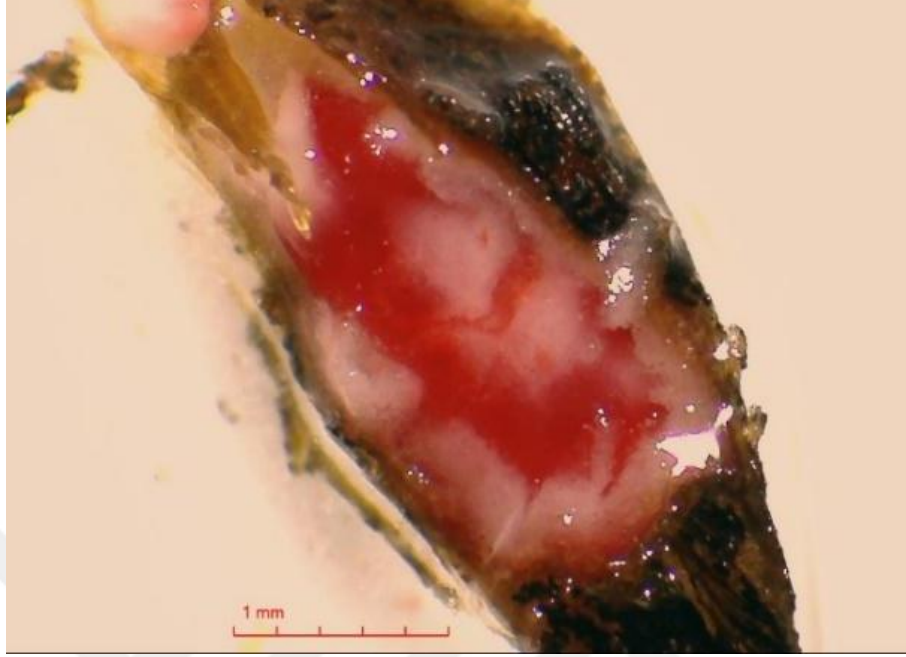
Şekil 2.2. Anadolu Sığlası (*Liquidambar orientalis* Mill.) tohumu

2.2.Tohum Canlılık Testi

Tohum ekim işlemi öncesinde Sığla tohumlarının canlılık oranlarının belirlenmesi ve canlılıklarının ispatı amacıyla Tetrazolyum Klorür testi uygulanmıştır.

Tetrazolyum testine hazırlık amacıyla sığla tohumları 20 dakika akan su altında yıkandıktan sonra 2 saat boyunca 23 °C saf su içinde şişmeye bırakılmıştır. 2 saat sonunda suyun yüzeyinde kalan tohumlar atılmış, çöken tohumlar süzülerek ayrılmıştır. Ayrılan tohumlar içinden canlılık testi için rastgele 10 adet tohum seçilmiştir. Seçilen tohumlar Stereo Zoom Mikroskop (Motic-SMZ-161) altında bistüri yardımıyla 5 adedi enine, 5 adedi boyuna olacak şekilde ortadan ikiye kesilmiştir. Kesilen tohumlar 1,5 ml Eppendorf Tüp içine alınarak üzerleri örtülecek şekilde %1'lik Tetrazolyum Klorür çözeltisi eklenmiştir (Van Waes ve Debergh, 1986). Ağız kapatılan eppendorf tüp 24 saat boyunca karanlık bir ortamda oda sıcaklığında bekletilmiştir. 24 saat sonunda tüp içinden çıkartılan tohumlar Kameralı Stereo Zoom Mikroskop (Motic-SMZ-161 + Moticam 3MP) altında incelenerek fotoğraflanmıştır (Şekil 2). Tohum canlılığının tespiti için tohumun endosperm ve/veya embriyosunda kırmızılık beklenmektedir. İnceleme sonunda 10 tohumdan 9 adedinde kırmızılık gözlenmiş (Şekil 2.3), 1 adedinde herhangi bir kırmızılık

gözlenmemiştir (Şekil 2.4). İşlem sonunda sığla tohumlarının canlılık oranı %90 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 2.3. Canlılık gösteren Anadolu Sığlası tohumu



Şekil 2.4. Canlılık göstermeyen Anadolu Sığlası tohumu

2.3.Tohum Çimlendirme

2.3.1.Kültür Kabı Seçimi

Tohum çimlendirme aşamasında kullanılmak üzere 100x40 mm (Çap x Yükseklik) ölçülerinde gamma steril Plant Culture Dish (SPL Life Science Plant Culture Dish) seçilmiştir. 3 besi ortamı için her birine 20 adet olacak şekilde 60 adet Bitki Kültür Kabı kullanılmıştır. (Şekil 2.5)



Şekil 2.5. SPL Life Science Plant Culture Dish

2.3.2.Besin Ortamlarının Hazırlanması

Tohum çimlendirme aşaması için 3 farklı besi ortamı seçilmiştir:

- MS (Murashige&SkoogMedium)
- WPM (WoodyPlantMedium)
- OM (OliveMedium)

Her bir kültür kabına 50 ml besi ortamı denk gelecek şekilde her besi ortamından 1 litre hazırlanmıştır. Her besi ortamı için 20 kap doldurulmuştur.

2.3.2.1. Murashige&Skoog Medium (MS) Besi Ortamı Hazırlığı

1 litre MS besiy ortamı hazırlamak için 4,405 g/l MS hazır besiy ortamı ve 30 g/l Sukroz tartılarak bir beher içine alınmış, steril saf su eklenerek manyetik karıştırıcı (DaihanScientific MSH-20A) ile homojen olarak karıştırılmıştır. pH 5,8'e ayarlanarak 1 litrelik otoklav şişesine aktarılmış ve katılaştırıcı olarak 7 g/l Agar eklenerek 121,6 °C'de 15 dakika süreyle Laboratuvar Otoklavı (Daihan Scientific-MaXterile 60) içinde otoklavlanmıştır. (Çizelge 2.1)

Çizelge 2.1.Murashige&Skoog Medium (MS) Hazır Besi Ortamı içeriği

MURASHIGE & SKOOG MEDIUM (MS) İÇERİK	
MAKROELEMENTLER	mg/l
Ammonium nitrate	1650,000
Calcium chloride	332,200
Magnesium sulphate	180,690
Potassium nitrate	1900,000
Potassium phosphate monobasic	170,000
MİKROELEMENTLER	mg/l
Boric acid	6,200
Cobalt chloride hexahydrate	0,025
Copper sulphate pentahydrate	0,025
EDTA disodium salt dihydrate	37,300
Ferrous sulphate heptahydrate	27,800
Manganese sulphate monohydrate	16,900
Molybdic acid (sodium salt)	0,213
Potassium Iodide	0,830
Zinc sulphate heptahydrate	8,600
VİTAMİNLER	mg/l
myo-Inositol	100,000
Nicotinic acid (free acid)	0,500
Pyridoxine HCl	0,500
Thiamine hydrochloride	0,100
AMİNO ASİT	mg/l
Glycine	2,000
TOPLAM(gms/litre)	4,4

2.3.2.2. Woody Plant Medium (MS) Besi Ortamı Hazırlığı

1 litre WPM besiy ortamı hazırlamak için 2,462 g/l WPM hazır besiy ortamı ve 30 g/l Sukroz tartılarak bir beher içine alınmış, steril saf su eklenerek manyetik karıştırıcı ile homojen olarak karıştırılmıştır. pH 5,8'e ayarlanarak 1 litrelik otoklav şişesine aktarılmış ve katılaştırıcı olarak 7 g/l Agar eklenerek 121,6 °C'de 15 dakika süreyle Laboratuvar Otoklavı içinde otoklavlanmıştır. (Çizelge 2.2)

Çizelge 2.2. Woody Plant Medium (WPM) Hazır Besi Ortamı içeriği

WOODY PLANT MEDIUM (WPM) İÇERİK	
MAKROELEMENTLER	mg/l
Ammonium nitrate	400,000
Calcium chloride	72,500
Calcium nitrate monohydrate	386,340
Magnesium sulphate	180,690
Potassium phosphate monobasic	170,000
Potassium sulphate	990,000
MİKROELEMENTLER	mg/l
Boric acid	6,200
Copper sulphate pentahydrate	0,025
EDTA disodium salt dihydrate	37,300
Ferrous sulphate heptahydrate	27,800
Manganese sulphate monohydrate	22,300
Molybdic acid (sodium salt)	0,213
Zinc sulphate heptahydrate	8,600
VİTAMİNLER	mg/l
myo-Inositol	100,000
Nicotinic acid (free acid)	0,500
Pyridoxine HCl	0,500
Thiamine hydrochloride	1,000
AMİNO ASİT	mg/l
Glycine	2,000
KARBONHİDRAT	mg/l
Sucrose	2000,000
TOPLAM(gms/litre)	22,4

2.3.2.3. Rugini Olive Medium (MS) Besi Ortamı Hazırlığı

1 litre OM besiy ortamı hazırlamak için 4,023 g/l OM hazır besiy ortamı ve 30 g/l Sukroz tartılarak bir beher içine alınmış, steril saf su eklenerek manyetik karıştırıcı ile homojen olarak karıştırılmıştır. pH 5,8'e ayarlanarak 1 litrelik otoklav şişesine aktarılmış ve katılaştırıcı olarak 7 g/l Agar eklenerek 121,6 °C'de 15 dakika süreyle Laboratuvar Otoklavı içinde otoklavlanmıştır. (Çizelge 2.3)

Çizelge 2.3.Rugini Olive Medium (OM) Hazır Besi Ortamı içeriği

RUGINI OLIVE MEDIUM (OM) İÇERİK	
MAKROELEMENTLER	mg/l
Ammonium nitrate	412,000
Calcium chloride	332,200
Calcium nitrate	416,920
Magnesium sulphate	732,600
Potassium chloride	500,000
Potassium nitrate	1100,000
Potassium phosphate monobasic	340,000
MİKROELEMENTLER	mg/l
Boric acid	12,400
Cobalt chloride hexahydrate	0,025
Copper sulphate pentahydrate	0,250
EDTA disodium salt dihydrate	37,300
Ferrous sulphate heptahydrate	27,800
Manganese sulphate monohydrate	16,900
Molybdcic acid (sodium salt)	0,213
Potassium Iodide	0,830
Zinc sulphate heptahydrate	14,300
VİTAMİNLER	mg/l
D-biotin	0,050
Folic acid	0,500
myo-Inositol	100,000
Nicotinic acid (free acid)	5,000
Pyridoxine HCl	0,500
Thiamine hydrochloride	0,500
AMİNO ASİT	mg/l
Glycine	2,000
TOPLAM(gms/litre)	4,1

Otoklavdan çıkarılan besi ortamları Laminar Akımlı Kabin (Mikrotest MLF-120 Laminar Flow) içinde soğumaya alınmış ve soğumalarının ardından her kaba 50 ml besi ortamı gelecek şekilde kültür kaplarına dökülmüş ve katılaşmaya bırakılmıştır. Herbesiyerinden 20'şer adet olacak şekilde toplamda 60 adet kültür kabı hazırlanmış ve ekim işlemlerine kadar +4 °C'deki soğutucuya kaldırılmıştır.

2.3.3. Tohum Yüzey Sterilizasyonu

Sıgla tohumlarının yüzey sterilizasyonu için öncelikle tohumlar 20 dk boyunca akan su altında yıkanan tohumlar daha sonra 2 saat boyunca 23 °C'deki saf su içinde bekletilmiştir. Su üzerinde yüzen boş tohumlar atılarak dibe çöken dolu tohumlar sterilizasyon işlemine alınmıştır.

Öncelikle sterilizasyon işlemlerinde kullanılacak tüm alet ve ekipmanlar 121,6 C'de 15 dk süreyle Laboratuvar Otoklavı (Daihan Scientific-MaXterile60) içinde otoklavlanmıştır. Yıkama ve şişirme işlemlerinin ardından yapılacak tüm sterilizasyon basamakları Laminar Akımlı Kabin (Mikrotest MLF-120 LaminarFlow) içinde yapılmıştır.

Sıgla tohumları laminar akımlı kabin içinde sırasıyla %70 Ethanol (C₂H₅OH) içinde 10 dk, %10 Hidrojen Peroksit(H₂O₂) içinde 10 dk ve %10 ticari Sodyum Hipoklorid (NaClO) (Domestos®) içinde 10 dk boyunca 50 ml Falcon Tüp içinde çalkalanmıştır. Her basamak arasında tohumlar üçer kere steril saf su ile durulanmıştır. Son basamaktan sonra da 3 kere steril saf su ile durulanan tohumlar steril kurutma kağıdı üzerinde kurutularak ekim işlemine geçilmiştir.

2.3.4. Tohum Ekimi

Yüzey sterilizasyonu tamamlanan tohumlar ekim işlemine alınmıştır. Laminar akımlı kabin içerisinde her kaba 5 adet tohum olacak şekilde 60 kaba toplamda 300 adet tohum ekimi yapılmıştır. MS, WPM ve OM besi ortamlarından her birine 100 adet tohum ekilecek şekilde deneme kurulmuştur. Ekim sonrası ekim yapılan bitki kültür kapları 23 °C'deki iklim odasına alınarak karanlık periyotta çimlendirmeye bırakılmıştır.

2.3.5. Çimlenme Sürecinin Takibi

Tohum ekiminin ardından iklim odasına alınan tohumlarda ilk çimlenme 4 gün sonra WPM besi ortamında gözlenmiş ve tüm tohumların çimlenmesi 7. günde tamamlanmıştır.

Çimlenmenin tamamlanmasının ardından iklim odası ışıklandırma periyodu 16 saat aydınlık 8 saat karanlık şekilde ayarlanmış ve fideler ilk kültüre kadar 6 hafta süreyle gelişim sürecine alınmıştır. 6 hafta sonunda yapılan gözlemde en iyi gelişimin WPM besi ortamında elde edildiği görülmüştür.

2.4.Mikroçoğaltım Süreci

Çimlenme sürecinde gelişen Sığla fideleri 6-8 hafta arayla 5 kez mikroçoğaltım işlemine alınmıştır.

2.4.1.Kültür Kabı Seçimi

Bitki Kültür Kaplarında (PlantCultureDish) çimlendirilen Sığla fidelerinin daha iyi uzayabilmeleri için mikroçoğaltım süreci boyunca 70x70x100 mm (En x Boy x Yükseklik) ölçülerinde Magenta® kültür kabı olarak kullanılmıştır. (Şekil 2.6)



Şekil 2.6. Magenta® kültür kabı

2.4.2.Besi Ortamı Hazırlığı

Çimlenme aşamasının ardından en iyi gelişimi gösteren WPM besisi ortamı mikroçoğaltım süreci için seçilmiştir. Ayrıca Sutter ve Barker 1984'e göre *Liquidambar styraciflua* türünde iki yaşındaki genç bireylerin yanında 20 ile 30 yaş arasında olan bireylerin tomurcuklarını kullanıldığı bir çalışmada WPM besin ortamında (Woody Plant Medium) Linsmaier ve Skoog besin ortamına (LS) göre daha fazla sürgün edilmiş ve genotipler arasında farklılıklar olduğu belirtilmiştir.

WPM besisi ortamı hazırlamak için 2,462 g/l WPM hazır besisi ortamı ve 30 g/l Sukroz tartılarak bir beher içine alınmış, steril saf su eklenerek manyetik karıştırıcı ile homojen olarak karıştırılmıştır. pH 5,8'e ayarlanarak 1 litrelik otoklav şişesine aktarılmış ve katılaştırıcı olarak 7 g/l Agar eklenerek 121,6 °C'de 15 dakika süreyle Laboratuvar Otoklavı içinde otoklavlanmıştır.

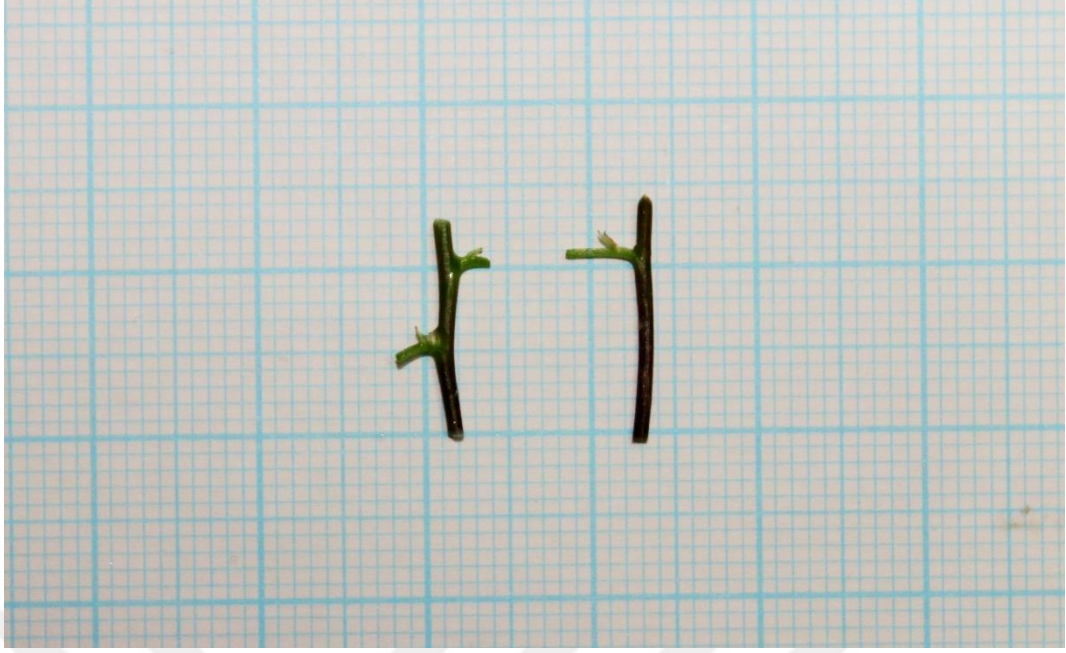
Besi ortamına Sığla fidelerinden alınacak eksplantlardan geçebilecek ve bitki gelişimini etkileyebilecek sekonder metabolitler için daha önce karbon kaynağı olarak belirlenen 30 g/l Sukroz'a ilave olarak 10 g/l Aktif Kömür (Charcoal) ilave edilmiştir. Hazırlanan besisi ortamı her kaba 50 ml gelecek şekilde kaplara aktarılmıştır.

2.4.3.Eksplantların Hazırlığı ve Mikroçoğaltım

Meristem kültürü için yeterli miktarda materyal sağlamak amacıyla mikroçoğaltım işlemine başvurulmuştur.

Kültür kaplarında gelişen sığla fideleri laminar akımlı kabin içinde her biri en az 1 göz içerecek şekilde 8-10 mm boylarında eksplantlara bölünmüş (Şekil 2.7) ve her kültür kabına 5 adet eksplant gelecek şekilde kültür kabına dikim yapılmıştır.

Mikroçoğaltım çalışmaları bitkiler 8-9 cm boya geldikçe (Şekil 2.8) 6-8 hafta aralıklarla 5 kez tekrarlanmıştır. Gelişimlerinin ardından Meristem Kültürü aşamasına geçilmiştir.



Şekil 2.7. Anadolu Sığlası eksplantları



Şekil 2.8. Meristem kültürü için yetiştirilen Anadolu Sığlası bitkileri

2.5. Meristem Kùltürü Süreci

Mikroçoğaltım çalışmalarının tamamlanmasının ardından en iyi gelişim gösterenbitkiye ait 3 klondan alınan meristem dokuları ile bor tuzları içeren besi ortamları kullanılarak deneme kurulmuştur. Aynı bitkiye ait bir klon da kontrol grubu olarak ayrılarak hiçbir bor tuzu uygulanmamıştır.

2.5.1. Bor Tuzları Seçimi

Meristem kùltüründe WPM besi ortamına ek olmak üzere deneme için 4 farklı bor tuzu (Borik Asit, Sodyum Perborat, Sodyum Metaborat ve Disodyum Oktaborat) seçilmiştir. Deneme sürecinde bu tuzların 1 mg/l, 3 mg/l ve 5 mg/l olmak üzere 3 farklı dozu kullanılmıştır.

2.5.2. Kùltür Kabı Seçimi

Meristem kùltürü için 100x40 mm (Çap x Yükseklik) ölçülerinde Gamma-steril Plant Culture Dish (SPL Life Science Plant Culture Dish) kùltür kabı olarak seçilmiştir. (Şekil...)

2.5.3. Deneme Deseninin Oluşturulması

Mikroçoğaltım aşamasının ardından bor tuzlarının meristem kùltürü üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla bir deneme deseni oluşturulmuştur. Mikroçoğaltım aşamasında en iyi gelişimi gösteren ferde ait 3 klon, deneme deseninde 3 tekerrür olarak alınmıştır. Meristem kùltürü deneme deseninde 4 farklı bor tuzu, bu tuzların 1 mg/l, 3 mg/l ve 5 mg/l olmak üzere 3 farklı konsantrasyonu ve 3 tekerrür ile birlikte kontrol grubunun da denemeye dahil edilmesi ile 37 parsel oluşturulmuştur (Çizelge 2.4). Kontrol grubuna hiçbir bor tuzu uygulanmamıştır.

Çizelge 2.4. Meristem kültürü deneme deseni

Kontrol	KLON	Borik Asit (mg/l)			Sodyum Perborat (mg/l)			Sodyum Metaborat (mg/l)			Disodyum Oktaborat (mg/l)		
KONTROL	K 1	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5
	K 2	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5
	K 3	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5

2.5.4. Besi Ortamı Hazırlığı

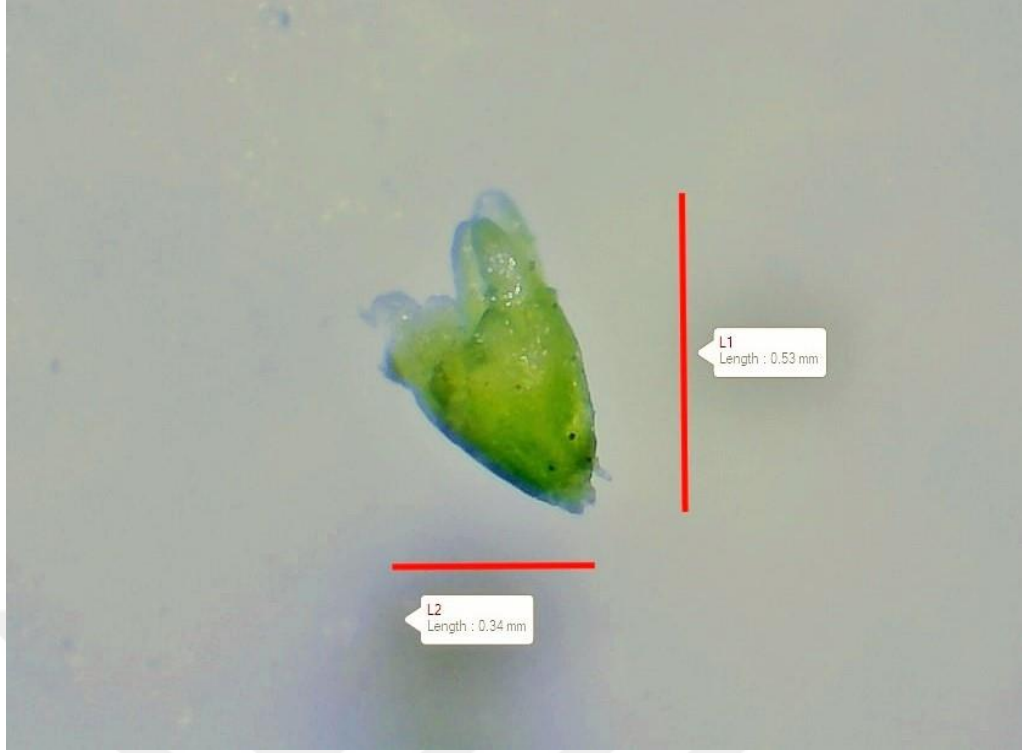
Mikroçlğaltım aşamasının ardından başlanılan meristem kültürü aşamasında WPM besi ortamı seçilmiştir.

WPM besi ortamı hazırlamak için 2,462 g/l WPM hazır besi ortamı ve 30 g/l Sukroz tartılarak bir beher içine alınmış, steril saf su eklenerek manyetik karıştırıcı ile homojen olarak karıştırılmıştır. Besi ortamına her birinden 1 mg/l, 3 mg/l ve 5 mg/l konsantrasyonlarında olmak üzere 4 farklı bor tuzu (Borik Asit, Sodyum Perborat, Sodyum Metaborat ve Disodyum Oktaborat), ayrıca bitki gelişim düzenleyici olarak 1 mg/l dozunda Benzil Adenin (BA) ilave edilmiştir. pH 5,8'e ayarlanarak otoklav şişesine aktarılmış ve katılaştırıcı olarak 7 g/l Agar eklenerek 121,6 °C'de 15 dakika süreyle Laboratuvar Otoklavı içinde otoklavlanmıştır.

Hazırlanan besi ortamları her bitki kültür kabına 50 ml gelecek şekilde kaplara aktarılmıştır.

2.5.5. Meristemlerin alınması ve Meristem Kültürü

Mikroçoğaltım aşamasının ardından seçilen Sığla bitkisine ait klonlardan bistüri ve penset yardımıyla stereo soom mikroskop altında meristem dokuları alınarak her kaba 10 adet meristem gelecek şekilde kültür kabına ekimleri yapılmıştır. (Şekil 2.9)



Şekil 2.9. Anadolu Sığılası bitkisinden alınan meristem dokusu (Uzunluklar L1:0,53 mm, L2:0,34 mm)

Her kültür kabına meristemler, aralarında en az 1,5 cm olacak şekilde beşerli iki sıra halinde, yara yüzleri besi ortamına temas edecek şekilde yerleştirilmiş ve ağızları güzelce kapatılan kültür kapları 23 C’de 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık periyotta ayarlanmış iklimlendirme odasında gelişime bırakılmıştır. Yukarıda sayılan işlemler sırası 4-5 hafta ara ile 5 kez tekrarlanmıştır.

2.6. Meristem kültürü yapılan *Liquidambar orientalis* bitkisinde genetik kararlılığın belirlenmesi

2.6.1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA özütlemesi Soltis Lab DNA ekstraksiyon protokolüne göre optimize edilip aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir (Doyle ve Doyle, 1987; Cullings,1992).

- Meristem kültürü işlemi ardından örneklerin kallus dokusu, yaprak ve gövdeleri DNA izolasyonu için ayrılmış ve -20 °C’de muhafaza edilmiştir.
- -20 °C’de muhafaza altındaki soğutucudan çıkarılan kallus dokusu, yaprak ve gövde örnekleri sterilize edilmiş seramik havanlar içerisine alınmıştır.

Mekanik parçalanma sağlamak amacı ile Sığla örneğinin bulunduğu havan içerisine yaklaşık 5 ml kadar sıvı azot eklenmiştir. Bitki parçaları hızlı bir şekilde ezilerek toz haline getirilmiştir.

- Toz haline getirilen bitki parçaları havanın içinden spatül yardımı ile 1,5 ml'lik eppendorf tüpler içine alınmış ve 0,03 gram olacak şekilde tartılmıştır.
- Tartılan bitki parçalarının üzerine 60 °C'de su banyosunda ısıtılmış 700 µl CTAB buffer eklenmiş ve 10-20 saniye boyunca vortekslenmiştir.
- Vortekslenen örnekler 60°C'de 1 saat süresince su banyosu içinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon boyunca 15 dk.da bir vorteksleme işlemi yinelenmiştir.
- İnkübasyon sonrasında eppendorf tüplere 500 µl 24:1 kloroform-izoamil alkol eklenerek tüpler iyice vortekslenmiştir.
- Tüpler daha sonra 14000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiş, tüplerin içindeki yaklaşık 300-350 µl'lik süpernatant kısım alınarak yeni ve temiz eppendorf tüplere aktarılmıştır.
- Yeni tüplere alınan süpernatant kısmının 0,08 katı 7,5 M amonyum asetat ve 0,54 katı izopropanol eklenmiştir.
- Tüpler tüplüğe yerleştirilip yaklaşık 2 dk boyunca aşağı yukarı çevrilerek karıştırılmıştır.
- Karıştırma işleminin ardından inkübasyon için +4°C'de 15-30 dk bekletilmiştir.
- İnkübasyon sonrasında 14000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiş ve tüplerdeki pellet kaybedilmeyecek şekilde süpernatant kısmı dikkatlice boşaltılmıştır.
- Tüplerin içinde kalan pellet üzerine 700 µl soğuk %70 etanol eklenmiş ve 2 dk elde alt-üst edilip karıştırılmıştır.
- Ardından 14000 rpm'de tekrar 5 dk santrifüjlenmiştir.
- Tüplerin içinden süpernatant kısım dikkatlice boşaltılmış ve tüpler ters bir şekilde 55°C'lik etüvde 1 saat süresince kurutulmuştur.
- Etüvde kurutulan örnekler 100 µl TE tamponda çözülmüştür. Üzerine 1 µl RNAaz enzimi eklenerek etüvde 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyonun ardından tüplere 400 µl 24:1 kloroform izoamil alkol eklenerek 10 dk elle karıştırılmış ve oluşan fazlar gözlenmiştir.

- Daha sonra 14000 rpm’de 10 dk santrifüjlendiren süpernatant kısmı yeni tüplere aktarılmıştır. Alınan süpernatant miktarının yaklaşık iki katı kadar %96’lık soğuk etanol eklenerek tüpler yavaşça karıştırılmıştır.
- Tüpler inkübasyon için +4°C’de 30 dk beklemeye alınmıştır. Inkübasyon işleminin ardından 14000 rpm’de 5 dk santrifüjlenmiş ve santrifüj işleminin ardından pellet kaybedilmeden tüpler boşaltılmıştır.
- Tüplerin üzerine 700 µl %70’lik soğuk etanol eklenip karıştırılmıştır. 14000 rpm’de 5 dakika santrifüjlendiren pelletin düşmemesine dikkat edilerek süpernatant kısmı dikkatlice boşaltılmıştır.
- Tüpler ters çevirilip etüvde 55°C’de 1 saat kurutulmuştur.
- Kurutma işleminden sonra örnekler 100 µl TE tamponda çözülerek etüvde 15 dk 55°C’de inkübe edilip muhafaza edilmek üzere -20°C’ soğutucuya kaldırılmıştır.

Çizelge 2.5. DNA ekstraksiyonu için kullanılan CTAB solüsyonunun hazırlanması

1 M Tris, pH: 8	100 ml
5 M NaCl	280 ml
0,5 M EDTA	40 ml
CTAB	20 gram
1 litreye tamamlanır.	

Çizelge 2.6. CTAB solüsyon bileşenlerinin hazırlanması

1 M Tris, Ph:8		5 M NaCl		0,5 M EDTA	
Tris	121,1 gr	NaCl	292,2 gr	EDTA	186,12 gr
ddH ₂ O	700 ml	ddH ₂ O	700 ml	ddH ₂ O	750 ml
700 ml’de çözülür ve 900 ml’ye tamamlanır.		700 ml’de çözülür.		20 gr NaOH tabletleri eklenir.	
pH: 8’e ayarlanır.		1 litreye tamamlanır.		pH: 8’e ayarlanır.	
1 litreye tamamlanır.				1 litreye tamamlanır.	

Çizelge 2.7. DNA izolasyonu için kullanılan bileşenlerin uygulamadan önceki solüsyon karışım oranı

CTAB	PVP	β- merkaptotanol
0,5 ml	0,02 gr	2,5 µl
5 ml	0,2 gr	25 µl
20 ml	0,8 gr	100 µl

2.6.2. DNA Konsantrasyonunun Tespiti

İzolasyon sonucunda elde edilen genomik DNA miktarı spektrofotometrik olarak belirlenip buna göre moleküler analizlerde kalıp olarak kullanılacak DNA uygun derişimde sulandırılmıştır (Doyle ve Doyle, 1987).

2.6.3. ISSR, PCR ve jel elektroforezi analizleri

Genomik DNA'sı özütlenen Anadolu Sığılası (*Liquidambar orientalis* Miller) bitkisine ait farklı bireyler, öncelikle farklı 10 ISSR primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılmış ve agaroz jel elektroforezinde incelenerek en iyi bant veren 5 ISSR primeri belirlenmiştir. Daha sonra bireyler bu 5 ISSR primeri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. PCR döngüleri, kullanılacak primerlere bağlı olarak optimize edilmiştir (Çizelge 2.8, Çizelge 2.9). Toplam hacim 25µl olacak şekilde PCR protokolünün bileşenlerinin derişimleri ayarlanmış ve reaksiyon gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.10). Çoğaltımı yapılan PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde incelenmiştir.

Çizelge 2.8. Williams ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve Martins-Lopes ve arkadaşlarına göre modifiye edilen PCR protokolü (Williams vd., 1990; Martins-Lopes vd., 2009)

Basamak Adı	Sıcaklık (°C)	Süre (Dk.)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	3	1X
Denatürasyon	95	1	35X
Bağlanma	55	1	
Uzama	68	1	
Son Uzama	72	6	1X

Çizelge 2.9. Martin-Lopez ve arkadaşları (Martins-Lopes vd., 2009) tarafından geliştirilmiş ISSR primerlerden proje çalışması için seçilen primerler ve dizileri.

Primer İsmi	Dizi	Gen Bank Giriş No
ISSR 1	(AG)8T	UBC 807
ISSR 3	(CA)8AGT	UBC 855

ISSR 7	(GA)8T	UBC 810
ISSR 826	(TC)8C	UBC 823
ISSR E.D.4	(GT)8CTA	UBC 856

Çizelge 2.10. Williams ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve Martins-Lopes ve arkadaşlarına göre modifiye edilen PCR protokolünün bileşenlerinin derişimleri (Kalendar vd., 2011; Smýkal vd., 2011)

Bileşen	Reaksiyon Derişimi
10X PCR Tamponu	1X
MgCl ₂	2,5 mM
dNTP	0,4 mM
Primer	1 µM (40 ng)
Genomik DNA	50 ng
TaqPolimeraz	2 unite
Toplam Hacim	25µl

2.6.4. Elektroforez aşaması

2.6.4.1. Agaroz jel hazırlanışı

PCR reaksiyonu gerçekleştikten sonra reaksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini öğrenmek amacıyla PCR ürünleri, SimpliAmp™ Thermal Cycler(Cat No. A24811) cihazıyla, %1,5’lik agaroz jelde, 100 V sabit akımda 180 dk yürütülmüştür. Agaroz jel, %1’lik TAE Buffer ile hazırlanmıştır. 1 lt 50X TAE buffer hazırlamak için 242 g Tris base, 57.1 g Glacial asetik asit ve 100 ml 0.5 M EDTA solüsyon 800 ml ddH₂O içerisinde çözdürülür, pH=8’e ayarlanır ve distile su ile 1 litreye tamamlanır.

2.6.5. Verilerin Değerlendirilmesi

Agaroz jel elektroforezi ile yürütülen örnekler jel görüntüleme cihazında (Major Science, UVC1-1100) görüntülenmiştir. ISSR primerleri ile çoğaltılan DNA dizilerinin oluşturduğu bant profilleri incelenirken Şekil 2.4.’te gösterilen Thermo Fisher Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder (#SM0311) ve ABM 100 bp Opti-DNA Marker (#G016) rehber olarak kullanılmış ve bant var ise “1”, yok ise “0” rakamı verilerek kodlanmış, elde edilen veriler Microsoft® Office Excel programına işlenmiştir.

ISSR analizleri sonucunda genetik kararlılık veya farklılıkların belirlenmesinde, örnekler arasındaki benzerlikleri hesaplamak için jel görüntüleri, Sokal ve Sneath (1963) tarafından geliştirilen “Benzerlik Oranı” formülü kullanılarak analiz edilecektir (Sokal ve Sneath 1963).

$$\text{Benzerlik Oranı} = \frac{\text{Homolog Bantlar}}{\text{Homolog Bantlar} + \text{Homolog Olmayan Bantlar}} \times 100$$



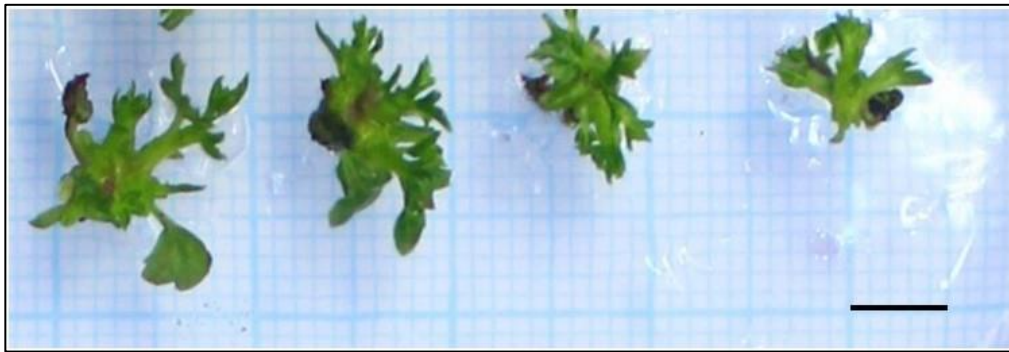
3. BULGULAR

3.1. *In vitro* bor tuzu uygulamaları

In vitro gelişen *L. orientalis* mikro-sürgünlerinden izole edilen meristem eksplantları üç farklı (1, 3 ve 5 mg/l) konsantrasyonda dört farklı bor tuzu (borik asit, sodyum metaborat, sodyum perborat ve disodyum oktaborat) içeren 1mg/l benzil adenin ile desteklenen WPM besin ortamında, meristemden gelişen gövde sayısı, gövde uzunluğu ve oluşan kallus yapısı dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Bor tuzu içermeyen besin ortamında gelişen meristemlerden (kontrol) en az 3 en fazla 8 gövde sayısı elde edilirken, maksimum gövde uzunluğu 0,8 cm olarak ölçülmüştür (Çizelge 3.1). Bor tuzu içermeyen kontrol grubu meristemlerden sağlıklı ve normal gelişim gösteren mikro-sürgünler gelişmiştir (Şekil 3.1).

Çizelge 3.1. 1mg/l benzil adenin ile desteklenen WPM besin ortamında gelişen kontrol grubu meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri.

Meristem No	KONTROL				
	Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maksimum Gövde Uzunluğu	Kallus	
				En (cm)	Genişlik (cm)
1	7	0,49	0,7	2,45	1,4
2	8	0,33	0,6	2,2	1,5
3	4	0,25	0,3	-	-
4	2	0,6	0,8	0,4	0,3
5	3	0,33	0,4	-	-
6	2	0,6	0,8	0,5	0,3
7	3	0,3	0,5	-	-
8	5	0,36	0,5	1	0,8
9	3	0,37	0,4	0,3	0,3
10	3	0,23	0,3	0,7	0,8



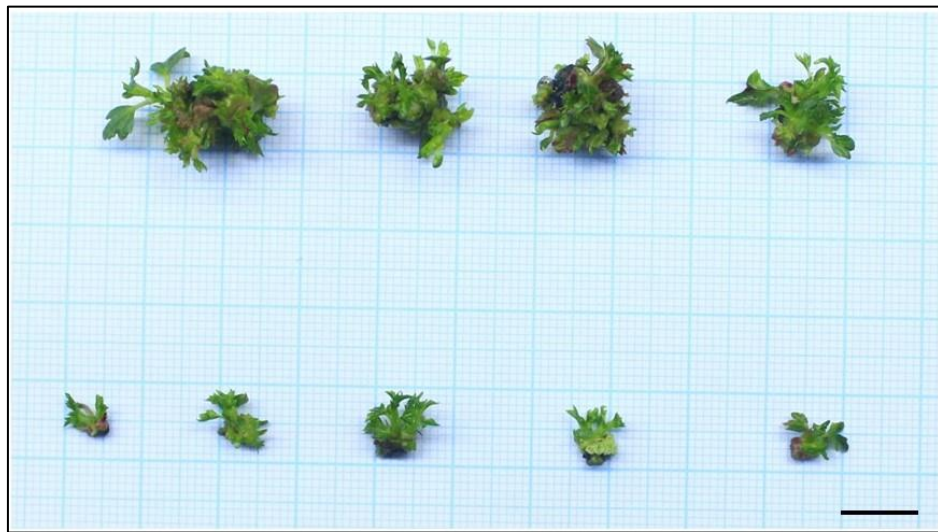
Şekil 3.1. Kontrol grubu meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).

3.1.1. Borik Asit Uygulamaları

1mg/l borik asit içeren 1mg/l benzil adenin ile desteklenen WPM besin ortamında gelişen üç farklı klona ait meristemlerden en az 1 en fazla 7 adet meristem başına mikro-sürgün elde edilmiştir ve mikro-sürgün uzunlukları ise 0,1-1,1 cm arasında ölçülmüştür (Çizelge 3.2, Şekil 3.2).

Çizelge 3.2. 1mg/l borik asit içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri.

Meristem No	KLON 1					KLON 2					KLON 3				
	Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus		Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus		Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus	
				Boy (cm)	Genişlik (cm)				Boy (cm)	Genişlik (cm)				Boy (cm)	Genişlik (cm)
1	2	0,75	0,9	0,2	0,3	1	0,3	0,3	-	-	5	0,36	0,5	0,7	1,2
2	4	0,5	0,7	0,3	0,3	1	0,2	0,2	-	-	2	0,3	0,3	0,3	0,3
3	1	0,4	0,4	-	-	1	0,4	0,4	-	-	2	0,25	0,3	0,2	0,3
4	1	0,3	0,3	-	-	1	0,2	0,2	-	-	-	0	0	-	-
5	2	0,3	0,3	-	-	1	0,3	0,3	-	-	5	0,34	0,5	0,4	0,5
6	1	0,1	0,1	-	-	1	0,3	0,3	-	-	2	0,25	0,3	-	-
7	1	0,1	0,1	-	-	1	0,2	0,2	-	-	2	0,25	0,3	-	-
8	1	0,6	0,6	0,2	0,3	1	0,3	0,3	-	-	6	0,25	0,3	0,9	0,7
9	7	0,53	0,7	0,9	0,7	3	0,37	0,5	0,3	0,3	3	0,37	0,5	0,4	0,2
10	4	0,7	1,1	0,5	0,7	3	0,33	0,6	0,2	0,2	6	0,27	0,5	1,2	0,6



Şekil 3.2. 1mg/l borik asit içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).

3mg/l borik asit içeren 1mg/l benzil adenin ile desteklenen WPM besin ortamında gelişen üç farklı klona ait meristemlerden en az 1 en fazla 11 adet meristem başına mikro-sürgün elde edilmiştir ve mikro-sürgün uzunlukları ise 0,2-0,9 cm arasında ölçülmüştür (Çizelge 3.3, Şekil 3.3).

Çizelge 3.3. 3mg/l borik asit içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri.

Meristem No	KLON 1					KLON 2					KLON 3				
	Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus		Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus		Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus	
				Boy (cm)	Genişlik (cm)				Boy (cm)	Genişlik (cm)				Boy (cm)	Genişlik (cm)
1	-	0	0	-	-	6	0,42	0,6	0,3	0,4	-	0	0	-	-
2	-	0	0	-	-	2	0,35	0,4	0,2	0,3	-	0	0	-	-
3	-	0	0	-	-	2	0,3	0,4	0,2	0,2	-	0	0	-	-
4	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-
5	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	7	0,39	0,7	0,4	0,4
6	-	0	0	-	-	11	0,33	0,5	1,6	2	2	0,2	0,2	0,2	0,3
7	1	0,7	0,7	0,2	0,2	4	0,4	0,5	0,5	0,3	1	0,3	0,3	0,2	0,3
8	1	0,9	0,9	0,3	0,3	3	0,47	0,8	0,2	0,2	1	0,2	0,2	-	-
9	1	0,6	0,6	0,2	0,2	3	0,37	0,5	0,3	0,3	1	0,2	0,2	-	-
10	2	0,8	0,9	0,3	0,2	6	0,62	0,8	0,7	0,3	1	0,2	0,2	-	-



Şekil 3.3. 3mg/l borik asit içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).

5mg/l borik asit içeren 1mg/l benzil adenin ile desteklenen WPM besin ortamında gelişen üç farklı klona ait meristemlerden en az 1 en fazla 7 adet meristem başına mikro-sürgün elde edilmiştir ve mikro-sürgün uzunlukları ise 0,3-1,2 cm arasında ölçülmüştür (Çizelge 3.4, Şekil 3.4).

Çizelge 3.4. 5mg/l borik asit içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri.

Meri stem No	KLON 1					KLON 2					KLON 3				
	Göv de Uzu nlüğ u Ortal ama	Göv de Uzu nlüğ u Ortal ama	Mak s. Göv de Uzu nlüğ u	Kallus		Göv de Uzu nlüğ u Ortal ama	Göv de Uzu nlüğ u Ortal ama	Mak s. Göv de Uzu nlüğ u	Kallus		Göv de Uzu nlüğ u Ortal ama	Göv de Uzu nlüğ u Ortal ama	Mak s. Göv de Uzu nlüğ u	Kallus	
				En (cm)	Gen işlik (cm)				En (cm)	Gen işlik (cm)				En (cm)	Gen işlik (cm)
1	-	0	0	-	-	1	0,5	0,5	-	-	-	0	0	-	-
2	-	0	0	-	-	1	0,5	0,5	-	-	1	0,3	0,3	-	-
3	1	1,2	1,2	-	-	2	0,3	0,4	-	-	7	0,23	0,3	1,2	0,3
4	1	0,4	0,4	-	-	3	0,4	0,7	0,2	0,2	2	0,25	0,3	0,2	0,2
5	2	0,25	0,3	0,2	0,3	1	0,3	0,3	-	-	4	0,25	0,4	0,6	0,3
6	1	0,3	0,3	0,3	0,3	3	0,53	0,7	0,4	0,3	1	0,3	0,3	-	-
7	1	0,3	0,3	-	-	3	0,6	0,8	0,2	0,2	1	0,2	0,2	-	-
8	1	0,3	0,3	-	-	1	0,3	0,3	-	-	2	0,25	0,3	0,2	0,2
9	1	0,3	0,3	-	-	3	0,57	0,7	0,2	0,2	3	0,37	0,5	0,3	0,2
10	1	0,8	0,8	-	-	1	0,3	0,3	0,2	0,2	1	0,3	0,3	-	-



Şekil 3.4. 5mg/l borik asit içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).

3.1.2. Sodyum Perborat Uygulamaları

1mg/l sodyum perborat içeren 1mg/l benzil adenin ile desteklenen WPM besin ortamında gelişen üç farklı klona ait meristemlerden en az 1 en fazla 8 adet meristem başına mikro-sürgün elde edilmiştir ve mikro-sürgün uzunlukları ise 0,2-0,6 cm arasında ölçülmüştür (Çizelge 3.5, Şekil 3.5).

Çizelge 3.5. 1mg/l sodyum perborat içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri.

Meristem No	KLON 1					KLON 2					KLON 3				
	Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus		Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus		Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus	
				En (cm)	Genişlik (cm)				En (cm)	Genişlik (cm)				En (cm)	Genişlik (cm)
1	-	0	0	-	-	2	0,35	0,4	0,3	0,3	1	0,2	0,2	0,1	0,1
2	8	0,32	0,4	1,2	1,1	2	0,2	0,3	-	-	6	0,27	0,3	0,6	0,5
3	3	0,33	0,4	0,4	0,3	-	0	0	-	-	1	0,2	0,2	-	-
4	1	0,4	0,4	0,2	0,2	1	0,3	0,3	-	-	1	0,3	0,3	0,2	0,2
5	1	0,3	0,3	0,2	0,2	1	0,2	0,2	-	-	1	0,1	0,1	-	-
6	1	0,2	0,2	-	-	3	0,3	0,3	-	-	1	0,2	0,2	0,1	0,1
7	5	0,3	0,4	0,9	0,6	-	0	0	0,3	0,3	2	0,35	0,4	0,3	0,3
8	2	0,45	0,6	0,2	0,2	1	0,3	0,3	-	-	2	0,25	0,3	0,2	0,2
9	1	0,3	0,3	-	-	1	0,3	0,3	-	-	1	0,4	0,4	0,1	0,2
10	-	0	0	-	-	1	0,2	0,2	-	-	3	0,3	0,4	0,4	0,2



Şekil 3.5. 1mg/l sodyum perborat içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).

3mg/l sodyum perborat içeren 1mg/l benzil adenin ile desteklenen WPM besin ortamında gelişen üç farklı klona ait meristemlerden en az 1 en fazla 9 adet meristem başına mikro-sürgün elde edilmiştir ve mikro-sürgün uzunlukları ise 0,1-2,5 cm arasında ölçülmüştür (Çizelge 3.6, Şekil 3.6).

Çizelge 3.6. 3mg/l sodyum perborat içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri.

Meristem No	KLON 1					KLON 2					KLON 3				
	Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus		Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus		Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus	
				En (cm)	Genişlik (cm)				En (cm)	Genişlik (cm)				En (cm)	Genişlik (cm)
1	1	0,2	0,2	0,2	0,2	1	0,1	0,1	-	-	2	0,6	0,9	0,4	0,3
2	5	0,86	1,3	0,6	0,4	5	0,54	1,2	0,3	0,3	3	0,6	0,9	0,6	0,4
3	2	0,3	0,4	0,2	0,2	-	0	0	-	-	1	0,2	0,2	-	-
4	1	0,4	0,4	-	-	4	0,4	0,6	0,2	0,2	1	0,2	0,2	-	-
5	1	0,3	0,3	0,2	0,2	3	0,57	0,8	0,3	0,3	6	0,33	0,4	0,7	0,4
6	1	0,1	0,1	-	-	2	0,6	0,6	0,2	0,2	1	0,3	0,3	-	-
7	1	0,5	0,5	0,2	0,2	1	0,5	0,5	0,2	0,2	3	0,3	0,4	0,3	0,2
8	1	0,5	0,5	0,6	0,5	1	0,4	0,4	-	-	1	0,2	0,2	-	-
9	2	0,35	0,5	0,2	0,2	1	0,2	0,2	-	-	1	0,4	0,4	0,2	0,2
10	9	1,1	1,4	2,2	1,4	1	2,5	2,5	0,4	0,4	1	0,3	0,3	0,2	0,2



Şekil 3.6. 3mg/l sodyum perborat içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).

5mg/l sodyum perborat içeren 1mg/l benzil adenin ile desteklenen WPM besin ortamında gelişen üç farklı klona ait meristemlerden en az 1 en fazla 11 adet meristem başına mikro-sürgün elde edilmiştir ve mikro-sürgün uzunlukları ise 0,2-2,7 cm arasında ölçülmüştür (Çizelge 3.7, Şekil 3.7).

Çizelge 3.7. 5mg/l sodyum perborat içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri.

Meristem No	KLON 1					KLON 2					KLON 3				
	Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus		Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus		Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus	
				En (cm)	Genişlik (cm)				En (cm)	Genişlik (cm)				En (cm)	Genişlik (cm)
1	1	0,3	0,3	-	-	1	0,3	0,3	-	-	1	0,3	0,3	0,2	0,2
2	4	0,35	0,4	0,3	0,3	1	0,2	0,2	-	-	5	0,48	0,7	1,8	0,8
3	1	0,2	0,2	-	-	-	0	0	-	-	1	0,3	0,3	-	-
4	1	0,6	0,6	-	-	1	0,1	0,1	-	-	3	0,33	0,4	0,3	0,3
5	1	0,2	0,2	-	-	1	0,3	0,3	-	-	3	0,23	0,3	0,2	0,2
6	1	0,3	0,3	-	-	1	0,3	0,3	-	-	4	0,23	0,3	0,6	0,4
7	1	0,3	0,3	-	-	3	0,33	0,6	-	-	7	0,3	0,4	0,8	0,8
8	7	0,96	1,4	1,6	1,2	3	0,4	0,6	-	-	5	0,3	0,3	0,6	0,4
9	11	0,94	2,7	1,2	1,4	1	0,3	0,3	-	-	3	0,23	0,3	0,2	0,3
10	6	0,87	1,6	1,2	1,6	6	0,42	0,7	0,8	0,6	5	0,3	0,3	1,1	0,6



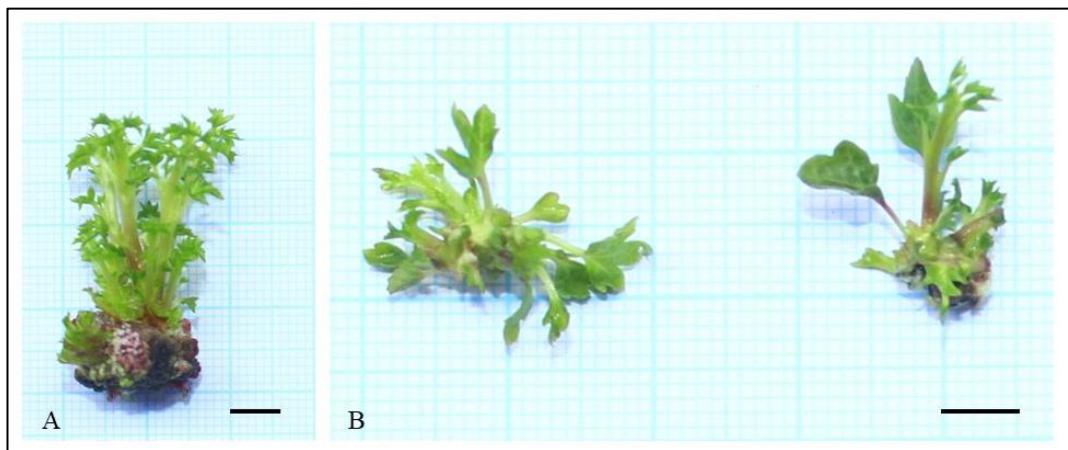
Şekil 3.7. 5mg/l sodyum perborat içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).

3.1.3. Sodyum Metaborat Uygulamaları

1mg/l sodyum metaborat içeren 1mg/l benziladenin ile desteklenen WPM besin ortamında gelişen üç farklı klona ait meristemlerden en az 1 en fazla 9 adet meristem başına mikro-sürgün elde edilmiştir ve mikro-sürgün uzunlukları ise 0,2-2,6 cm arasında ölçülmüştür (Çizelge 3.8, Şekil 3.8).

Çizelge 3.8. 1mg/l sodyum metaborat içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri.

Meristem No	KLON 1					KLON 2					KLON 3				
	Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus		Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus		Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus	
				En (cm)	Genişlik (cm)				En (cm)	Genişlik (cm)				En (cm)	Genişlik (cm)
1	3	0,33	0,4	0,3	0,2	1	0,1	0,1	-	-	2	0,25	0,3	0,3	0,2
2	5	0,32	0,4	1,1	0,6	1	0,3	0,3	0,1	0,1	1	0,2	0,2	-	-
3	1	0,4	0,4	0,3	0,2	1	0,9	0,9	0,2	0,3	2	0,3	0,3	0,2	0,2
4	9	1,59	2,6	1,4	1,3	1	0,2	0,2	-	-	2	0,25	0,3	0,2	0,2
5	2	0,5	0,7	0,2	0,2	1	0,3	0,3	0,2	0,2	3	0,27	0,4	0,6	0,3
6	6	0,25	0,3	2,3	0,8	2	0,25	0,3	0,2	0,1	1	0,3	0,3	0,3	0,2
7	3	0,57	1,1	0,3	0,3	1	0,4	0,4	-	-	1	0,3	0,3	0,2	0,2
8	3	0,4	0,6	0,3	0,3	1	0,2	0,2	-	-	2	0,25	0,3	0,2	0,2
9	-	0	0	-	-	2	0,35	0,4	-	-	1	0,3	0,3	0,2	0,2
10	-	0	0	-	-	1	0,2	0,2	-	-	2	0,3	0,3	0,2	0,2

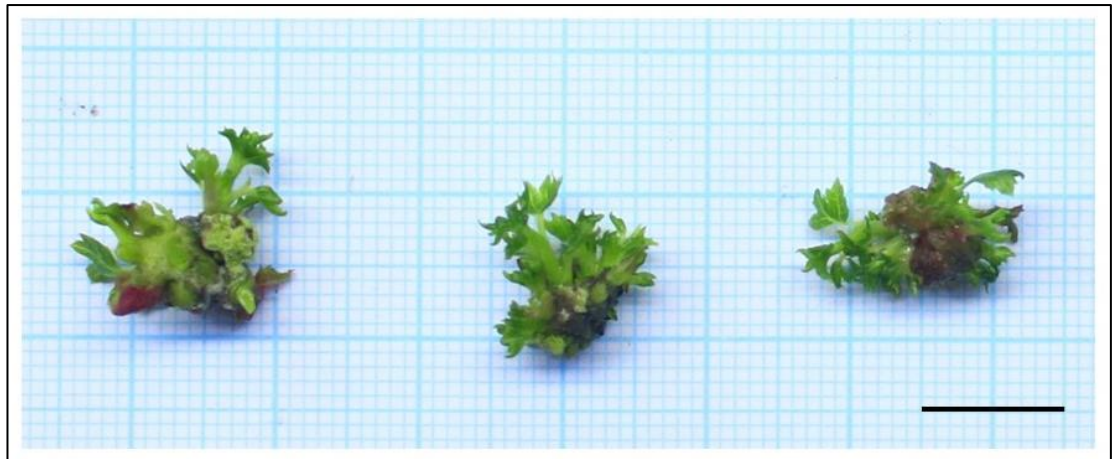


Şekil 3.8. 1mg/l sodyum metaborat içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).

3mg/l sodyum metaborat içeren 1mg/l benzil adenin ile desteklenen WPM besin ortamında gelişen üç farklı klona ait meristemlerden en az 1 en fazla 7 adet meristem başına mikro-sürgün elde edilmiştir ve mikro-sürgün uzunlukları ise 0,2-2,2 cm arasında ölçülmüştür (Çizelge 3.9, Şekil 3.9).

Çizelge 3.9. 3mg/l sodyum metaborat içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri.

Meristem No	KLON 1					KLON 2					KLON 3				
	Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus		Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus		Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus	
				En (cm)	Genişlik (cm)				En (cm)	Genişlik (cm)				En (cm)	Genişlik (cm)
1	1	0,3	0,3	-	-	1	0,2	0,2	0,1	0,1	2	0,3	0,3	0,5	0,4
2	5	0,68	0,8	0,6	0,6	2	0,4	0,5	0,2	0,1	4	0,23	0,3	0,5	0,3
3	1	0,3	0,3	0,1	0,1	1	0,3	0,3	-	-	3	0,3	0,3	0,3	0,3
4	-	0	0	-	-	1	0,4	0,4	0,1	0,2	4	0,3	0,4	0,4	0,4
5	1	0,2	0,2	-	-	3	0,37	0,5	0,3	0,2	6	0,3	0,4	0,8	0,5
6	7	0,7	1,6	1,8	2	3	1,1	2,2	0,4	0,3	1	0,3	0,3	0,1	0,1
7	2	0,35	0,4	0,1	0,1	1	0,5	0,5	-	-	4	0,28	0,4	0,4	0,3
8	2	0,35	0,4	0,2	0,2	-	0	0	-	-	6	0,18	0,3	1,1	0,8
9	4	0,28	0,4	1,6	0,6	-	0	0	-	-	2	0,35	0,4	0,7	0,3
10	-	0	0	-	-	2	0,6	0,8	0,2	0,2	1	0,2	0,2	-	-



Şekil 3.9. 3mg/l sodyum metaborat içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).

5mg/l sodyum metaborat içeren 1mg/l benzil adenin ile desteklenen WPM besin ortamında gelişen üç farklı klona ait meristemlerden en az 1 en fazla 5 adet meristem başına mikro-sürgün elde edilmiştir ve mikro-sürgün uzunlukları ise 0,2-1,8 cm arasında ölçülmüştür (Çizelge 3.10, Şekil 3.10).

Çizelge 3.10. 5mg/l sodyum metaborat içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri.

Meristem No	KLON 1					KLON 2					KLON 3				
	Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus		Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus		Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus	
				En (cm)	Genişlik (cm)				En (cm)	Genişlik (cm)				En (cm)	Genişlik (cm)
1	5	1,04	1,8	0,5	0,4	1	0,2	0,2	-	-	1	0,4	0,4	-	-
2	3	0,23	0,4	0,1	0,2	-	0	0	-	-	1	0,3	0,3	-	-
3	1	0,3	0,3	-	-	1	0,3	0,3	-	-	1	0,2	0,2	-	-
4	1	0,2	0,2	-	-	-	0	0	-	-	1	0,4	0,4	-	-
5	1	0,2	0,2	-	-	1	0,8	0,8	-	-	2	0,35	0,4	-	-
6	1	0,3	0,3	-	-	3	0,5	0,7	0,2	0,2	-	0	0	-	-
7	1	0,3	0,3	-	-	2	0,35	0,4	0,3	0,2	-	0	0	-	-
8	1	0,2	0,2	-	-	3	0,3	0,4	0,2	0,2	-	0	0	-	-
9	2	0,3	0,3	0,1	0,2	2	0,4	0,6	0,2	0,1	1	0,3	0,3	-	-
10	-	0	0	-	-	2	0,3	0,3	0,1	0,1	1	0,4	0,4	-	-



Şekil 3.10. 5mg/l sodyum metaborat içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).

3.1.4. Disodyum Oktaborat Uygulamaları

1mg/l Disodyum Oktaborat içeren 1mg/l benzil adenin ile desteklenen WPM besin ortamında gelişen üç farklı klona ait meristemlerden en az 1 en fazla 5 adet meristem başına mikro-sürgün elde edilmiştir ve mikro-sürgün uzunlukları ise 0,2-2,1 cm arasında ölçülmüştür (Çizelge 3.11, Şekil 3.11).

Çizelge 3.11. 1mg/l Disodyum Oktaborat içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri.

Meristem No	KLON 1					KLON 2					KLON 3				
	Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus		Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus		Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus	
				En (cm)	Genişlik (cm)				En (cm)	Genişlik (cm)				En (cm)	Genişlik (cm)
1	3	1,23	2,1	1,1	0,8	1	0,3	0,3	-	-	2	0,25	0,3	0,4	0,2
2	2	1,85	1,9	1,2	0,6	1	0,1	0,1	-	-	3	0,8	1,8	0,8	0,8
3	3	1,33	2,4	1,4	1,2	1	0,4	0,4	0,2	0,1	3	0,23	0,3	0,6	0,4
4	2	0,2	0,3	0,2	0,1	1	0,1	0,1	-	-	4	0,25	0,3	1,2	0,8
5	1	0,2	0,2	-	-	3	0,23	0,3	0,3	0,2	4	0,25	0,3	0,7	0,7
6	3	0,3	0,4	0,4	0,2	1	0,1	0,1	-	-	5	0,26	0,3	0,8	0,7
7	2	0,35	0,4	0,3	0,3	1	0,2	0,2	-	-	3	0,3	0,3	1,1	0,7
8	2	0,2	0,3	0,2	0,1	1	0,2	0,2	-	-	4	0,25	0,3	0,5	0,3
9	1	0,3	0,3	0,1	0,1	1	0,2	0,2	-	-	4	0,23	0,3	1,0	0,6
10	1	0,3	0,3	0,1	0,1	1	0,3	0,3	0,2	0,2	2	0,35	0,4	0,4	0,4



Şekil 3.11. 1mg/l Disodyum Oktaborat içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).

3mg/l Disodyum Oktaborat içeren 1mg/l benzil adenin ile desteklenen WPM besin ortamında gelişen üç farklı klona ait meristemlerden en az 1 en fazla 6 adet meristem başına mikro-sürgün elde edilmiştir ve mikro-sürgün uzunlukları ise 0,2-3,8 cm arasında ölçülmüştür (Çizelge 3.12, Şekil 3.12).

Çizelge 3.12. 3mg/l Disodyum Oktaborat içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri.

Meri stem No	KLON 1					KLON 2					KLON 3				
	Göv de Uzu nlüğ u Ortal ama	Göv de Uzu nlüğ u Ortal ama	Mak s. Göv de Uzu nlüğ u	Kallus		Göv de Uzu nlüğ u Ortal ama	Göv de Uzu nlüğ u Ortal ama	Mak s. Göv de Uzu nlüğ u	Kallus		Göv de Uzu nlüğ u Ortal ama	Göv de Uzu nlüğ u Ortal ama	Mak s. Göv de Uzu nlüğ u	Kallus	
				En (cm)	Gen işlik (cm)				En (cm)	Gen işlik (cm)				En (cm)	Gen işlik (cm)
1	6	2,0	3,8	2,4	0,8	1	0,3	0,3	0,1	0,1	6	0,18	0,2	1,2	1,2
2	3	1,1	2,4	0,3	0,4	2	0,25	0,3	0,2	0,1	5	0,22	0,3	0,5	0,4
3	6	0,43	0,6	0,3	0,3	2	0,2	0,2	-	-	2	0,15	0,2	0,2	0,2
4	1	0,4	0,4	0,1	0,1	1	0,3	0,3	-	-	1	0,2	0,2	0,1	0,1
5	3	0,4	0,5	0,2	0,1	1	0,2	0,2	-	-	1	0,2	0,2	0,2	0,1
6	1	0,3	0,3	0,2	0,2	-	0	0	-	-	5	0,46	1,3	0,6	1,0
7	1	0,3	0,3	-	-	1	0,3	0,3	0,2	0,1	1	0,2	0,2	0,1	0,1
8	-	0	0	-	-	1	0,1	0,1	-	-	-	0	0	-	-
9	1	0,3	0,3	-	-	1	0,4	0,4	0,2	0,1	5	0,28	0,4	0,4	0,3
10	1	0,4	0,4	0,2	0,1	1	0,1	0,1	-	-	4	0,25	0,4	0,3	0,3



Şekil 3.12. 3mg/l Disodyum Oktaborat içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).

5mg/l Disodyum Oktaborat içeren 1mg/l benzil adenin ile desteklenen WPM besin ortamında gelişen üç farklı klona ait meristemlerden en az 1 en fazla 4 adet meristem başına mikro-sürgün elde edilmiştir ve mikro-sürgün uzunlukları ise 0,1-1,2 cm arasında ölçülmüştür (Çizelge 3.13, Şekil 3.13).

Çizelge 3.13. 5mg/l Disodyum Oktaborat içeren besin ortamında gelişen meristemlerden elde edilen mikro-sürgünlere ait gövde sayısı, gövde boyu ve kallus gelişimleri.

Meristem No	KLON 1					KLON 2					KLON 3				
	Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus		Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus		Gövde Sayısı	Gövde Uzunluğu Ortalama	Maks. Gövde Uzunluğu	Kallus	
				En (cm)	Genişlik (cm)				En (cm)	Genişlik (cm)				En (cm)	Genişlik (cm)
1	1	0,2	0,2	0,1	0,1	2	0,35	0,4	0,1	0,2	3	0,23	0,3	0,2	0,2
2	1	0,1	0,1	-	-	-	0	0	-	-	4	0,18	0,3	0,8	0,6
3	1	0,3	0,3	-	-	3	0,43	0,8	0,3	0,2	1	0,1	0,1	0,1	0,1
4	-	0	0	-	-	1	0,2	0,2	-	-	1	0,4	0,4	0,1	0,1
5	3	0,77	1,2	0,3	0,3	1	0,3	0,3	0,1	0,1	3	0,27	0,3	0,6	0,4
6	2	0,2	0,3	0,1	0,1	1	0,4	0,4	0,1	0,1	1	0,3	0,3	0,2	0,1
7	1	0,2	0,2	-	-	2	0,25	0,3	0,3	0,1	1	0,4	0,4	0,3	0,3
8	1	0,2	0,2	-	-	1	0,3	0,3	-	-	2	0,25	0,3	0,2	0,3
9	1	0,3	0,3	0,1	0,1	1	0,3	0,3	-	-	3	0,17	0,2	0,2	0,2
10	1	0,5	0,5	0,1	0,1	1	0,3	0,3	-	-	2	0,25	0,3	0,3	0,2



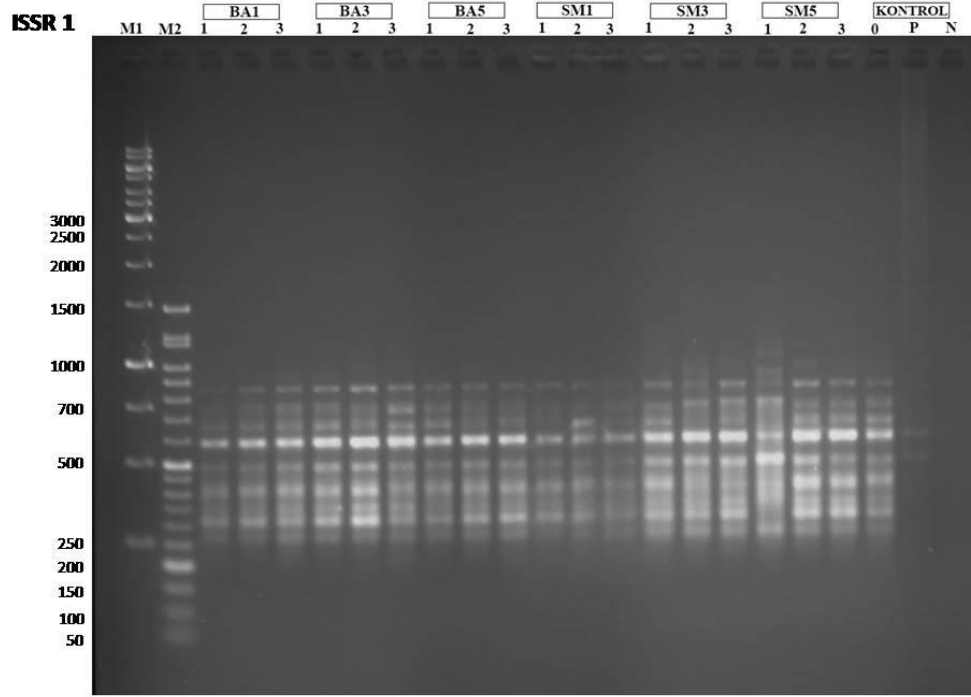
Şekil 3.13. 5mg/l Disodyum Oktaborat içeren besin ortamına transfer edilen meristemlerden gelişen mikrosürgünler (ölçü çizgisi 1cm).

3.2. Moleküler Analizler

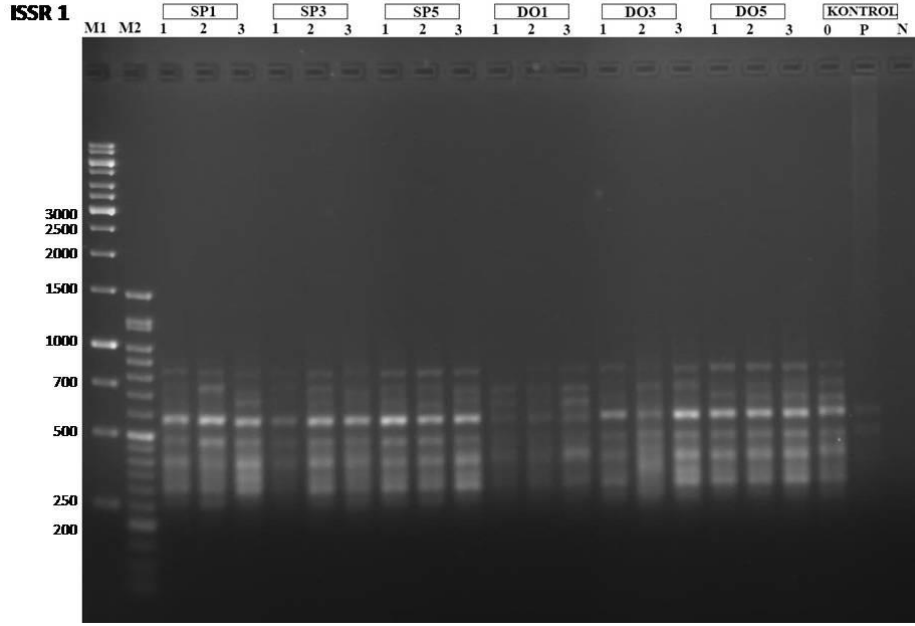
3.2.1. ISSR Primeri Kullanılarak Gerçekleştirilen PCR Sonrasında Elde Edilen Örneklerle Ait Jel Elektroforezi Sonuçları

Anadolu Sığılası (*L. orientalis*) popülasyonunun doğal yayılış alanlarından toplanan tohumlar, başarılı bir yüzey sterilizasyonunun ardından, WPM besin ortamında çimlendirilerek başarılı bir şekilde *in vitro* kültür başlatılmıştır. Tohum çimlenmesinin ardından gelişen mikro-sürgünler 6-8 ay düzenli aralıklarla alt kültürlenerek temel bor tuzu uygulamalarında kullanılabilecek sayıda mikro-sürgün elde edilmiştir. En iyi gelişim gösteren bitkiye ait 3 klon seçilerek, farklı derişimlerde 4 farklı bor tuzu uygulaması yapılmıştır. Meristematik gelişim sonrası, 4 farklı bor tuzu, her bor tuzunun 1, 3 ve 5 mg/l dozları ve hiçbir tuz uygulanmayan kontrol grubuna ait her bir örnekten toplamda 37 DNA örneği izole edilmiştir. Başarılı bir şekilde izole edilen DNA'lar kalıp olarak kullanılarak 10 farklı ISSR primeri ile gerçekleştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) sonrasında en fazla bant profili veren 5 ISSR primeri seçilmiştir. Bu beş primer kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonrası elde edilen ürünler etidyum bromür ile boyandıktan sonra UV transilluminator jel görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. Görüntülenen bant profillerinin 1/0 skorlanması sonucu elde edilen veriler analiz edilmiştir.

ISSR1 primeri ile yapılan PCR sonucu kontrol grubu (0) ile kıyaslanan örneklerde ~275-1200 bp uzunluklarına sahip toplam 11 bant profili elde edilmiştir (Şekil 3.14, Şekil 3.15). Hiç uygulama içermeyen besin ortamlarında büyütülen (kontrol 0) örneklerle kıyaslandığında elde edilen polimorfik bant profillerine göre, %0 oranıyla 3 mg/l Borik Asit (BA), 1 mg/l Sodyum Perborat (SP) ve 5mg/l/1 Disodyum Oktaborat (DO) uygulanan örneklerde en düşük, %18,18 oranıyla 1 mg/l/1 Sodyum Metaborat (SM), 5 mg/l Sodyum Metaborat (SM) ve 3 mg/l Disodyum Oktaborat (DO) uygulanan örneklerde en yüksek polimorfizm belirlenmiştir (Çizelge 3.14, Çizelge 3.15, Çizelge 3.16).



Şekil 3.14. ISSR 1 primeri kullanılarak 3 farklı derişimde borik asit ve sodyum metaborat uygulaması sonrası örneklerden izole edilen DNA ile gerçekleştirilen PCR sonuçlarının jel görüntüsü. M1: 1kb belirteç, M2: 100bp belirteç; BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.



Şekil 3.15. ISSR 1 primeri kullanılarak 3 farklı derişimde sodyum perborat ve disodyum oktaborat uygulaması sonrası örneklerden izole edilen DNA ile gerçekleştirilen PCR sonuçlarının jel görüntüsü. M1: 1kb belirteç, M2: 100bp belirteç; SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.

Çizelge 3.14. ISSR 1 primeri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin bant profillerinin 1/0 skor tablosu. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.

ISSR1	BA1			BA3			BA5			SM1			SM3			SM5			KONTROL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	0	P	N
1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
820	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
575	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
540	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
450	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
350	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0
325	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
275	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0

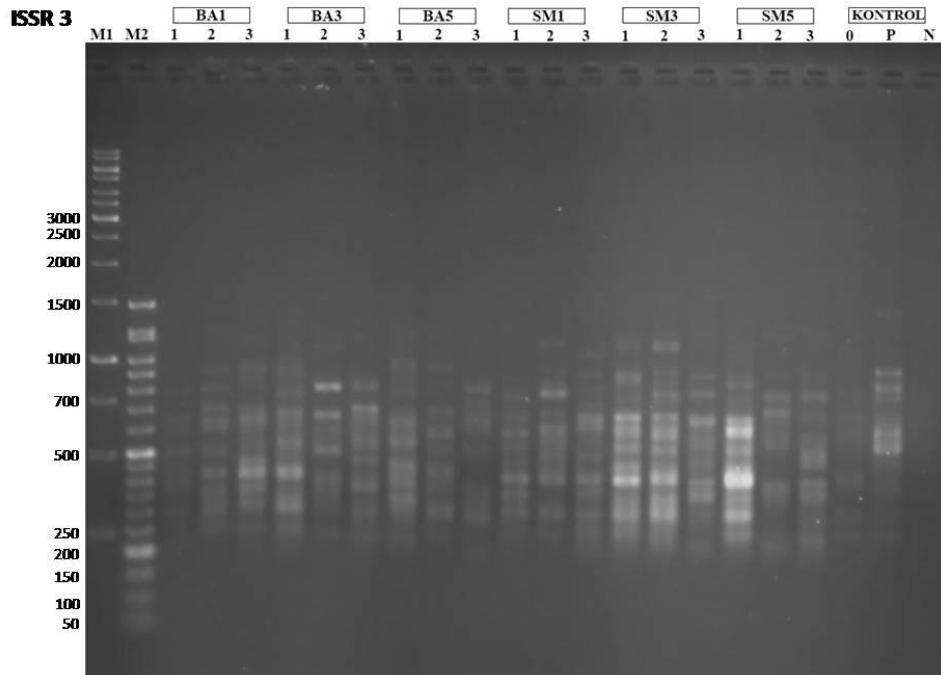
Çizelge 3.15. ISSR 1 primeri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin bant profillerinin 1/0 skor tablosu. SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.

ISSR1	SP1			SP3			SP5			DO1			DO3			DO5			KONTROL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	0	P	N
1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
820	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
575	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
540	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
450	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
325	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
275	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

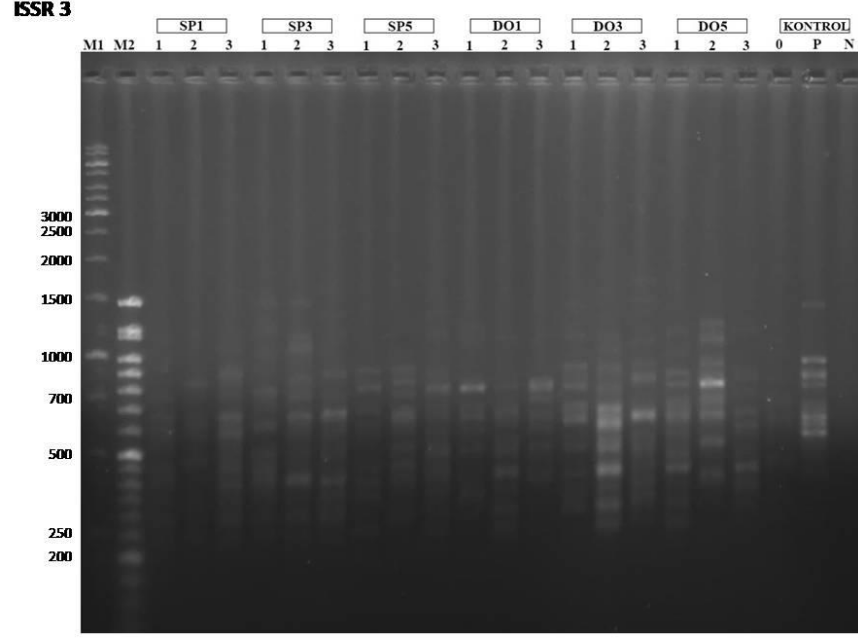
Çizelge 3.16. ISSR 1 primeri kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyon ürünlerinin jel görüntüsüne bağlı 1/0 skor değerlendirmesi sonucu kontrol grubu ile kıyaslanan bant profillerinden elde edilen polimorfizm değerleri. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l).

ISSR1			
	POLİMORFİK	MONOFORMİK	POLİMORFİZM (%)
BA1	1	10	9,09
BA3	0	11	0,00
BA5	1	10	9,09
SM1	2	9	18,18
SM3	1	10	9,09
SM5	2	9	18,18
SP1	0	11	0,00
SP3	1	10	9,09
SP5	1	10	9,09
DO1	1	10	9,09
DO3	2	9	18,18
DO5	0	11	0,00

ISSR3 primeri ile yapılan PCR sonucu kontrol grubu (0) ile kıyaslanan örneklerde ~200-1450 bp uzunluklarına sahip toplam 15 bant profili elde edilmiştir (Şekil 3.16, Şekil 3.17). Hiç uygulama içermeyen besin ortamlarında büyütülen (kontrol 0) örneklerle kıyaslandığında elde edilen polimorfik bant profillerine göre, %20 oranıyla 5mg/l Disodyum Oktaborat (DO) uygulanan örneklerde en düşük, %66,67 oranıyla 1 mg/l Borik Asit (BA) ve 3 mg/l Sodyum Metaborat (SM) uygulanan örneklerde en yüksek polimorfizm belirlenmiştir (Çizelge 3.17, Çizelge 3.18, Çizelge 3.19).



Şekil 3.16. ISSR 3 primeri kullanılarak 3 farklı derişimde borik asit ve sodyum metaborat uygulaması sonrası örneklerden izole edilen DNA ile gerçekleştirilen PCR sonuçlarının jel görüntüsü. M1: 1kb belirteç, M2: 100bp belirteç; BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.



Şekil 3.17. ISSR 3 primeri kullanılarak 3 farklı derişimde sodyum perborat ve disodyum oktaborat uygulaması sonrası örneklerden izole edilen DNA ile gerçekleştirilen PCR sonuçlarının jel görüntüsü. M1: 1kb belirteç, M2: 100bp belirteç; SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.

Çizelge 3.17. ISSR 3 primeri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin bant profillerinin 1/0 skor tablosu. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.

ISSR3	BA1			BA3			BA5			SM1			SM3			SM5			KONTROL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	0	P	N
1450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1000	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
900	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
850	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
800	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
770	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0
700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
600	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
520	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
450	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
350	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0

Çizelge 3.18. ISSR 3 primeri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin bant profillerinin 1/0 skor tablosu. SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.

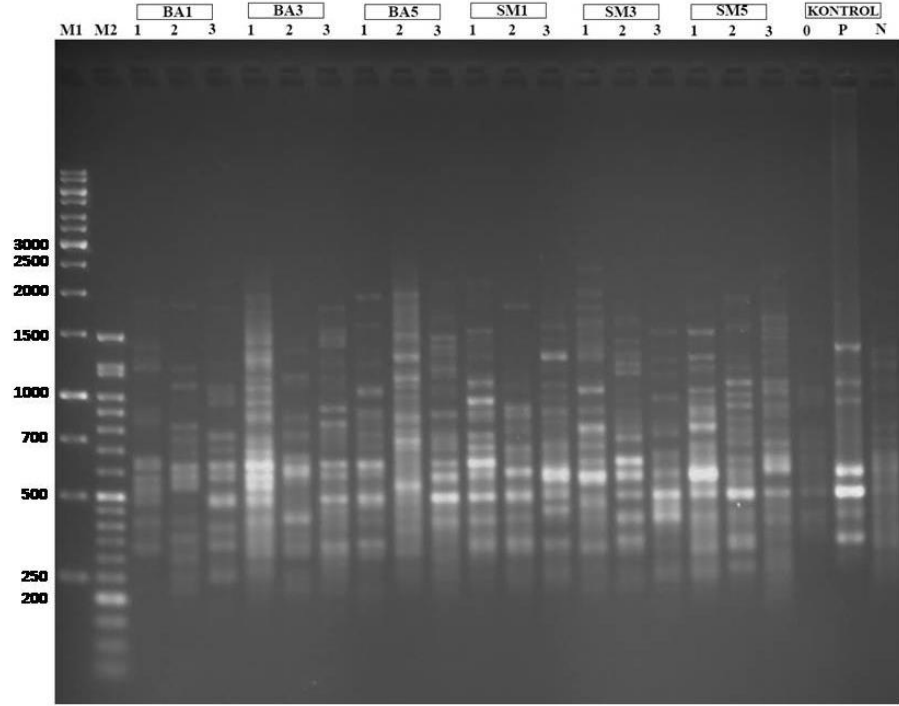
ISSR3	SP1			SP3			SP5			DO1			DO3			DO5			KONTROL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	0	P	N
1450	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
1200	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1000	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
850	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
800	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
770	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
700	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
520	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
450	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
400	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 3.19. ISSR 3 primeri kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyon ürünlerinin jel görüntüsüne bağlı 1/0 skor değerlendirmesi sonucu kontrol grubu ile kıyaslanan bant profillerinden elde edilen polimorfizm değerleri. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l).

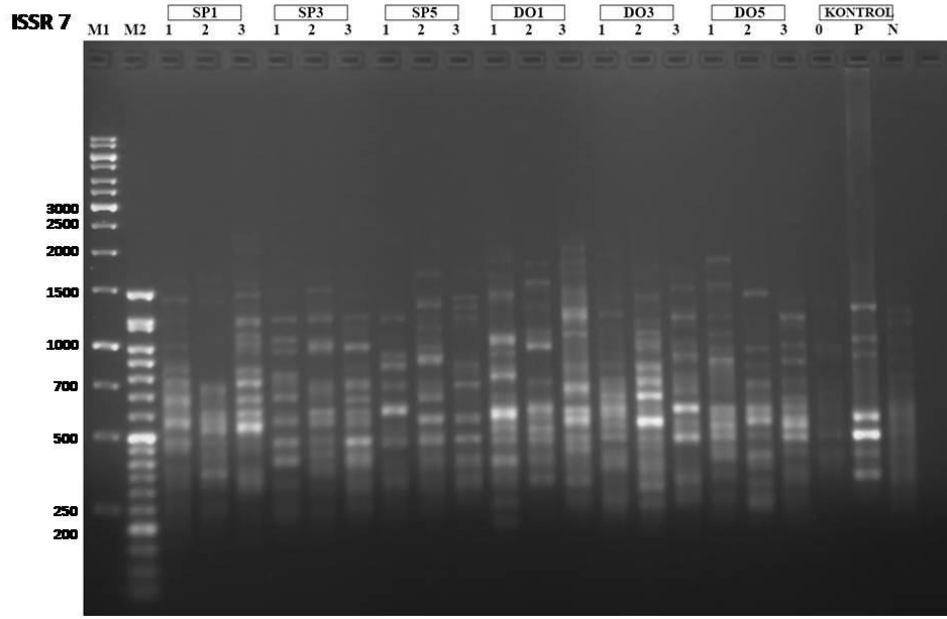
ISSR3			
	POLİMORFİK	MONOFORMİK	POLİMORFİZM (%)
BA1	10	5	66,67
BA3	8	7	53,33
BA5	6	9	40,00
SM1	9	6	60,00
SM3	10	5	66,67
SM5	7	8	46,67
SP1	6	9	40,00
SP3	9	6	60,00
SP5	5	10	33,33
DO1	6	9	40,00
DO3	5	10	33,33
DO5	3	12	20,00

ISSR7 primeri ile yapılan PCR sonucu kontrol grubu (0) ile kıyaslanan örneklerde ~350-2750 bp uzunluklarına sahip toplam 20 bant profili elde edilmiştir (Şekil 3.18, Şekil 3.19). Hiç uygulama içermeyen besin ortamlarında büyütülen (kontrol 0) örneklerle kıyaslandığında elde edilen polimorfik bant profillerine göre, %15 oranıyla 5mg/l/1 Disodyum Oktaborat (DO) uygulanan örneklerde en düşük, %55 oranıyla 1 mg/l/1 Borik Asit (BA) uygulanan örneklerde en yüksek polimorfizm belirlenmiştir (Çizelge 3.20, Çizelge 3.21, Çizelge 3.22).

ISSR 7



Şekil 3.18. ISSR 7 primeri kullanılarak 3 farklı derişimde borik asit ve sodyum metaborat uygulaması sonrası örneklerden izole edilen DNA ile gerçekleştirilen PCR sonuçlarının jel görüntüsü. M1: 1kb belirteç, M2: 100bp belirteç; BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.



Şekil 3.19. ISSR 7 primeri kullanılarak 3 farklı derişimde sodyum perborat ve disodyum oktaborat uygulaması sonrası örneklerden izole edilen DNA ile gerçekleştirilen PCR sonuçlarının jel görüntüsü. M1: 1kb belirteç, M2: 100bp belirteç; SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.

Çizelge 3.20. ISSR 7 primeri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin bant profillerinin 1/0 skor tablosu. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.

ISSR 7	BA1			BA3			BA5			SM1			SM3			SM5			KONTROL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	0	P	N
2750	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
2500	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
2400	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
2300	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1
2000	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1
1900	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
1500	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
1210	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
1200	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
1000	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1
800	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1
790	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1
750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
700	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
450	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
400	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
350	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0

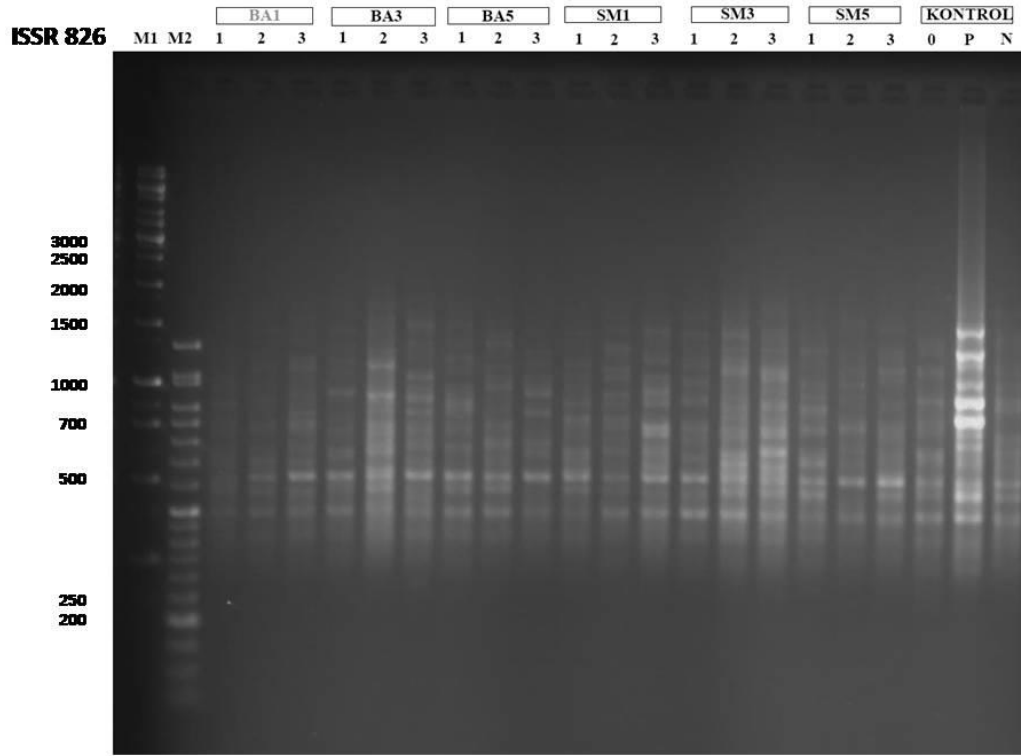
Çizelge 3.21. ISSR 7 primeri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin bant profillerinin 1/0 skor tablosu. SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.

ISSR 7	SP1			SP3			SP5			DO1			DO3			DO5			KONTROL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	0	P	N
2750	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2500	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2400	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2300	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2000	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1900	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
1500	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1210	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
1200	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
1000	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
900	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1
800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
790	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
600	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
500	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
450	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

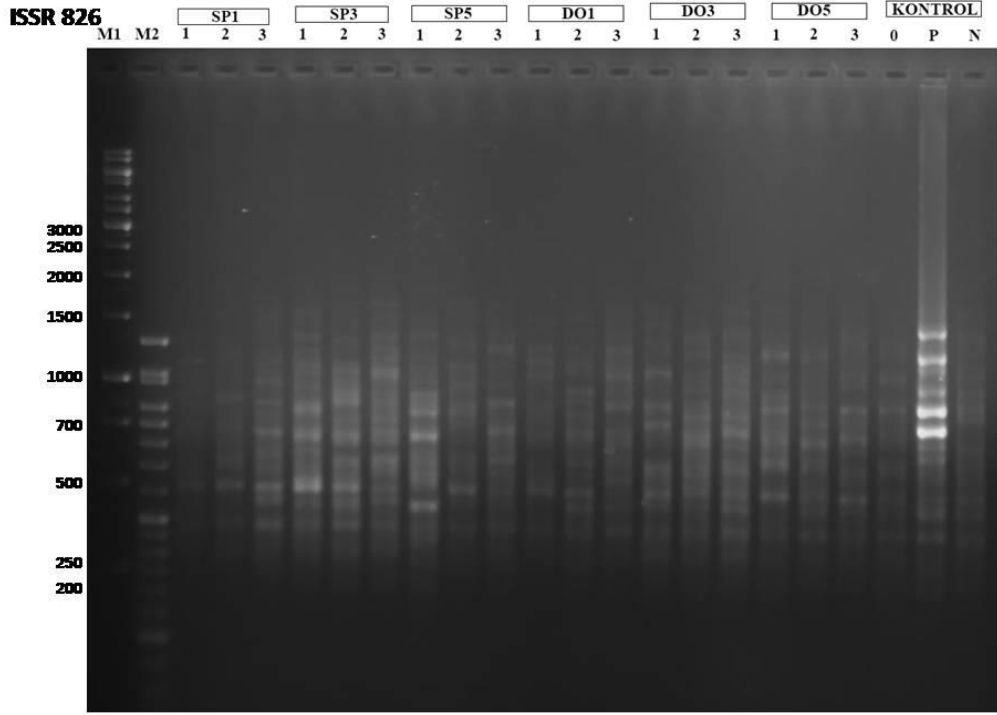
Çizelge 3.22. ISSR 7 primeri kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyon ürünlerinin jel görüntüsüne bağlı 1/0 skor değerlendirmesi sonucu kontrol grubu ile kıyaslanan bant profillerinden elde edilen polimorfizm değerleri. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l);SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l).

ISSR7			
	POLİMORFİK	MONOFORMİK	POLİMORFİZM (%)
BA1	11	9	55,00
BA3	8	12	40,00
BA5	7	13	35,00
SM1	7	13	35,00
SM3	8	12	40,00
SM5	9	11	45,00
SP1	5	15	25,00
SP3	4	16	20,00
SP5	8	12	40,00
DO1	9	11	45,00
DO3	6	14	30,00
DO5	3	17	15,00

ISSR 826 primeri ile yapılan PCR sonucu kontrol grubu (0) ile kıyaslanan örneklerde ~300-2500 bp uzunluklarına sahip toplam 20 bant profili elde edilmiştir (Şekil 3.20, Şekil 3.21). Hiç uygulama içermeyen besin ortamlarında büyütülen (kontrol 0) örneklerle kıyaslandığında elde edilen polimorfik bant profillerine göre, %40 oranıyla 5mg/l/1 SodyumMetaborat (SM) uygulanan örneklerde en düşük, %60 oranıyla 1 mg/l/1 ve 3 mg/l/1Disodyum Oktaborat (DO) uygulanan örneklerde en yüksek polimorfizm belirlenmiştir (Çizelge 3.23, Çizelge 3.24, Çizelge 3.25).



Şekil 3.20. ISSR 826 primeri kullanılarak 3 farklı derişimde borik asit ve sodyum metaborat uygulaması sonrası örneklerden izole edilen DNA ile gerçekleştirilen PCR sonuçlarının jel görüntüsü. M1: 1kb belirteç, M2: 100bp belirteç; BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.



Şekil 3.21. ISSR 826 primeri kullanılarak 3 farklı derişimde sodyum perborat ve disodyum oktaborat uygulaması sonrası örneklerden izole edilen DNA ile gerçekleştirilen PCR sonuçlarının jel görüntüsü. M1: 1kb belirteç, M2: 100bp belirteç; SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.

Çizelge 3.23. ISSR 826 primeri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin bant profillerinin 1/0 skor tablosu. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.

ISSR 826	BA1			BA3			BA5			SM1			SM3			SM5			KONTROL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	0	P	N
2500	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
2250	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
2000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1500	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
1490	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1450	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
1150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
1050	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
875	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
680	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
590	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
300	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

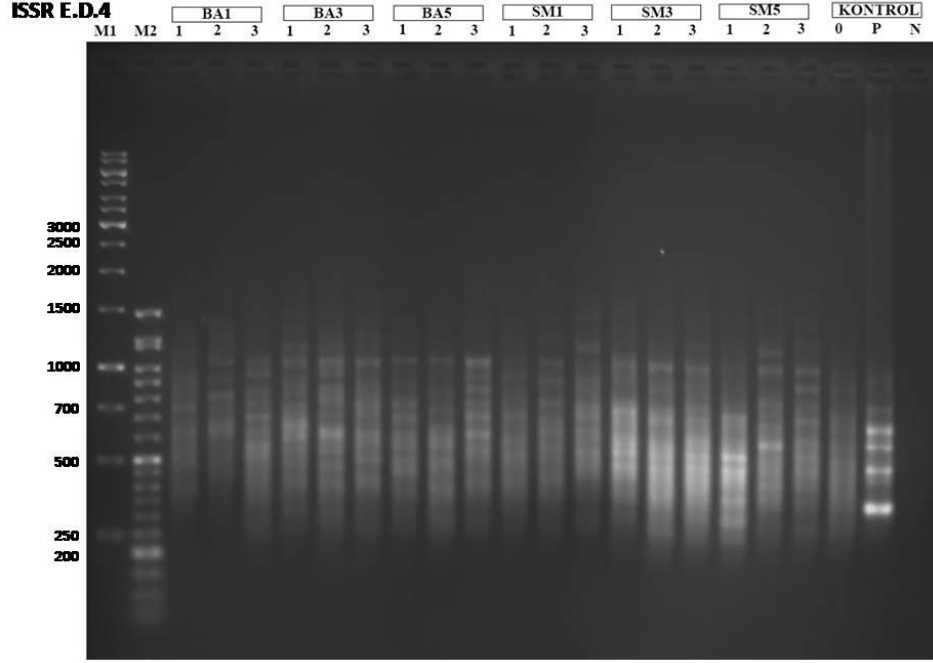
Çizelge 3.24. ISSR 826 primeri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin bant profillerinin 1/0 skor tablosu. SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.

ISSR 826	SP1			SP3			SP5			DO1			DO3			DO5			KONTROL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	0	P	N
2500	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
2250	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
2000	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
1500	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1490	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
1450	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
1200	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
1150	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
1050	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1
1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
900	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
875	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
680	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
590	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
400	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
350	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
300	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

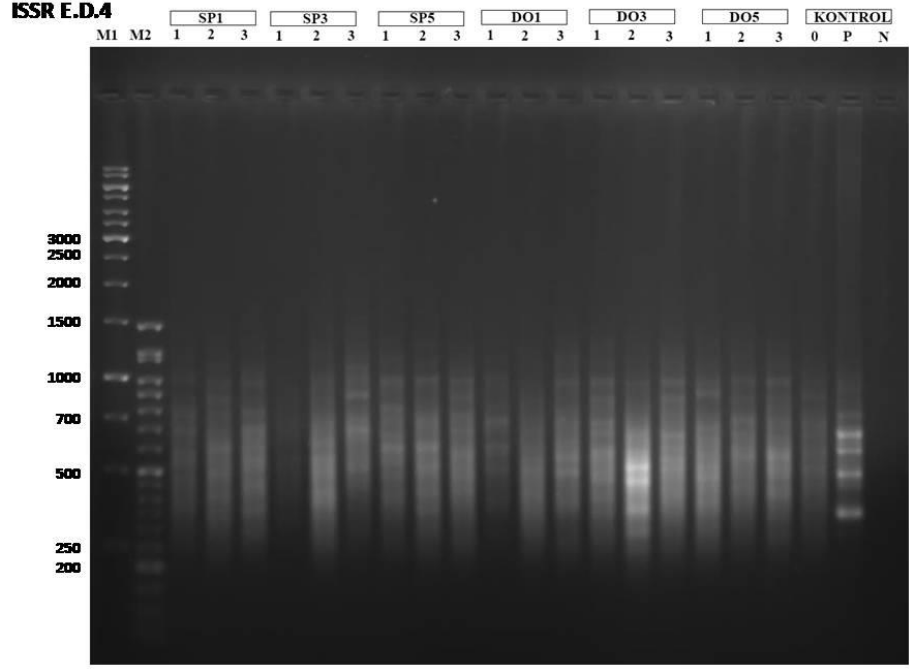
Çizelge 3.25. ISSR 826 primeri kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyon ürünlerinin jel görüntüsüne bağlı 1/0 skor değerlendirmesi sonucu kontrol grubu ile kıyaslanan bant profillerinden elde edilen polimorfizm değerleri. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l).

	POLİMORFİK	MONOFORMİK	POLİMORFİZM (%)
BA1	10	10	50,00
BA3	11	9	55,00
BA5	9	11	45,00
SM1	9	11	45,00
SM3	10	10	50,00
SM5	8	12	40,00
SP1	11	9	55,00
SP3	11	9	55,00
SP5	10	10	50,00
DO1	12	8	60,00
DO3	12	8	60,00
DO5	11	9	55,00

ISSR E.D.4 primeri ile yapılan PCR sonucu kontrol grubu (0) ile kıyaslanan örneklerde ~250-1750 bp uzunluklarına sahip toplam 25 bant profili elde edilmiştir (Şekil 3.22, Şekil 3.23). Hiç uygulama içermeyen besin ortamlarında büyütülen (kontrol 0) örneklerle kıyaslandığında elde edilen polimorfik bant profillerine göre, %32 oranıyla 1mg/l Disodyum Oktaborat (DO) uygulanan örneklerde en düşük, %52 oranıyla 1 mg/l Borik Asit (BA) uygulanan örneklerde en yüksek polimorfizm belirlenmiştir (Çizelge 3.26, Çizelge 3.27, Çizelge 3.28).



Şekil 3.22. ISSR E.D.4 primeri kullanılarak 3 farklı derişimde borik asit ve sodyum metaborat uygulaması sonrası örneklerden izole edilen DNA ile gerçekleştirilen PCR sonuçlarının jel görüntüsü. M1: 1kb belirteç, M2: 100bp belirteç; BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.



Şekil 3.23. ISSR E.D.4 primeri kullanılarak 3 farklı derişimde sodyum perborat ve disodyum oktaborat uygulaması sonrası örneklerden izole edilen DNA ile gerçekleştirilen PCR sonuçlarının jel görüntüsü. M1: 1kb belirteç, M2: 100bp belirteç; SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.

Çizelge 3.26. ISSR E.D.4 primeri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin bant profillerinin 1/0 skor tablosu. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.

ISSR E.D.4	BA1			BA3			BA5			SM1			SM3			SM5			KONTROL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	0	P	N
1750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
1350	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1300	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
1190	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
1050	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
920	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
850	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
810	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
715	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
430	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 3.27. ISSR E.D.4 primeri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin bant profillerinin 1/0 skor tablosu. SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l); Kontrol 0: Hiç uygulama yapılmayan kontrol; Kontrol P: farklı bitkiye ait pozitif kontrol; Kontrol N: DNA kalıp içermeyen negatif kontrol.

ISSR E.D.4	SP1			SP3			SP5			DO1			DO3			DO5			KONTROL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	0	P	N
1750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
1350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
1300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
1190	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
1050	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1000	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
950	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0
920	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
850	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
810	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
715	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
600	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
500	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
430	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 3.28. ISSR E.D.4 primeri kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyon ürünlerinin jel görüntüsüne bağlı 1/0 skor değerlendirmesi sonucu kontrol grubu ile kıyaslanan bant profillerinden elde edilen polimorfizm değerleri. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l);SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l).

ISSR E.D.4			
	POLİMORFİK	MONOFORMİK	POLİMORFİZM (%)
BA1	13	12	52,00
BA3	12	13	48,00
BA5	12	13	48,00
SM1	12	13	48,00
SM3	12	13	48,00
SM5	10	15	40,00
SP1	11	14	44,00
SP3	10	15	40,00
SP5	10	15	40,00
DO1	8	17	32,00
DO3	9	16	36,00
DO5	11	14	44,00

Çizelge 3.29. ISSR1, ISSR3, ISSR7, ISSR826, ISSRE.D.4 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyon ürünlerinin jel görüntüsüne bağlı 1/0 skor değerlendirmesi sonucu kontrol grubu ile kıyaslanan tüm bant profillerinden elde edilen polimorfizm değerleri. BA borik asit (BA1: 1mg/l; BA3: 3mg/l; BA5: 5mg/l); SM: sodyum metaborat (SM1: 1mg/l; SM3: 3mg/l; SM5: 5mg/l); SP: sodyum perborat (SP1: 1mg/l; SP3: 3mg/l; SP5: 5mg/l); DO: disodyum oktaborat (DO1: 1mg/l; DO3: 3mg/l; DO5: 5mg/l).

	MONOMORFİK	POLİMORFİK	POLİMORFİZM (%)
BORİK ASİT (mg/l)	46	45	49,45
	52	39	42,86
	56	35	38,46
SODYUM METABORAT (mg/l)	52	39	42,86
	55	36	39,56
	55	36	39,56
SODYUM PERBORAT (mg/l)	58	33	36,26
	56	35	38,46
	57	34	37,36
DİSODYUM OKTABORAT (mg/l)	55	36	39,56
	57	34	37,36
	63	28	30,77

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

4.1. Bor tuzlarının *L. orientalis* mikro-sürgün gelişimi üzerinde etkileri

Odunsu bitkilerin mikroçoğaltımı, rejenerasyon ve kültürlerin yaşlanması sürecindeki genotipik çeşitlilik nedeniyle genellikle sorunludur. Sürgün kültürleri, ekonomik açıdan önemli odunsu bitkilerin mikroçoğaltımında yaygın olarak kullanılan yöntemdir (Skirvin, 1986) ve kültür başlangıcı için sitokin ve/veya optimize edilen oranlarda sitokin ve oksin büyüme düzenleyicileri kullanılmaktadır. Köklenme için bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen veya oksin benzeri bitki büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamları (George, 1993) ve genellikle odunsu bitkilerin köklerini uyarmak için ise indol bütirik asit (IBA) kullanılmaktadır (Kataeva ve Butenko, 1987). Odunsu türlerin *in vitro* organogenez, yüksek ticari değere sahip fidanlar sağlayarak orman ürünlerinin iyileştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, mineral beslenme, organojenik tepkilerin indüklenmesinde önemli bir rol oynarlar. Mevcut tez çalışmasında *in vitro* koşullarda büyüyen *L. orientalis* mikro-sürgünlerinden alınan meristemlerin organogenezinde farklı bor tuzlarının etkileri değerlendirilmiştir. Kültür ortamlarına ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki farklı bor tuzları, *L. orientalis*'in *in vitro* organojenik kontrolünü farklı şekillerde etkilemiştir. Eksplantlarda bor kaynaklı kallus oluşumu ile mikro-sürgünlerin rejenerasyonu için kullanılabilen iyi gelişmiş tomurcukların indüklenmesine izin vermiştir. Benzer şekilde, Brondani vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, *Eucalyptus grandis* fidelerinden alınan nodal segmentlerin organogenezinde bor ve kalsiyumun etkilerini değerlendirilmiştir. MS (Murashige and Skoog, 1962) ortamındaki bor ve kalsiyum konsantrasyonu, eksplant olarak kullanılan 45 günlük *E. grandis* nodal segmentlerinde organojenik tepkileri indüklemek için değiştirilmiş ve 60 gün sonra, eksplantlar tarafından biriken taze ağırlık, kuru ağırlık, taze ve kuru ağırlık oranı, nispi su içeriği ve nispi madde içeriği değerlendirilmiştir. Kültür ortamındaki bor ve kalsiyum konsantrasyonları, *E. grandis*'in *in vitro* organojenik kontrolünü etkilediği görülmüştür.

Bitki hücre duvarlarının üstyapısının ve fiziksel özelliklerinin bor eksikliğinden etkilendiği bilinmektedir (Findelee ve Goldbach, 1996). Ayrıca, bitkiler yetersiz bor ile büyütüldüğünde, bor ağırlıklı olarak hücre duvarında lokalize olmaktadır (Hu vd, 1996). Bor, bitkiler tarafından yüksek miktarlarda ihtiyaç duyulmaz, ancak uygun seviyelerde sağlanmadığı takdirde ciddi büyüme sorunlarına neden olabilir. Bor,

eksikliğine bağlı kloroz olmaması bakımından diğer mikro elementlerden farklıdır; ancak diğer mikro besinlerle benzer toksisite semptomlarına sahiptir. Bor, kalsiyum ile birlikte hücre duvarı sentezinde kullanılır ve hücre bölünmesi (yeni bitki hücrelerinin oluşturulması) için gereklidir. Diğer işlevler arasında şekerlerin ve karbonhidratların yer değiştirmesi, nitrojen metabolizması, belirli proteinlerin oluşumu, hormon seviyelerinin düzenlenmesi ve potasyumun stomaya taşınması (iç su dengesinin düzenlenmesine yardımcı olur) bulunur (Pan vd., 2008; Teng ve Zhang, 2009; Liang vd., 2011). Çalışmamızda üç farklı konsantrasyonda dört farklı bor tuzu (borik asit, sodyum perborat, sodyum metaborat ve disodyum oktaborat) bor mikroelement kaynağı olarak kullanılmış olup, kontrol grubu ile kıyaslandığında 3mg/l borik asit (Çizelge 3.3) ve 5mg/l sodyum perborat (Çizelge 3.7) uygulamalarında oluşan gövde sayılarında bir artış görülürken, 5mg/l disodyum oktaborat (Çizelge 3.13) uygulamasının da gövde uzaması üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Bitkilerdeki borik asit seviyeleri düşük olduğunda, bitkiler borik asit ve borat tuzlarını aktif taşıma yoluyla ayrışmamış borik asit olarak alırlar. Pasif difüzyon, daha yüksek toprak konsantrasyonlarında meydana gelir. Bor ve tuzları yapraklara taşınır ve burada su buharlaşır ve bileşikler yapraklarda birikerek geride kalır. Borik asit ve tuzları, bitkilerin floeminde hareketsizdir ve gövde ve meyve gibi diğer kısımlara çok az hareket eder (Lank ve Wahl, 2014). Bor, optimum büyüme için gerekli seviyelerde türler arası farklılıklar ile yüksek bitkiler için gerekli bir mikro besindir. Bor, karbonhidrat metabolizmasında, şeker translokasyonunda, polen çimlenmesinde, hormon etkisinde, apikal meristemin normal büyümesinde ve işleyişinde, nükleik asit sentezinde ve membran yapısı ve işlevinde rol oynar (Lovatt ve Dugger, 1984). Bor üzerinde yapılmış olan çalışmalar, spesifik pektin bileşenleri ile kompleksleşmeyi içeren hücre duvarı çapraz bağlanmasında borun önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Loomis ve Durst, 1992; Hu vd., 1996).

Borik asit ve boraksın bakla (*Vicia faba*) ve diğer bitkiler üzerindeki etkilerinin araştırılması, borunun bitki beslenmesindeki rolünü göstermiştir (Warrington, 1923). Borun bitki büyümesi üzerindeki etkilerine ilişkin ilk kapsamlı çalışma Eaton (1944) tarafından yapılmıştır. Elli bitki türü, aşağıdaki bor konsantrasyonlarını içeren standart besin çözeltileri ile kum kültürlerinde yetiştirilmiştir: eser miktar (0.03-0.04), 1, 5, 10, 15 veya 75 mg/litre. Her tür için, en iyi büyüme ile sonuçlanan bor konsantrasyonunu, yaralanma ile sonuçlanan en düşük konsantrasyonu ve eser bor seviyeleri ile eksiklik

semptomlarını kaydetmiştir. Bitkilerin yaklaşık %82'si eserden 5 mg/litreye kadar olan konsantrasyonlarda en iyi büyümeyi sergilemiş ve eser bor seviyelerinde yetiştirilen bitkilerin %35'i morfolojik eksiklik belirtileri geliştirdiği görülmüştür. Eaton (1944), borun türler arasında yararlı ve zararlı etkilerinin örtüştüğü sonucuna varmıştır; bu nedenle, üç geniş tolerans kategorisi (hassas, yarı toleranslı ve hoşgörülü) oluşturulmuştur. Toleranslı bitkiler, çok az etki ile çok çeşitli bor konsantrasyonlarına dayanır ve hassas bitkiler, çok fazla veya çok az bora güçlü bir reaksiyon gösterir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar ışığında *L. orientalis* için yarı toleranslı kategoride olduğu söylenebilir.

4.2. Bor tuzu uygulama sonrası *L. orientalis* mikro-sürgünlerinde genetik kararlılık

in vitro kültürlerde, ortam koşulları, altkültür periyodunun uzaması, kültür yaşı, besin ortamı bileşenleri gibi sebeplerden kaynaklanan fenotipik ve genetik varyasyonların meydana geldiği bildirilmektedir (Larkin ve Scowcroft 1981). Hedef, seçilen genotiplerin çoğaltılması veya germplazm korunması olduğunda, doku kültürü süreçleri tarafından indüklenen genetik değişikliklerin olasılığı özel olarak dikkate alınmayı gerektirir. Bu nedenle, hem relik endemik bir tür olması hem de tıbbi aromatik özelliklerinden dolayı *L. orientalis*'e ait birincil rejenerantların genetik stabilitesinin değerlendirilmesi özellikle önemlidir. DNA seviyesinde modifikasyonları tespit edebilen moleküler markörler, *in vitro* çoğaltılmış bitkilerin ana materyal ile genetik uygunluğuna erişmek için giderek daha fazla kullanılmaktadır.

ISSR analizi, polimeraz zincir reaksiyonunu (PCR) başlatmak ve böylece bitişik, ancak ters yönlendirilmiş mikrosatellit bölgeler arasındaki dizileri çoğaltmak için tek basit dizi tekrarı (SSR) motiflerinin kullanımını içerir (Zietkiewicz vd., 1994). ISSR belirteçleri karnabahar (Leroy ve ark., 2000), badem (Martins vd., 2004), muz (Venkatachalam vd., 2007) ve *Swertia chirayita* (Joshi ve Dhawan, 2007) hatlarında genetik kararlılığın analizinde başarıyla uygulanmıştır. Ayrıca, ISSR belirteçleri özellikle somaklonal varyasyonun belirlenmesinde, yüksek derecede hassasiyet, tekrarlanabilirlik ve polimorfik genetik alellerin baskın temsilde başka avantajlar

sunar. Mevcut tez çalışmasında farklı konsantrasyonlarda farklı bor tuzu uygulanan in vitro çoğaltılmış *L. orientalis* mikrosürgünlerinde genetik kararlılığı değerlendirmek için ISSR belirteçleri kullanılmıştır ve mevcut çalışma in vitro mikro-sürgünlerde farklı derişimlerde bor tuzu uygulama sonucu genetik kararlılığın belirlenmesine yönelik ilk rapordur.

Farklı minerallerin toprakta birikimi nedeniyle oluşan tuz stresi, dünya çapında mahsul üretimini engelleyen başlıca biyotik stresler arasındadır (Golldack ve ark., 2014) ve tuz stresinden etkilenen toplam alanın ~80 mha olduğu tahmin edilmektedir (El-Beltagi ve ark., 2017). Tuzluluk, fizyolojik ve metabolik değişikliklerden moleküler bozulmaya kadar uzanan birçok farklı şekilde genel bitki fizyolojisi üzerinde şiddetli etkilere sahiptir (Wang vd., 2007; Flowers ve Colmer, 2015). *L. orientalis* ağaçları, çeşitli olumsuz çevresel streslere karşı orta derece toleransa sahip iken, tuzluluk ve kuraklığa karşı toleransı düşük olabilmektedir. *L. orientalis* (sığla), sulak ve ılıman bölgelerde yetişen ekonomik öneme sahip tıbbi aromatik bir bitkidir. Sığla geleneksel yöntemlerle sınırlı sayıda sürgün üretirken, in vitro doku kültürleri kitlesel olarak fide üretimi için mükemmel bir uygulamadır fakat bu ve benzeri tıbbi aromatik özellik gösteren bitkilerin in vitro çoğaltılan mikro-sürgünlerde genetik bütünlüğünü korumak oldukça önemlidir. Bu nedenle, mevcut tez çalışması sığlada genetik olarak kararlı kitlesel çoğaltım gerçekleştirebilmek ve ticari ölçekte genetik olarak stabil bitkilerin üretimi için bitkinin in vitro çoğaltımı üzerinde çeşitli bor tuzlarının etkilerini incelemeyi amaçlamıştır. Eksplant kaynağı olarak meristem dokuları kullanılan sığla bitkilerinin in vitro rejenerasyonu sonrası sürgünlerinden izole edilen DNA'lar kullanılarak gerçekleştirilen ISSR PCR rekaksiyon analizlerinde, 5mg/l disodyum oktaborat uygulama sonrası en düşük (%30,77), 1 mg/l borik asit uygulama sonrası ise en yüksek (%49,45) oranlarda polimorfizm belirlenmiştir. Bitkilerin doku kültürü yoluyla üretilmesi, büyük olasılıkla in vitro çoğaltma sırasında uygulanan stresler nedeniyle, rejenere edilmiş bitkiler arasında genellikle somaklonal varyasyonlara uğrar (Matthes ve ark., 2001). Bu varyasyonlar, metillenmiş DNA, kromozomal yeniden düzenlemeler ve çoğu durumda nokta mutasyonlarını içerir (Afify vd., 2012; Krishna vd., 2016). Somaklonlardaki değişkenlik, çoğunlukla eksplantların kültürlenmesi sırasındaki genetik ve/veya epigenetik varyasyonlardan kaynaklanmaktadır (Bhojwani ve Dantu, 2013).

Somaklonal veya kültür kaynaklı varyasyon, uzun zamandır in vitro kültürlenmiş bitkilerde faydalı veya istenmeyen etkilerin kaynağı olarak kabul edilmektedir. Bu istenmeyen etkilerden bazıları, morfolojik özellikler, çevresel stres toleransı, sekonder metabolitlerin üretimi ve bitki yetiştiricisinin ilgisini çeken diğer önemli özellikleri içerir (Veilleux ve Johnson, 1998). Literatürde kuruma, yaralanma, uygun olmayan besin kaynağı ve ozmotik stres gibi somaklonal varyasyondan potansiyel olarak sorumlu birçok faktör tanımlanmıştır (Filipecki ve Malepszy, 2006). In vitro koşullar sırasında, eksplantlar bu stres koşullarına maruz kalırlar, bu da sonuçta elde edilen rejenere bitkilerde hem genetik hem de epigenetik değişiklikler getirir (Evans ve Sharp, 1988). Genetik değişiklikler sonraki nesillerde ploidi varyasyonu, kromozom yeniden düzenlemeleri, somatik rekombinasyon, gen şeklinde kalıcı olarak kalır. amplifikasyonlar, nokta mutasyonları ve transpozonların eklenmesi. Epigenetik değişiklikler, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarından oluşur. Çeşitli ekin bitkilerinde kaynak materyal ile elde edilen somaklonlar arasındaki dizi varyasyonunu saptamak için bir dizi moleküler teknik kullanılmıştır. Çalışmamızda, üç farklı konsantrasyonda dört farklı bor tuzu meristem dokusundan rejenerasyon ve mikrosürgün gelişimi için denemiştir. *L. orientalis* gibi in vitro çoğaltımı zor odunsu türlerde, in vitro kültürü baskılayan, sürgün uçlarında nekroz oluşumunun gözlenmesi, büyüme ve gelişmenin baskılanması gibi bazı sınırlamalar görülmektedir. Bitki hücrelerinin in vitro olarak büyümesi ve bütün bitkilerde yenilenmesi, yalnızca hücrelerin mitotik bölünmesini içeren aseksüel bir süreçtir. Bu bağlamda, bitki dokusu kültürlenirken kontrolsüz ve rastgele spontan varyasyonların ortaya çıkması büyük bir problemdir (Karp, 1994). Böyle durumlarda besin ortamı kompozisyonunda yer alan büyüme düzenleyicileri, organik bileşenler, çeşitli aminoasitler, makro ve mikro elementlerin konsantrasyonu ve/veya çeşiti değiştirilerek in vitro kültürlerde tedavi yoluna gidilmektedir. Bu uygulamalar sırasında da zaman zaman uygulama baskısı, değişen tuz konsantrasyon ve/veya çeşitine bağlı stres etkileri somaklonal varyasyonlara sebep olmaktadır.

Literatürde In vitro doku kültürü teknikleri ile çoğaltılan bitkilerde çeşitli varyasyonların fark edildiğine dair pek çok çalışma yer almaktadır (Barret vd., 2006; Baranek vd, 2010). Doğada kendiliğinden veya çevresel faktör kaynaklı olan bu varyasyonlar, in vitro kültürlerde biyokimyasal bileşikler ve stres koşulları tarafından indüklenir. Varyasyon, tek veya çoklu hücreler kullanan organogenez ve

embriyogenez sırasında farklılaşmış hücrelerden meydana gelir ve aynı zamanda in vitro kültürel koşul, önceden var olan varyasyonların ekspresyonunun düzenlenmesinde uyarır. Bu varyasyonların çoğu fide üreticileri açısından büyük bir sorundur. Bununla birlikte, bitki yetiştiricileri, biyoteknoloji uzmanları ve diğer bilimsel topluluklar, bitki kalitesini iyileştirmede varyasyonun potansiyel kullanımları konusunda çok iyimserdir.



KAYNAKÇA

- Acar, M.İ., 1989. (*Liquidambar orientalis* Mill.) Balsamı (Sığla Yağı) Eterik Yağının GC-MS-DS Sistemi ile Analiz Edilerek Birleşiminin Belirlenmesi. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları, Teknik Raporlar Serisi No:33, 5-21.
- Acatay, A. 1963. Sığla Ağacı (*Liquidambar orientalis* Mill.)'nın Türkiye'de Yayılışı, Yeni Tesbit Edilen Varyetesi ve Sığla Ağaçlarına Musallat Olan Böcekler. İ. Ü. Orman Fakültesi Dergisi, Seri A, Cilt 8, Sayı 2, İstanbul.
- Afify, A.M.R., El-Beltagi, H.S., Abd El-Salam, S.M., Omran, A.A. (2012) Protein solubility, digestibility and fractionation after germination of sorghum varieties. PLoS ONE. 7, e31154, 1-6.
- Akman, Y. 1995. Türkiye Orman Vegetasyonu. A. Ü. Fen Fakültesi Botanik Ana Bilim Dalı. Ankara.
- Alan, M., Kaya, Z. 2003. Oriental Sweet Gum. (*Liquidambar orientalis* Mill.). EUFORGEN Technical Guidelines.
- Alan M , Velioğlu E , Ezen T , Şıklar S , Öztürk H . (2018). Anadolu sığla ağacı (*Liquidambarorientalis*Mill.) beş yaşlı fidanlarında bazı kantitatif karakterlerin çeşitliliği. Ormancılık Araştırma Dergisi, 5 (1) , 74-81. DOI:10.17568/ogmoad.394156
- Alpaslan M, Gunes A (2001) Interactive effects of boron and salinity stress on the growth, membrane permeability and mineral composition of tomato and cucumber plants. Plant Soil 236:123–128
- Anşin, R., Özkan, Z.C. 1997. Tohumlu Bitkiler (Spermatophyta) Odunsu Taksonlar. Karadeniz Teknik Üniversitesi Orman Fakültesi, 167/19, Trabzon.
- Aslan, M.B., Şahin, H.T. Unutulan Bir Orman Ürünü Kaynağı: Anadolu Sığla Ağacı (*Liquidambarorientalis* Miller), Journal of Bartın Faculty of Forestry, 2016,18(1): 103-117.

- Arslan N, Baydar H, Kızıl S, Karik Ü, Şekeroğlu N, Gümüşçü A 2015. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Üretiminde Değişimler ve Yeni Arayışlar. TMMOB Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi, 12–16 Ocak, Bildiriler Kitabı–I, Sayfa 483–505, Ankara.
- Atay, I., 1985. Sığla ağacının (*Liquidambar orientalis* Mill.) önemi ve Sivikültürel özellikleri. G.Ü. Orman Fakültesi Dergisi (35), 15-21.
- Aydınöz, M., Bulut, S. 2014. Egenin Gizli Kalmış Şifa İksiri: Sığla. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi 14, 1 6.
- Baranek, M., B. Krizan, E. Ondrusikova and M. Pidra, 2010. DNA-methylation changes in grapevine somaclones following in vitro culture and thermotherapy. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 101: 11-22.
- Barret, P., M. Brinkman and M. Beckert, 2006. A sequence related to rice Pong transposable element displays transcriptional activation by in vitro culture and reveals somaclonal variations in maize. Genome, 49: 1399-1407.
- Bastías EI, González-Moro MB, González-Murua C (2004) *Zea mays* L. *amylacea* from the Lluta Valley (Arica-Chile) tolerates salinity stress when high levels of boron are available. Plant Soil 267:73–84
- Bayraktar M., Hayta S., Parlak S. & Gürel A. (2015) Micropropagation of centennial tertiary relict trees *Liquidambar orientalis* Miller through meristematic nodules produced by cultures of primordial shoots, Trees, 29 (4):999-1009.
- Ben Gal ve Shani (2002) Yield, transpiration and growth of tomatoes under combined excess boron and salinity stress. Plant Soil 247:211–221
- Berkel, A., & Huş, S. (1944). Sığla Ağacı Ormanları ve Sığla Yağı Üzerine Araştırmalar.
- Berkel, A., 1955. Sığla Ağacı (*Liquidambar orientalis* Mill.) odununun makroskopik özellikleri ve anatomik yapıları hakkında araştırmalar. İ.Ü. Orman Fakültesi Dergisi Seri A, Cilt V, (I -I I), 1-17.

- Bhojwani, S.S., Dantu, P.K. (2013) Plant tissue culture, an introductory text. Springer New Delhi, India.
- Bingham FT, Strong JE, Rhoades JD, Keren R (1987) Effect of salinity and varying boron concentration on boron uptake and growth of wheat. Plant Soil 97:345–351
- Botstein, D., White, R., Skolnick, M. and Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, Am. J. Of Human Genetic, 32; 314-331.
- Bozkurt, Y., Göker, Y., Kurtoğlu, A., 1989. Sığla ağacının bazı özellikleri. İ.Ü. Orman Fakültesi Dergisi Seri B, Cilt: 39, Sayı: 1, 43-52.
- Brondani, G. E., Araujo, M. A., Alcântara, B. K., Carvalho, J. G., Gonçalves, A. N., & Almeida, M. de. (2012). Acta Scientiarum. Agronomy, 34(4), 403-411.
- Cullings, K. (1992). Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. Molecular ecology 1(4): 233-240.
- Çengel, B., İçgen, Y., Kandemir, G., Özdilek, A., Velioğlu, E. Kaya, Z. 2008. Anadolu sığlasının (*Liquidambar orientalis* Miller) populasyon düzeyinde genetik yapısı ve koruma stratejileri. 1. Uluslar arası Sığla Çalıştayı, 9-12 Ekim 2008, Dalaman.
- Davis P.H. 1982. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, vol. 4. Edinburgh University Press: Edinburgh; 264.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle, (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin 19:11-15.
- Eaton FM (1944) Deficiency, toxicity, and accumulation of boron in plants. J Agric Res, 69: 237-277.
- Efe, A. 1987. *Liquidambar orientalis* Mill. (Sığla Ağacı)'ın Morfolojik ve Palinolojik Özellikleri Üzerine Araştırmalar. İ. Ü. Orman Fakültesi. Dergisi Seri A. Cilt: 37, Sayı:2, 273-286, İstanbul.

- El-Beltagi, H.S., Ahmed, S.H., Namich, A.A.M., Abdel-Sattar, R.R. (2017) Effect of salicylic acid and potassium citrate on cotton plant under salt stress. Fresen. Environ. Bull. 26, 1091-1100.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N. 2000. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler). Türkiye Tabiatını Koruma Derneği ve Van 100. Yıl Üniversitesi Yayını.
- Evans DA and Sharp WR (1988) Somaclonal and gametoclonal variation. In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV (eds) Handbook of Plant Cell Culture. New York: Macmillan Publishing Company, p 97-132.
- Feigin A, Ravina I, Shalhevet J (1991) Irrigation with treated sewage effluent. Springer, New York
- Ferreira RE, Aljaro AU, Ruiz RS, Rojas LP, Oster JD (1997) Behavior of 42 crop species grown in saline soils with high boron concentrations. Agric Water Manag 34:111–124
- Filipecki M and Malepszy S (2006) Unintended consequences of plant transformation: a molecular insight. J Appl Genet. 47: 277-286.
- Findelee P, Goldbach HE. Rapid effects of boron deficiency on cell wall elasticity modulus in Cucurbita pepo roots. Bot Acta. 1996;109:463–465.
- Flowers, T.J., Colmer, T.D. (2015) Plant salt tolerance, adaptations in halophytes. Ann. Bot. 115, 327–331.
- Genişel, H. (2013). Türkiye Florası'ndaki Acı Çiğdem (Colchicum L.) Yeni Tür Adaylarının Karakterizasyonunda ISSR Markörlerin Kullanımı. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 70s.
- George EF (1993) Plant propagation by tissue culture. Exegetics, London.
- Golldack, D., Li, C., Mohan, H., Probst, N. (2014) Tolerance to drought and salt stress in plants, unraveling the signaling networks. Front. Plant Sci. 5, 151.

- Grattan SR, Shannon MC, Grieve CM, Poss JA, Suares D, Leland F (1997) Interaction effects of salinity and boron on the performance and water use Eucalyptus. Acta Hort 449:607–613
- Grieve CM, Poss JA (2000) Wheat response to interactive effects of boron and salinity. J Plant Nutr 23:1217–1226
- Gül, G. S. (1986). Sığla Ağacı (Liquidamber orientalis Mill.) Kabuk Sıyrıntılarından Yağ Elde Etme Yöntemleri Üzerine Araştırmalar. Orman Araştırma Enstitüsü Yayınları, Teknik Bülten Serisi, No: 178. Ankara Yüksek Ziraat Enstitüsü Dergisi, Cilt:3, Yıl:2, Sayı:1 (5), 9-28.
- Günel, N., 1994. Liquidambar orientalis (Anadolu sığla ağacı)'in güneybatı Anadolu'daki yayılışında relief, iklim ilişkileri. Türk Coğrafya Dergisi, Sayı: 29, 175-190.
- Hilooğlu, M. (2012). Türkiye’de yayılış gösteren perorhagia türleri arasındaki genetik akrabalığın moleküler belirteçlerle tespit edilmesi, Anadolu Üniversitesi.
- Holloway RE, Alston M (1992) The effects of salt and boron on growth of wheat. Aust J Agric Res 43:987–1001
- Hu H, Brown PH, & Labavitch JM (1996) Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin. J Exp Bot, 295: 227-232.
- Huş S., 1949. Sığla Ağacının (Liquidambar orientalis Mill.) Ormancılık Bakımından Önemi ve Sığla Yağının Kimyasal Araştırılması Orman Genel Müdürlüğü Yayın No: 83: 7-27.
- Huş, S., 1969. Orman mahsulleri kimyası. İstanbul Üniversitesi Yayın No: 1451, Orman Fakültesi Yayın No: 150, İstanbul.
- İktüeren, Ş., Acar, İ. 1987. Sığla Ağacı’nın (Liquidambar orientalis Mill.) Doğal Yayılışı, Sığla Yağı Üretimi ve Pazarlaması. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları Dergi Serisi, Cilt 33, Sayı 2, No:66, 7-15.

- İstek, A., 1994. Sığla yağı (storax)'nın kimyasal bileşenleri. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 50 s. Trabzon.
- Joshi, P., Dhawan, V.: Assessment of genetic fidelity of micropropagated *Swerita chiraytia* plantlets by ISSR marker assay. - Biol. Plant. 51: 22-26, 2007.
- Kalendar, R., A. Flavell, T. Ellis, T. Sjakste, C. MoisyveA. H. Schulman (2011). Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. Heredity 106(4): 520-530.
- Karp A. Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In: Vasil IK, Thorpe TA (eds) Plant cell and tissue culture. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers; 1994. p 139-152
- Kataeva NV, Butenko RG (1987) Clonal micropropagation of apple trees. Acta Hortic 12:585–588.
- Kendir G, Güvenç A. Etnobotanik ve Türkiye’de Yapılmış Etnobotanik Çalışmalara Genel Bir Bakış. Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy. 2010; (1): 49-80.
- Keren R, Bingham FT (1985) Boron in water, soils and plants. In: Stuart R (ed) Advances in soil science, vol 1. Springer, New York, pp 229–276
- Kesercioğlu, T. 1973. Türkiye Bitkileri Üzerine Sitotaksonomik, Anatmik ve Morfolojik Araştırmalar *L. orientalis* Mill. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi İlmi Raporlar Serisi No: 173
- Kobayashi M, Nakagawa H, Asaka T and Matoh T 1999 Boraterhamnogalacturonan II bonding reinforced by Ca²⁺ retains pectic polysaccharides in higher-plant cell walls. Plant Physiol. 119, 199–203.
- Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M., Sadh, R.K. (2016) Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. 3 Biotech. 6, 54.

- Krishnan PN, Decruse SW, Radha RK (2011) Conservation of medicinal plants of Western Ghats, India and its sustainable utilization through in vitro technology. *Vitro Cell Dev Biol Plant* 47(1):110–122
- Küçükala A., Durmuşkahya C., Koray Z. 2010. Sıgla Ağacının Korunmasına Yönelik Eğitim Çalışmaları Projesi Sonuç Raporu, ÖÇKK Başkanlığı Ankara 2010
- Lank P, M. Wahl, Boric Acid, Editor(s): Philip Wexler, *Encyclopedia of Toxicology* (Third Edition), Academic Press, 2014, Pages 533-535,
- Larkin PJ, Scowcroft WR (1981). Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60, 197–214.
- Leroy, X.J., Leon, K., Charles, G., Branchard, M.: Cauliflower somatic embryogenesis and analysis of regenerant stability by ISSRs. - *Plant Cell Rep.* 19: 1102-1107, 2000.
- Li, G., Quiros, C.F., 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theoretical and Applied Genetics* 103(2-3): 455-461.
- Liang G.J., G. P. Huang, L. Deng, et al., “Effect of Boron, Sugar, Calcium and DA-6 on the Growth of Loquat Pollen Tube,” *Journal of Zhaoqing University*, Vol. 32, No. 2, 2011, pp. 50-56.
- Loomis WD & Durst RW (1992) Chemistry and biology of boron. *Biofactors*, 3: 229-239.
- Lovatt CJ & Dugger WM (1984) Boron. In: Frieden E ed. *Biochemistry of the essential ultratrace elements*. New York, London, Plenum Press, pp 389-421.
- Mansuroğlu S. ve Gürel E. (2001) Mikroçoğaltım, Bölüm 8. S.262-281, (eds. Babaoğlu M., Gürel E. Ve Özcan S.), *Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları*, Selçuk Üniv. Vakfı Yayınları, Konya s:374.

- Marcar NE, Guo J, Crawford DF (1999) Response of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *E. globulus* Labill. ssp. *globulus* and *E. grandis* W.Hill to excess boron and sodium chloride. *Plant Soil* 208:251–257
- Martins, M., Sarmiento, D., Oliveira, M.M.: Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. - *Plant Cell Rep.* 23: 492-496, 2004.
- Martins-Lopes, P., S. Gomes, J. Lima-Brito, J. LopesveH. Guedes-Pinto (2009). Assessment of clonal genetic variability in *Olea europaea* L. ‘Cobrançosa’ by molecular markers. *Scientia horticulturae* 123(1): 82-89.
- Matthes, M., Singh, R., Cheah, S.C., Karp, A. (2001) Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue cultured derived regenerants revealed by AFLPs with methylationsensitive enzymes. *Theor. Appl. Genet.* 102, 971–979.
- Mikkelsen RL, Haghnia GH, Page AL, Bingham FT (1988) The influence of selenium, salinity, and boron on alfalfa tissue composition and yield. *J Environ Qual* 17:85–88
- Munns R, Termaat A (1986) Whole-plant responses to salinity. *Aust J Plant Physiol* 13:143–160
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- Nable RO, Banuelos GS, Paull JG (1997) Boron toxicity. *Plant Soil* 198:181–198
- Nguyen, Q.T. and Kozai, T., 1998. Environmental effects on the growth of plantlets in micropropagation. *Envir. Cont. in Biol.* 36(2) 59-75.
- Nicholaichuk W, Leyshon AJ, Jame YW, Campbell CA (1988) Boron and salinity survey of irrigation projects and the boron adsorption characteristics of some saskatchewan soils. *Can J Soil Sci* 68:77–90
- Örtel, E. 1988. Sığla ormanlarımızın durumu. *Ormancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi* Cilt 17, sayı 194: 16-19.

- Öz Aydın, S. 2004. RAPD Belirleyicileri ve Bitki Sistematiği. DPÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 6: 116–129.
- Özkaynak, E., & Samancı, B. (2005). MİKROÇOĞALTIMDA ALIŞTIRMA. Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences, 19(36), 28-36.
- Özmen, K., 2011. Sığla ağacının (*Liquidambar orientalis* Miller) in vitro koşullarda çoğaltım özelliklerinin araştırılması. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 45 s. Antalya.
- Pan R.C., X. J. Wang and N. H. Li, “Plant Physiology,” Higher Education Press, Beijing, 2008, p. 36
- Parlak, S., 2012. Sığla (*Liquidambar orientalis* Miller)’da alternatif vejetatif üretim yöntemi. Orman Mühendisleri Odası Yayın Organı, pp 20–23. http://ormuh.org.tr/arsiv/files/dergi_2012_4.pdf. Accessed 15 Dec 2014
- Peşmen, H., 1972: The Genus *Liquidambar* L., İu Davis Flora of Turkey and East Aegean Islands, Vol: 4, P: 264-265.
- Picchioni GA, Karaca H, Boyse LG, McCaslin BD, Herrera EA (2000) Salinity, boron, and irrigated pecan productivity along New Mexico’s Rio Grande Basin. J Environ Qual 29:955–963
- Pospisilova, J., Ticha, I., Kadlecek, P., Haisel, D., and. Plzakova, S., 1999a. Acclimatization of micro-propagated plants to ex vitro conditions. *Biologia Plantarum*, 42(4): 481-497.
- Ramón A M, Carpena-Ruiz R O and Gárate A 1990 The effects of short-term deficiency of boron on potassium, calcium and magnesium distribution in leaves and roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. In *Plant Nutrition Physiology and Applications*. Ed. M L van Beusichem. pp. 287–290. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Reed BM, Sarasan V, Kane M, Bunn E, Pence VC (2011) Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *Vitro Cell Dev Biol Plant* 47(1):1–4

- Skirvin RM (1986) Propagation of temperate fruits and nuts. In: Conger BV (ed) Cloning of agricultural plants via in vitro techniques. CRC Press, Boca Raton.
- Smýkal, P., N. Bačová-Kerteszová, R. Kalendar, J. Corander, A. H. SchulmanveM. Pavelek (2011). Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) germplasm assessed by retrotransposon-based markers. Theoretical and Applied Genetics 122(7): 1385-1397.
- Solarova, J. and Posposilova, J., 1997. Effect of carbon dioxide enrichment during in vitro cultivation and acclimatization to ex vitro condition. *Biologia Plantarum*. 39(1): 23-30
- Sutter, E., Barker, P. 1984. Tissue Culture Propagation Of Selected Mature Clones Of Liquidambar Styraciflua Intern Plant Propagators Soc. Comb. Proc. Vol 33: 113-117.
- Tang P and De la Fuente R 1986 The transport of indole-3-acetic acid in boron- and calcium-deficient sunflower hypocotyl segments. *Plant Physiol.* 81, 646–650.
- Teasdale R D and Richards D K 1990 Boron deficiency in cultured pine cells. Quantitative studies of the interaction with Ca and Mg *Plant Physiol.* 93, 2071–2078.
- Teng C.C and Y. C. Zhang, “The Influence of Boric Acid and Sucrose on the in Vitro Germination of Potato Pollen,” *Seed*, Vol. 28, No. 2, 2009, pp. 15-20.
- Tsadilas CD (1997) Soil contamination with boron due to irrigation with treated municipal waste water. In: Bell RW, Rerkasem B (eds) *Boron in soils and plants*. Kluwer, Dordrecht, pp 265–270
- Ürker, O., 2014. Çevre Etiği Bağlamında Anadolu Sığla Ormanları. Ankara Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, Doktora Tezi, 325 s. Ankara.
- Van Duin M, Peters J, Kieboom A and Van Bekkum H 1987 Synergic coordination of calcium in borate-polyhydroxy-carboxylate systems. *Carbohydr. Res.* 162, 65–78.

- Van Waes JM, Debergh PC (1986). Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of some Western European orchids. *Physiol Plantarum* 66: 435-442.
- Veilleux RE and Johnson AT (1998) Somaclonal variation:molecular analysis, transformation interaction, andutilization. *Plant Breed Rev.* 16: 229-268.
- Venkatachalam, L., Sreedha, R.V., Bhagyalakshmi, N.: Micropropagation in banana using high levels of cytokinins does not involve any genetic changes as revealed by RAPD and ISSR markers. - *Plant Growth Gegul.* 51: 193-205, 2007.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijnhabs, M., Van De Lee,T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Res.* 21: 4407-4414.
- Wang, W.X., Barak, T., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A. (2007) Abiotic resistance and chaperones, possible physiological role of SP1, a stable and stabilizing protein from *Populus*. In, Vasil, K. *Plant Biotechnology 2000 and Beyond*. 1st Ed. (Dordrecht, Kluwer), 439-443.
- Warrington K (1923) The effects of boric acid and borax on the bread bean and certain other plants. *Ann Bot*, 37: 629-672.
- Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. RafalskiveS. V. Tingey (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research* 18(22): 6531-6535.
- Wimmer MA, Muhling KH, Lauchli A, Brown PH, Goldbach HE (2003) The interaction between salinity and boron toxicity affects the subcellular distribution of ions and proteins in wheat leaves. *Plant Cell Environ* 26:1267–1274
- Yaltırık, F. ve Efe, A. 1994. *Dendroloji Ders Kitabı, Gymnospermae-Angiospermae*, İstanbul ÜniversitesiOrman Fakültesi Yayınları, İ.Ü. Yayın No: 3836, O.F. Yayın No: 431, İstanbul.

- Yermiyahu, U., Ben-Gal, A., Keren, R. et al. Combined effect of salinity and excess boron on plant growth and yield. *Plant Soil* 304, 73–87 (2008).
- Yermiyahu U, Zilberman J, Ben-Gal A, Keren R (2006) Bioavailability and toxicity of residual boron originating from saline irrigation water. *World Congress of Soil Science, Philadelphia, USA, July 10–15, 2006*
- Yorgancılar, M., Yakışır, E. & Tanur Erkoyuncu, M. (2016). Moleküler Markörlerin Bitki Islahında Kullanımı. *Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi*, 4(2), 1-12.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D.: Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. - *Genomics* 20: 176-183, 1994.
- Zobayed, S:M.A., Zobayed, F.A. Kubota, C., and Kozai, T., 1999. Stomatal characteristics and leaf anatomy of potato plantlets cultured in vitro under photoautotrophic and photomixotrophic conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 35: 183-188.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : T***r M*****n
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi: Ö*****ş 0*/0*/1**9
Medeni Hali : Evli
Telefon : 0 5*5 4*0 9* 6*
E-posta : ta*****n@posta.mu.edu.tr

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Ödemiş Lisesi	1996
Lisans	Ege Ünivesitesi	2003

İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon/görev
2005-2006	Selçuk Gıda A.Ş.	Ziraat Mühendisi
2006	Bademli Tarımsal Kalkınma Kooperatifi	Ziraat Mühendisi
2006-2007	Usluoğlu Tarım Ltd. Şti.	Ziraat Mühendisi
2008-2009	Çimsan A.Ş.	Ziraat Mühendisi
2010-2014	Ödemiş Süs Bitkileri Birliği	Ziraat Mühendisi
2014-	Muğla Büyükşehir Belediyesi Tarımsal Hizmetler Dairesi	Ziraat Mühendisi

Yabancı Dil(ler)

Dil (İngilizce, vs)	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma		X	
Konuşma		X	
Anlama		X	
Okuma		X	

Bilimsel Faaliyetler

Kitaplar

- Mercan, T., 2015. Mevsimlik Süs Bitkileri Yetiřtiricilięi, Muğla Büyükşehir Belediyesi Eğitim Yayınları-3

-

Yayınlar

- Mercan, T., Keskin, B. ve Tezcan, S., “Bozdaę (demiř, İzmir)’in Tenebrionidae (Coleoptera) Faunasının ukur Tuzaklarla Belirlenmesi zerinde Bir Araştırma”, Ekoloji, 53: (2004), 44-48s.
- Kaya Ergun, Balcı Mehmet Ali, Akgller Ömer, Galatalı Selin, Yeniocak Sevil, Mercan Taner, Gldaę Sevinç, zkaya Damla Ekin, ztrk Bilge, elik Onur, Aktay İrem, 2021. Development of an optimum proliferation medium via the graph kernel statistical analysis method for genetically stable in vitro propagation of endemic *Thymus cilicicus* (Turkey). Acta Botanica Croatica
- Kıvrak Kiran S., Galatalı S., Yeniocak S., Ozkaya D.E., Mercan T., Gldag S., Celik O., Abdul Ghafoor N., Kaya E., 2021 Investigation of modified WPM medium for the best meristem proliferation of *Corylus avellana* L. Adv. Hort. Sci., 35(3): 285292