

T.C.

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sequoia sempervirens (SAHİL SEKOYASI)'İN
KRİYOPREZERVASYON YOLU İLE UZUN SÜRELİ
SAKLANMASI AMACIYLA TEK AŞAMALI
DONDURMA YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

EMRAH KIRDÖK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

GEBZE

2010

T.C.

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sequoia sempervirens (SAHİL SEKOYASI)'İN
KRİYOPREZERVASYON YOLU İLE UZUN SÜRELİ
SAKLANMASI AMACIYLA TEK AŞAMALI
DONDURMA YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

EMRAH KIRDÖK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

TEZ DANIŞMANI

YRD. DOÇ. DR. ELİF AYLİN ÖZÜDOĞRU

GEBZE

2010

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: *Sequoia sempervirens* (SAHİL SEKOYASI)’ İN KRIYOPREZERVASYON YOLU İLE UZUN SÜRELİ SAKLANMASI AMACIYLA TEK AŞAMALI DONDURMA YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

YAZARIN ADI: EMRAH KIRDÖK

1850’ li yıllarda 800 bin hektar yayılım alanına sahip olan *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. (Sahil sekoyası, Redwood)’ in büyük bir kısmı, Amerika kıtasına yapılan göçler esnasında hem yeni yerleşim alanları açmak, hem de kolay işlenebilen kaliteli odunu sayesinde artan kereste ihtiyacını karşılamak amacıyla kesilerek kaybedilmiştir. Bu kayıplar sonucunda 1910’ lü yıllarda orijinal popülasyonunun %90’ ını kaybetmiş olan sekoyanın daha fazla kaybedilmemesi için “Redwood’ ları Kurtarma Cemiyeti (Save the Redwoods League)” kurulmuştur. Böylelikle sekoya ormanları *in situ* koruma yöntemiyle biyosfer rezervleri ve milli parklar kapsamında korunmaya alınmıştır. Ancak yine de sekoyalar halen soyu tükenme tehlikesi ile karşı karşıya olan türler arasında bulunmaktadır.

Ancak sekoyanın düşük çimlenme yeteneği ve *in situ* koruma yöntemlerinin çevresel etkilere açık olması, bitki doku kültürü tabanlı, tamamlayıcı *in vitro* yöntemlerin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Bitki doku kültürü yöntemleri, bitki germplazmalarının kısıtlı bir alanda, genetik değişimleri en aza indirerek saklanmasına olanak tanıdığından ve çevresel etkenlerden izole olmasını sağladığından, *in situ* koruma yöntemlerine göre daha avantajlıdır. Bitki doku kültürü tabanlı orta süreli (besiyeri ve/veya ortam modifikasyonlarıyla bitkilerin büyüme hızlarını azaltarak, alt kültür sürelerini uzatmayı amaçlayan ‘yavaş büyütme’ yöntemi) ve uzun süreli (eksplantların sıvı azot içinde saklanmasını amaçlayan ‘kriyoprezervasyon’ yöntemi) saklama yöntemleri günümüzde soyu tükenme tehlikesiyle karşı karşıya olan birçok tür için de uygulanmaktadır.

Sunulan yüksek lisans tez çalışması kapsamında *S. sempervirens*’ in germplazmasının uzun süreli saklanması amacıyla tek aşamalı dondurma yöntemleri ile kriyoprezervasyonu denenmiştir. Bu amaçla, *in vitro* gövde kültürlerinden

sağlanan tomurcuklar 3 farklı tek aşamalı dondurma tekniği (vitritfikasyon, enkapsülasyon – vitritfikasyon ve damlacık dondurma yöntemi) uygulanarak kriyoprezerve edilmiş, elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak en uygun yöntemin seçilmesine/ optimize edilmesine çalışılmıştır.

SUMMARY

TITLE OF THE THESIS: DEVELOPMENT OF ONE – STEP FREEZING TECHNIQUES FOR THE LONG-TERM STORAGE OF *Sequoia sempervirens* (COASTAL REDWOOD) BY CRYOPRESERVATION

NAME OF THE AUTHOR: EMRAH KIRDÖK

Majority of the *Sequoia sempervirens* D. (Don) Endl. (Coastal Sequoia, Redwood) forests, which previously had a range of about 800 thousand hectare in 1850s, have been cut down during the immigrations to the continent of America, both for providing lands for urbanization and for the use of its high-quality lumber to meet the increasing needs for the timber. As a consequence of such activities, redwood lost 90% of its original population by 1910s, and to prevent a further loss of its germplasm an organization aiming to preserve redwood biodiversity has been established (“Save the Redwoods League”). Only after this initiative, redwood forests started to be preserved via *in situ* conservation approaches as biosphere reserves and national parks. Nevertheless, today redwood is still considered among the threatened species.

However, the low germinability of the redwood trees and some disadvantages of *in situ* conservation approaches, such as being vulnerable to environmental effects, revealed the necessity to develop tissue culture-based, complementary *in vitro* approaches. Plant tissue culture techniques enable the conservation of the germplasms in relatively smaller areas (e.g., inside a laboratory), keeping the risk of genetic alterations at the minimum, and are free of environmental effects, and thus are more advantageous than *in situ* conservation approaches. Indeed, plant tissue culture-based, medium- (‘slow growth storage’, aiming to decrease the growth rate and thus the periodic subculture intervals of the *in vitro* cultures by means of modifications in growth medium and/or culture conditions) and long-term conservation (storage of the explants in liquid nitrogen at -196°C by means of ‘cryopreservation’) approaches are today widely applied for the conservation of numerous species that are facing the risk of extinction in nature.

During the course of the present study, cryopreservation of *S. sempervirens* by one-step freezing techniques has been tested for the long-term conservation of its germplasm. With this aim, buds obtained from *in vitro* shoot cultures were cryopreserved by three different one-step freezing technique (i.e., vitrification, encapsulation – vitrification, and droplet-freezing), and the results obtained following each technique have been compared for the selection and optimization of the best procedure.

TEŞEKKÜR

Sahip oldukları üstün bilgi birikimleri, tecrübeleri ve geniş görüşleriyle yüksek lisans öğrenimim boyunca çalışmalarımda bana her zaman yol gösteren, dertlerimi en ince ayrıntısına kadar dinleyen, en zor zamanlarımda beni hayata ve akademisyenliğe bağlayan ve gerektiği zaman bir arkadaş, bir dost, bir abla gibi davranma inceliğine sahip olan değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Elif Aylin Özudoğru ve Yrd. Doç. Dr. Yelda Özden'e sonsuz saygı ve sevgilerimi sunarım. Onlar olmasaydı bu tez asla olmazdı.

Hem deneylerime verdikleri emekleri hem de 2 yıl boyunca eksiltmedikleri değerli sevgileri ve dostlukları için, canlarıma, Araş. Gör. Hülya Akdemir ve Uzman Ergün Kaya' ya sonsuz sevgilerimi sunarım. Onlar olmasaydı bu tez hiçbir zaman tamamlanamazdı.

Tez çalışması kapsamında kullanılan bitki materyalini temin eden Dr. Maurizio Capuana'ya (CNR/IGV - İtalya) ve histoanatomik analizlere yardımcı olan Dr. Carla Benelli'ye de (CNR/IVALSA - İtalya) teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında sağladığı imkânlar, sunduğu destek ve hiç eksiltmediği anlayışı için Biyoloji Bölüm başkanımız sayın Prof. Dr. Fusun Gümüsel'e ayrıca teşekkür ediyorum. Beni akademisyenliğe yönelten İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Nermin Gözükırmızı ve Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Sema Alikamanoğlu'ya da sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Beni asla yalnız bırakmayan kadim dostlarım Hamit Ufuk Çetin, Cemil Şafak Çetin ve Ayşe Sağay'a verdikleri sevgi ve destekleri için teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans eğitimim boyunca aynı koridoru birlikte topukladığımız, aynı servislere bindiğimiz, gerektiğinde birlikte sabahladığımız değerli biyoloji bölümü çalışanlarına da teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca yanımda olan, verdiğim kararları her zaman koşulsuz olarak destekleyen, ne zaman başım sıkışsa dertlerime çare olan, bana her zaman anlayışla yaklaşan, benden hiçbir zaman umutlarını kesmeyen ve bu dünyadaki tek dayanaklarım olan değerli annem, babam ve kardeşime en derin saygılarımı, sonsuz sevgilerimi sunuyor ve bu tezi canım aileme ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>SAYFA</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1 GİRİŞ	1
1.1 BİYOÇEŞİTLİLİK	1
1.1.1 BİYOÇEŞİTLİLİK TANIMI	1
1.1.1.1 Genetik Çeşitlilik	3
1.1.1.2 Tür Çeşitliliği	7
1.1.1.2.1 Tür Çeşitliliğinin Tarihçesi	7
1.1.1.3 Ekosistem Çeşitliliği	8
1.1.2 BİYOÇEŞİTLİLİĞİN KAYBI	10
1.1.2.1 Genetik Çeşitliliğin Kaybı	11
1.1.2.2 Tür Çeşitliliğinin Kaybı	11
1.1.2.2.1 Tür Çeşitliliğinin Kaybolmasından Sorumlu Süreçler	12
1.1.2.2.2 Türlerin Doğadaki Durumlarına Göre Sınıflandırılması	13
1.1.2.3 Ekosistem Çeşitliliğinin Kaybı	14
1.1.3 BİYOÇEŞİTLİLİĞİN KORUNMASI	15
1.1.3.1 Genetik Çeşitliliğin Korunması	15
1.1.3.2 Tür Çeşitliliğinin Korunması	16
1.1.3.3 Ekosistem Çeşitliliğinin Korunması	16
1.1.3.4 Koruma Stratejileri	16
1.1.3.4.1 <i>In Situ</i> Koruma Yöntemleri	16

1.1.3.4.2 *Ex Situ* Koruma Yöntemleri

17

1.2 BİYOÇEŞİTLİLİĞİN BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE KORUNMASI**19**

1.2.1 BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ

19

1.2.1.1 Tarihçe

20

1.2.1.2 Totipotensi ve Morfogenez

21

1.2.1.3 Bitki Doku Kültürünün Aşamaları

22

1.2.1.3.1 Germplazma Eldesi ve Eksplant Seçimi

22

1.2.1.3.2 Sterilizasyon

23

1.2.1.3.3 Besiyeri İçeriği

24

1.2.1.3.4 Kültür Eldesinde Karşılaşılan Sorunlar

25

1.2.1.4 Uygulama Alanları

27

1.2.2 ORTA SÜRELİ SAKLAMA – YAVAŞ BÜYÜTME

28

1.2.3 UZUN SÜRELİ SAKLAMA – KRİYOPREZERVASYON

30

1.2.3.1 Kriyoprezervasyonun Temelleri

30

1.2.3.2 Kontrollü Soğutma Yöntemleri

32

1.2.3.2.1 Önkoşullandırma Adımları

33

1.2.3.2.2 Kriyokoruma

34

1.2.3.2.3 Kriyodehidratasyon

35

1.2.3.2.4 Çözme ve Geri Kazanım

35

1.2.3.3 Tek Aşamalı Dondurma Yöntemleri

36

1.2.3.3.1 Önkoşullandırma

38

1.2.3.3.2 Ozmokoruma

39

1.2.3.3.3 Vitrifikasyon Aşaması ve Sıvı Azota Aktarım

39

1.2.3.3.4 Çözme ve Geri Kazanım

40

1.2.3.3.5 Enkapsülasyon – Dehidratasyon

41

1.2.3.3.6 Enkapsülasyon – Vitrifikasyon

43

1.2.3.3.7 Damlacık Dondurma ve Damlacık Vitrfikasyon

43

1.3 *Sequoia sempervirens* D. Don. (Endl.)**44**

1.3.1 KÖKENİ VE YAYILMA ALANLARI

44

1.3.2 GENEL ÖZELLİKLERİ

44

1.3.3 KULLANIMI

45

1.3.4	UYGULANAN KORUMA PROGRAMLARI	46
1.3.5	YAPILAN ÇALIŞMALAR	47
1.4	TEZİN AMACI VE LİTERATÜRE KATKISI	48
2	GEREÇ VE YÖNTEM	50
2.1	GEREÇLER	50
2.1.1	BİTKİ MATERYALİ	50
2.1.2	TEZ KAPSAMINDA KULLANILAN SARF MALZEMELER VE CİHAZLAR	50
2.2	YÖNTEM	53
2.2.1	BESİYERİ İÇERİĞİ VE KÜLTÜR ŞARTLARI	53
2.2.2	SENTETİK TOHUMLARIN HAZIRLANMASI	53
2.2.3	ORTA SÜRELİ SAKLAMA	55
2.2.3.1	Gövde Kültürlerinin Saklanması	55
2.2.3.2	Sentetik Tohumların Saklanması	55
2.2.4	UZUN SÜRELİ SAKLAMA	56
2.2.4.1	Soğuğa Alıştırma ve Önkültür Şartlarının Belirlenmesi	56
2.2.4.2	Vitrifikasyon	57
2.2.4.3	Enkapsülasyon Vitrifikasyon	57
2.2.4.4	Damlacık Dondurma	58
2.2.4.5	Histoanatomik analizler	61
2.3	SONUÇLARIN ALINMASI VE İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	64
3	BULGULAR	66
3.1	REJENERASYON BESİYERİNİN BELİRLENMESİ	66
3.2	ORTA SÜRELİ SAKLAMA	68
3.2.1	GÖVDE KÜLTÜRLERİNİN SAKLANMASI	68
3.2.2	SENTETİK TOHUMLARIN SAKLANMASI	71
3.3	UZUN SÜRELİ SAKLAMA SONUÇLARI	72

3.3.1 SOĞUĞA ALIŞTIRMA VE ÖNKÜLTÜR OPTİMİZASYON SONUÇLARI	72
3.3.1.1 Soğuğa Alıştırma Sonuçları	72
3.3.1.2 Sukroz Önkültürü Sonuçları	76
3.3.2 KRİYOPREZERVASYON SONUÇLARI	78
3.3.3 HİSTOANATOMİK ANALİZLER	83
4 TARTIŞMA VE SONUÇ	86
4.1 REJENERASYON BESİYERİNİN BELİRLENMESİ	86
4.2 ORTA SÜRELİ SAKLAMA	86
4.3 UZUN SÜRELİ SAKLAMA	88
4.4 SONUÇ	90
KAYNAKÇA	92
ÖZGEÇMİŞ	115
EKLER	
EK – 1: “THE SIVB 2009 IN VITRO BIOLOGY MEETING” ADLI KONGREDE SUNULAN BİLDİRİNİN ÖZETİ	
EK – 2: THE SIVB 2009 IN VITRO BIOLOGY MEETING” ADLI KONGREDE KAZANILAN ÖDÜLÜ BELGELEYEN YAZI	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1-1: di Castri ve Younes (1996)'e göre farklı biyoçeşitlilik seviyelerindeki hiyerarşik sınıflar.	2
1-2: Genel bir vitrifikasyon protokolünde izlenen adımlar.	38
2-1: Çalışmada kullanılan <i>Sequoia sempervirens</i> bitkileri.	50
2-2 : Deneylerde kullanılan cihazlar.	52
2-3 : <i>S. Sempervirens</i> apikal veya bazal tomurcuklarını içeren sentetik tohumların hazırlanma süreci	54
2-4 : <i>In vitro</i> gövde kültürlerinin ve apikal ve bazal tomurcukları içeren sentetik tohumların orta süreli saklanması.	56
2-5 : Enkapsülasyon – Vitrifikasyon ve Vitrifikasyon tekniklerindeki adımlar.	59
2-6 : Damlacık dondurma yöntemi ile <i>S. sempervirens</i> bitkisinin apikal ve bazal tomurcuklarının kriyoprezervasyonu.	60
2-7 : Tomurcukların dehidratasyonları ve historesine sabitleme aşamaları.	62
2-8 : Tomurcukların mikrotom ile kesimi ve PAS-Amido siyah boyama çözeltilerine maruz bırakılmaları.	63
3-1 : Normal kültür koşullarından alınan <i>S. sempervirens</i> bitkisi tomurcuklarından farklı besiyeri koşullarında gelişen gövdeler.	67
3-2 : 3 ve 9 ay +4 °C' ta saklama süresi sonunda elde edilen uzamış etiyole gövdeler.	69
3-3 : Sentetik tohumlarından +4°C' tan alınıp 1 mg/lt BA içeren MS besiyerine aktarıldıktan sonra gelişen gövdeler.	71
3-4 : 3 farklı sukroz konsantrasyonunun, apikal ve bazal tomurcukların canlılıklarına olan etkileri.	76
3-5 : Apikal ve bazal tomurcukların önkültür süreci sonunda rejenerasyonları.	77
3-6 : PVS-2 uygulama süresinin <i>S. sempervirens</i> tomurcuklarının canlılığı üzerindeki etkisi.	79
3-7: Damlacık dondurma yöntemi ile kriyoprezerve edilen tomurcukların besiyerine aktarıldıktan sonra gösterdikleri canlılık değerleri.	81
3-8: Damlacık dondurma tekniği ile elde edilen apikal ve bazal tomurcukların canlılık değerleri.	82
3-9 : Sıvı azot sonrasında canlı kalan tomurcuklardan gelişen gövdeler.	82

- 3-10** : Damlacık dondurma tekniği ile kriyoprezerve edilen apikal tomurcukların, kriyoprezervasyon sonrasındaki ışık mikroskobu fotoğrafları. 84
- 3-11**: Kontrol grubu tomurcuklardan alınan kesitler. 85

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2-1: Deneylerde kullanılan kimyasal sarf malzemelerinin listesi.	51
2-2: Çalışmada kullanılan gereçler.	51
3-1: <i>S. sempervirens</i> apikal ve bazal tomurcuklarının farklı besiyerlerindeki canlılık ve rejenerasyon oranları.	67
3-2: <i>S. sempervirens</i> kültürlerinin yavaş büyütme sonuçları.....	70
3-3: +4°C’ ta 1, 2, 3 ve 4 hafta süreyle soğuğa alıştırılan <i>S. sempervirens</i> kültürlerinden alınan apikal tomurcukların canlılık ve rejenerasyon oranları.	74
3-4: +4°C’ ta 1, 2, 3 ve 4 hafta süreyle soğuğa alıştırılan <i>S. sempervirens</i> kültürlerinden alınan bazal tomurcukların canlılık ve rejenerasyon oranları.....	75
3-5: <i>Sequoia sempervirens</i> kültürlerinin su önkültür sonundaki canlılık ve rejenerasyonları	78
3-6: Apikal ve bazal tomurcukların kriyoprezervasyonu.....	80

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrad Derece
2, 4 - D	2-4 dikorofenoksi asetik asit
2 ip	2- izopentil adenin
AH	Adenin Hemisülfat
AK	Aktif Kömür
BA	Benzil adenin
C	Canlılık
GOK	Gövde Oluşturma Kapasitesi
IAA	Indol asetik asit
IBA	Indol butirik asit
IUCN	International Union for Conservation of Nature
LS	Loading Solution (Yükleme Solüsyonu)
Lt	Litre
M	Molar
Mg	Miligram
MS	Murashige ve Skoog
NAA	Naftalen asetik asit
PVS-2	Plant Vitrification Solution - 2
QL	Quorin ve Lepoivre
R	Rejenerasyon

UNEP United Nations Environment Programme

WS Walter ve Skoog

1 GİRİŞ

1.1 BİYOÇEŞİTLİLİK

1.1.1 BİYOÇEŞİTLİLİK TANIMI

“Biyçeşitlilik” terimi aslında ilk olarak 1980’li yıllarda Norse ve McManus tarafından tanımlanmış olan “Biyolojik Çeşitlilik” teriminin kısaltılmış halidir (Norse ve McManus, 1980). Terimin kısaltılmış şekli ilk kez 1985 yılında Washington D.C.’de düzenlenen “Uluslararası Biyçeşitlilik Forumu”nda, Walter Jim Rosen tarafından kullanılmıştır (UNEP; United Nations Environment Programme, 1995). Konferansın bildirilerini içeren “Biyçeşitlilik” adlı kitap sayesinde de “Biyçeşitlilik” terimi sadece bilim dünyasında değil, toplum içinde de büyük bir popülerliğe sahip olmuş (Wilson, 1988), böylece çevreci gruplar, ekonomistler, politikacılar gibi farklı meslek gruplarına sahip insanlar tarafından da sıkça kullanılır olmuştur.

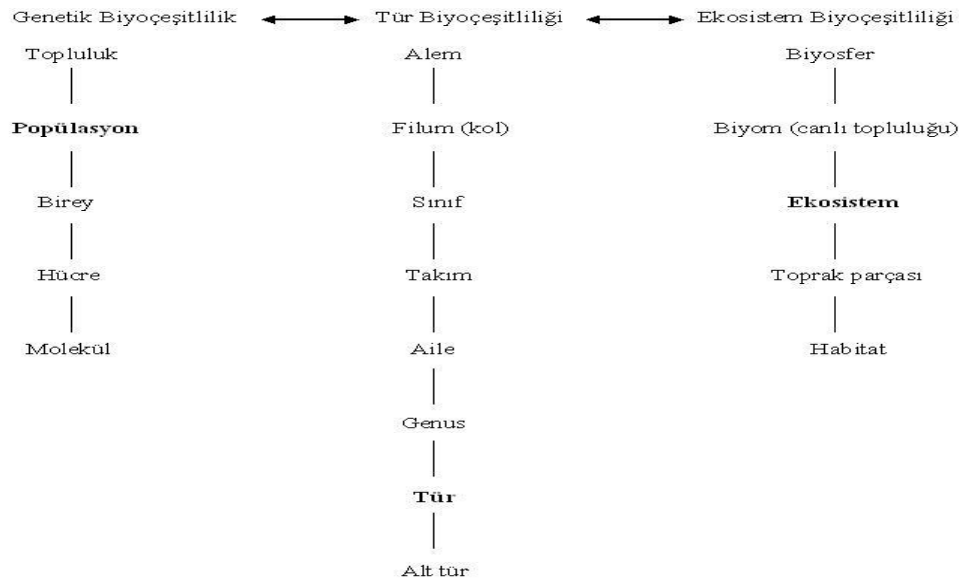
Biyçeşitlilik genel anlamda “dünya üzerindeki yaşayan tüm organizmaların sayısı, çeşidi ve onların varyasyonları” şeklinde ifade edilebilir. Ancak dikkatle incelendiğinde, biyçeşitlilik aslında insanın tüm yaşamsal aktivitelerini içine alan karmaşık bir süreçler topluluğudur.

Norse ve arkadaşları (1986) biyçeşitliliği üç temel sınıfa ayırmışlardır: (i) genetik çeşitlilik, (ii) tür çeşitliliği ve (iii) ekosistem çeşitliliği. Buna göre: genetik çeşitlilik türler arasındaki, DNA düzeyinde oluşan farklılıkları incelemektedir. Genetik çeşitliliğin ölçülmesinde temel olarak gen havuzunu oluşturan popülasyonlar incelenmektedir. Tür çeşitliliği ekosistem içerisindeki farklı türler arasındaki etkileşimleri inceler ve temel etkileşim ögesi türlerdir. Ekosistem çeşitliliği ise farklı ekosistemleri ve bunlar arasındaki etkileşimleri incelemektedir.

Biyçeşitlilik günümüze kadar pek çok kez, farklı şekillerde tanımlanmıştır. Jutro’ya göre bu tanımların sayısı on dördü bulunmaktadır (Jutro, 1993). Buna karşın, bu on dört tanımdan sadece iki tanesi uluslararası anlamda kabul görmüş ve kullanıma sunulmuştur. En çok kabul gören tanımlardan ilki, Birleşmiş Milletler tarafından da desteklenen tanımdır. Buna göre “biyçeşitlilik kara, deniz ve diğer sucul habitatlarda ve ekolojik komplekslerdeki canlılar arasındaki çeşitliliktir ve tür içinde, türler

arasında ve ekosistemlerdeki farklılıkları kapsar” (UNEP, 1992). Bir diğer en çok kabul gören tanım ise Küresel Biyoçeşitlilik Stratejisi kapsamında desteklenen tanımdır (WRI, IUCN and UNEP 1992). Buna göre “biyoçeşitlilik; bir bölgedeki gen, tür ve ekosistemlerin tamamıdır”.

Ancak di Castri ve Younes' e (1996) göre bu iki tanım biyoçeşitliliğin farklı öğeleri arasındaki ilişkileri göz ardı etmektedir. Doğaya baktığımızda farklı etkileşim seviyelerinin bir arada olduğunu görmekteyiz. Genetik çeşitlilik, tür çeşitliliği ve ekosistem çeşitliliği birbirleri arasında etkileşirken, bunların her birisinin yapısal öğeleri de kendi içlerinde farklı mekanizmalarla etkileşmektedir. Şekil 1-1’ de görüldüğü gibi, genetik çeşitlilik DNA'dan başlayarak hücre, birey, popülasyon ve topluluk etkileşimlerine kadar ulaşmaktadır. Genetik seviyede olan bir değişim aynı zamanda tür seviyesinde de etki gösterecek ve tür çeşitliliğini etkileyecektir. Tür çeşitliliğinin kendi içindeki etkileşimleri nedeniyle, ekosistemlerde de değişiklik olacaktır. Aynı şekilde bunun tersi de mümkündür. Ekosistemlerdeki değişiklikler, hem tür çeşitliliğini hem de genetik çeşitliliği belirleyen etkenler olacaktır. Bu yüzden biyoçeşitliliği tanımlarken, doğadaki farklı hiyerarşik seviyeleri de içine alan bir tanım yapmamız gerekmektedir.



Şekil 1-1: di Castri ve Younes (1996)'e göre farklı biyoçeşitlilik seviyelerindeki hiyerarşik sınıflar.

Sonuç olarak di Castri ve Younes biyoçeşitlilik için daha farklı bir tanım geliştirmiştir: “Biyçeşitlilik, genetik, taksonomik ve ekolojik ölçekli organizasyonların farklı düzeyleri arasındaki hiyerarşik etkileşimlerin bir bütünüdür” (di Castri ve Younes, 1996). Popülasyonlar (kendi gen havuzlarıyla birlikte), türler ve ekosistemler de bu üç ölçek arasındaki etkileşim noktalarındaki temel taşlardır. (Solbrig, 1991).

1.1.1.1 Genetik Çeşitlilik

Tüm canlı organizmalar için en ayırt edici olan, sahip oldukları DNA (Deoksiribonukleotid) üzerinde kodlanan genlerdir. Gerçekten, bugün tüm canlıların adenin, timin, guanin ve sitozin adı verilen dört farklı nükleotidin çeşitli varyasyonlarda bir araya gelmesiyle oluşan bir genetik şifreye sahip olduğunu bilmekteyiz. Çalışmalar sonucunda lineer olarak düzenlenmiş bu nükleotidlerin üçlü kodonlar halinde şifreledikleri yirmi çeşit aminoasit olduğu bulunmuştur ve bir organizmanın sahip olması gereken bütün özellikler bu genetik şifrede kodlanmıştır. Genetik çeşitlilik incelenirken, bir tür içindeki genetik şifrenin varyasyonları ve bu varyasyonların meydana getirdiği değişimler göz önüne alınmaktadır.

Genetik çeşitlilik üç farklı düzeyde olabilir; aynı popülasyona ait bireyler arasında (heterozigotluk), farklı popülasyonların bireyleri arasında veya popülasyonlar arasında. Dolayısıyla, genetik çeşitlilik popülasyonlar arasında ve popülasyon içinde gözlenen kalıtsal çeşitliliktir. Bu kalıtsal çeşitlilik (i) belirli bazı organizmalar tarafından sahip olunan genlerdeki varyasyonlar, (ii) gen ekspresyonunda meydana gelen farklılıklar, (iii) DNA’nın homolog kopyaları (allelere) arasında meydana gelen farklılıklar veya (iv) kromozomlarda meydana gelen translokasyonlarla oluşabilir. Diğer bir deyişle, gen ve/veya kromozom mutasyonları yeni bir genetik çeşitliliğin ortaya çıkmasına neden olabilir ve bu çeşitlilik eşeyli üreme gösteren canlılarda, rekombinasyonlar yoluyla, popülasyona dağılır. Genetik çeşitlilik ayrıca kendi kendine döllen popülasyonlardaki seleksiyon sonucu da oluşmaktadır.

Genellikle popülasyona dayanıklılık yönünden üstünlük sağlayan genetik çeşitlilik, bir türün hayatta kalması ve evrimini sürdürebilmesi için oldukça önemlidir. Bununla beraber, fotosentez, solunum gibi temel yaşamsal işlemleri kontrol eden genlerin büyük oranda korunduğu ve farklı taksalar arasında sadece çok

küçük değişiklikler sergiledikleri bilinmektedir. Yüksek organizmaların sahip olduğu genetik materyalin yaklaşık %98' ini oluşturan, kodlayıcı genlerin bulunmadığı “sessiz” DNA bölgelerinin biyoçeşitlilikteki rolü ise henüz aydınlatılamamıştır (Thomas, 1992).

Yukarıda da bahsedildiği gibi, genetik çeşitlilik türler ve popülasyonlar arasındaki farklılıkları belirlemekte ve evrimsel açıdan seçilimi sağlamaktadır. Tüm diğer biyoçeşitlilik şekilleri genetik çeşitliliğin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Dolayısıyla genetik çeşitliliğin belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu amaçla kromozoma ve DNA' ya dayalı çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.

1. Kromozoma Dayalı Yöntemler:

Kromozoma dayalı en temel yöntem, organizmaların sahip oldukları gen sayılarının belirlenmesidir. Örneğin bakterilerde gen sayısı 1000 civarında iken, bazı mantarlara gidildikçe bu sayı 10.000 olmakta, çiçekli bitkilerde ise 400.000 gene kadar ulaşmaktadır (UNEP, 1995). Genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla organizmaların sahip oldukları DNA miktarına da bakılabilir. Bir diğer yaklaşım da “karyotip analizi” yapılması, yani kromozomların yapı, boyut, şekil ve sayılarındaki değişikliklerin belirlenmesidir (Thomas, 1992).

2. Allozim Yöntemi:

Allozimler, aynı gen lokusunun farklı allelik varyantlarını içeren izozimler (moleküler yapıları farklı olmasına karşın, işlevleri aynı olan enzimler) arasındaki elektriksel yüklerin ve moleküler ağırlıklarının karşılaştırılması yoluyla, organizmalar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde kullanılırlar. Bu değişkenlerdeki farklılıklar proteinlerin poliakrilamid jel üzerinde farklı hızlarda göç etmesini sağlar ve böylelikle farklı türler arasındaki ve tür içindeki varyasyonların tespit edilmesinde kullanılabilir. Allozimlerin üstünlüğü, tekniğin nispeten ucuz ve basit olmasıdır. Bununla beraber, yöntemin çeşitli sınırlılıkları da bulunmaktadır. Bunlar arasında en önemlisi allozimlerin bitki genomu içinde çok kısıtlı olarak üretilmeleri (Frankel ve ark., 1995) ve sadece belirli bir lokusun varyasyonlarını gösterebilmeleridir. Bu yüzden hassas bir varyasyon tespitinde kullanılamamaktadırlar.

3. DNA Temelli Yöntemler:

Moleküler belirteçler, çeşitliliğin genom seviyesinde belirlenmesini sağlayan belirli DNA dizilerine verilen isimdir. Bu belirteçler bitkilerin bulundukları ortam koşulları, gelişme seviyeleri, farklılaşma seviyeleri gibi etkenlerden bağımsız olduğu için türler arasında çeşitliliğin ölçümünde etkin şekilde kullanılırlar.

Herhangi bir moleküler belirtecin çeşitliliğin ölçümünde kullanılması için belirli özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu özellikleri şu şekilde özetleyebiliriz:

- Polimorfik olmalı ve genom içinde dağılmalı
- Genetik çeşitliliği yeterli seviyede ayırt edebilmeli,
- Hızlı, basit ve ucuz olmalı,
- Az miktarda DNA ve doku örneğine ihtiyaç duymalı,
- Dizi bilgisine ihtiyaç duymamalı.

3.1. RFLP Tekniği ile Çeşitliliğin Belirlenmesi:

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) tekniği, DNA seviyesinde farklılıkların belirlenmesi için geliştirilen ilk belirteç yöntemlerindendir (Botstein, 1980). Bu teknikte DNA polimorfizmi, restriksiyon endonükleazları (DNA dizisini endonükleolitik olarak kesen ve yüksek dizi özgünlüğü gösteren, yani sadece belirli dizileri kesen, enzimler) ile kesilmiş DNA parçalarının jel elektroforezi ile moleküler büyüklükleri temelinde ayrılması ve bu parçaların kimyasal olarak işaretlenmiş DNA dizileri ile hibritlenmesi (Southern blot) sonucunda belirlenir. Bu belirteç yönteminde çeşitlilik, restriksiyon bölgelerinde oluşan insersiyon, delesyon veya tek nükleotid polimorfizmleri ile belirlenmektedir. RFLP belirteçleri; yüksek seviyede polimorfik, bölgeye özgül ve tekrar kullanılabilir oldukları için en etkili belirteç yöntemlerinden biri olarak göze çarpmaktadırlar.

3.2. PCR' a Dayalı Yöntemler:

PCR (Polymerase Chain Reaction, Polimeraz Zincir Tepkimesi) (Mullis ve Faloona, 1987); DNA'nın belirli bir bölgesinin, *in vivo* ortamda gerçekleşen replikasyona benzer bir şekilde, *in vitro* ortamda çoğaltılmasıdır. PCR temelli tekniklerinin basit ve hızlı olmaları, biyoçeşitliliğin belirlenmesi çalışmalarında kullanımlarını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, rastgele primerlerin kullanımı ile dizi bilgisi ba-

güçlülüğünün de ortadan kalkması bu belirteçlerin rahatlıkla kullanımına olanak sağlamıştır. En çok kullanılan PCR tabanlı belirteçler şunlardır: (i) RAPD (ii) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, Çoğaltılmış Parça Uzunluk polimorfizmi) (iii) Mikrosatellit diziler.

- RAPD belirteçleri: Rastgele seçilen primerlerin kullanımı ile uygulanan RAPD tekniğinde, primerler arasında kalan dizilerde gerçekleşen yeniden düzenlenme farklılıklarına göre çeşitlilik ayrımı yapılmaktadır (Williams ve ark, 1991). Ancak bu tekniğin dezavantajı, farklı koşullarda farklı sonuçların elde edilmesi ve heterozigot bireylerle homozigot bireylerin ayırt edilememesidir (Bardakçı, 2001). Ayrıca RAPD belirteçlerine ek olarak, PCR tekniğini temel alan diğer yöntemler de çeşitliliğin tespitinde kullanılmaktadır. Bunlardan ilki, 10-15 nükleotid uzunluğunda tek bir primer ile yapılan AP-PCR (Arbitrary Primed PCR)' dır. Bir diğer yöntem ise, 10 nükleotidden kısa primerler kullanılarak gerçekleştirilen DAF tekniğidir. Bu iki yöntemde de otoradyografi ve gümüş boyama kullanılmaktadır.
- AFLP belirteçleri: Bu yöntem RAPD tekniğinde elde edilen sonuçların yeniden üretilebilirlik sorununu ortadan kaldırmak için geliştirilmiştir (Vos ve ark, 1985). Aynı zamanda bu teknik RAPD ve RFLP yöntemlerini de birleştirmektedir. Restriksiyon kesimine maruz bırakılmış DNA dizisi sonucunda ortaya çıkan dizileri, uygun primer adaptörleri ve bir tane seçici nükleotidle birleştirilerek yapılan PCR amplifikasyonu sayesinde her bir örnek için ortalama 50 – 100 bant elde edilir. Elde edilen bu bantlar yüksek derecede polimorfiktirler ve alt tür seviyesinde taksonomik ayırma sağlarlar (Althoff ve ark., 2007)
- Mikrosatellit belirteçleri: Mikrosatellit diziler, 1 ila 5 nükleotid uzunluğunda olabilen birbirini tekrar eden dizilerdir. Bu diziler ökaryotik genom içerisinde dağınık bir şekilde bütün genom içerisinde bulunurlar. Bu dizilerin replikasyon sırasında azalmaları veya artmaları genom içerisinde varyasyona neden olarak biyoçeşitliliği etkiler. Bu dizilerdeki mutasyonları hedef alan seçici PCR ve jel elektroforezi sonrasında elde edilen bantlar ile çeşitliliğin tayini yapılır (Schlotterer ve Tautz, 1992).

1.1.1.2 Tür Çeşitliliği

Sistemik bilimi; farklı taksonların oluşturulması, taksonlar arasındaki ilişkilerin incelenmesi, taksonlara uluslararası alanda kabul edilen isimlerin verilmesi ve takson içindeki organizmaların sınıflandırılması açısından önemlidir. Buna bağlı olarak, biyoçeşitliliğin tanımlanması ve nitelendirilmesi açısından da önemi büyüktür.

Önceki bölümlerde incelendiği gibi, tür çeşitliliğinde sistemik biliminin sınıflandırdığı şekliyle farklı taksonomik seviyeler bulunmaktadır. Bu hiyerarşide tür evrensel olarak kabul gören en basit sınıf olarak kabul edilmiştir.

1.1.1.2.1 Tür Çeşitliliğinin Tarihçesi

Fosil kayıtları bize sadece tarihi devirler ve jeolojik zamanları araştırmamızda değil, aynı zamanda türlerin çeşitliliği hakkında bilgiler sağlaması açısından da oldukça önemlidir. Örneğin biyoçeşitliliğin arttığı dönemler veya toplu yok oluşlar sonrasında çeşitliliğin azaldığı dönemleri sadece fosil kayıtları yardımıyla öğrenebilmekteyiz.

Fosil kayıtlarının sunduğu bilgilere göre, “paleozoik” ve “erken mezozoik” dönemlerinde çok az olan tür sayısı, 100 milyar yıl kadar sonra birden artmaktadır. Bu patlamaları, fosil kayıtları bize 3 jeolojik dönem halinde açıklar:

Yarım milyar yıl kadar önce gerçekleşen “Kambriyen patlaması”, daha sonra 60 milyon yıl önce gerçekleşen “Circapatlaması” ve “Triassiriapatlaması” ile modern bitkilere doğru giden evrimleşme sürecinin ilk aşamasıdır. Son patlamadan sonra evrimsel süreç içerisinde ilk karasal bitkilerin “Silüryen” döneminde çıktığı kabul edilmektedir (Niklas ve ark., 1985). Vasküler bitkilerin evrimleşmesi ise, “Devoniyen” dönemine rastlamaktadır ve daha sonraki evrelerde ise tohumla üreme başlar.

Yukarıda anlatıldığı şekilde çeşitlenmeye başlayan bitki türleri, sistemik biliminin de yardımıyla farklı hiyerarşik düzenlere ayrılmaktadır (Krishnamurthy, 2003):

- **Yosunlar:** Yaklaşık 14.000-16.000 yosun türü bilinmektedir. Bunların 8000 - 9000 kadarı karayosunu, 6000-7000 kadarı ise koyun otudur. Toplam yosun tür sayısının 30.000 civarında olduğu tahmin edilmektedir.

- **Eğreltiotu:** Eğreltiotları vasküler sisteme sahip olan kara bitkileridir ve gimnosperm ve angiospermle birlikte yeryüzünde en baskın olan bitki grubunu oluştururlar. Çoğu tropik ormanlarından kökenlenen yaklaşık 15.000 eğreltiotu türü bilinmektedir.
- **Gimnosperm:** Gimnospermilerin çoğu ağaç formunda, geri kalanları ise çalı formundadır. Bunlar arasında *Welwitschia mirabilis* ne ağaç, ne çalı, ne de ot olarak tanımlanır. Bu bitki gerçek anlamda bir gövdeye sahip değildir, tersine çok kalın bir kök sistemi ve toprağın hemen üstünde bitkinin yaşamı boyunca büyüyen hayatta kalan birkaç yaprak içerir. *W. mirabilis*'e ek olarak bu grupta yaklaşık 500 konifer türü, 140 cycads (hint irmiği) türü ve 71 gnetales türü bulunmaktadır. Gimnospermelerde keşfedilecek tür sayısı çok fazla değildir. Çin orijinli ve endemik bir tür olan *Ginkgo biloba* yaşayan bir fosildir. Koniferler tüm dünya genelinde bulunur, ancak özellikle tropik bölgelerin ılıman iklimli bölgelerinde ve Alplerde baskın durumdadır.
- **Angiosperm:** Angiospermiler oldukça büyük bir vasküler bitki grubunu oluştururlar. Yaklaşık 235.000-300.000 tür bilinmektedir ve 500.000 türün daha bulunduğu tahmin edilmektedir. İlk kez yaklaşık 35 milyon yıl önce ortaya çıkan angiospermiler jeolojik tarihte en yeni olan bitki grubudur. Buna karşılık, çok kısa bir sürede, muhtemelen yüksek evrim yetenekleri sayesinde, en baskın bitki grubu halini almıştır. Yiyecek ve diğer bitkisel ihtiyaçların büyük bir çoğunluğu angiospermiler tarafından karşılanmaktadır.

1.1.1.3 Ekosistem Çeşitliliği

Çeşitliliği ekosistemler düzeyinde incelemek, iç içe geçmiş biyotik ve abiyotik etkenlerin birbirleri ile olan dinamik etkileşimlerin doğurduğu belirsizlik yüzünden oldukça zordur (Primack, 1992; Loreau ve ark., 1995). Ayrıca ekosistemlerin küresel olarak sınıflandırılmasındaki eksiklikler de, ekolojik çeşitliliğin sınıflandırılmasını zorlaştırmaktadır. Ancak genel olarak ekosistemleri şu sınıflara ayırabiliriz (Krishnamurthy, 2003):

- **Tropikal Yağmur Ormanları:** Tropikal yağmur ormanları Yeni Dünya' da Güney Meksika'dan Brezilya'nın doğu kıyılarına kadar ilerler. Afrika kıtasında tropikal yağmur ormanları sadece Gine kıyılarında, Zaire bölgesinde ve Madagaskar'ın doğu bölgesinde bulunur. Asya kıtasında Doğu

Himalayalar'da, Güneybatı Hindistan' da, Sri Lanka, Malezya, Endonezya, Filipinler, Tayland ve Yeni Gine' de bulunur. Avustralya' da sadece Doğu kıyılarda ince bir hat halinde bulunurlar. Tropikal yağmur ormanları dünya yüzeyinin sadece %6-7 kadarını ve tahminen yaklaşık 9.350.000 km²'lik bir alanı kaplar ve geniş yapraklı ve her daim yeşil olan ağaçlar gibi bilinen bitki türlerinin %50' sinden fazlasına (yaklaşık %90) ev sahipliği yapar. Bu ormanlar ayrıca 37.000' den fazla türle, endemik tür açısından da oldukça zengindir. Yağmur ormanları olarak bilinseler de, en fazla yağış alanları bile, yılda bir veya birkaç ayı kurak geçirirler ve ayda 100 mm' den daha az yağmur alırlar. Sadece Malezya ve Endonezya' da yağmur ormanlarının büyük bir kısmı her zaman yağış alır. Yağmur ormanlarındaki biyoçeşitlilik sadece toplam ortalama yağış miktarındaki değişikliklerden değil, lokal yağış değişikliklerinden de etkilenir.

- **Ilıman Ormanlar:** Genellikle Kuzey yarımkürede, Avrupa, Doğu Asya, Kuzey Doğu Amerika, Kuzey ve Güney Amerika'nın Pasifik kıyıları, Yeni Zelanda adaları ve Tazmanya' da bulunurlar. Kışın yapraklarını döken ağaçlar baskındır, daha az oranda da her daim yeşil olan geniş yapraklı ağaçlar ve koniferler bulunur. 1200' den fazla ağaç türünün bu ormanlarda bulunduğu bilinmektedir, bunun büyük bir çoğunluğu da Doğu Asya' da bulunur.
- **Kurak ve Yarı-kurak Ekosistemler:** Bu ekosistemdeki biyolojik çeşitlilik nispeten fakirdir ve alınan su miktarına göre değişiklik gösterir. Belirli bir zamanda, belli bir alandaki çeşitliliğin ve toplam tür çeşitliliğinin belirlenmesi bu yüzden oldukça zordur.
- **Kuzey Kutbu ve Dağlık Ekosistemler:** Bunlar ağaçtan yoksun olan, soğuk hâkim olduğu ekosistemlerdir. Dünya üzerindeki karasal alanların %8' ini kaplarlar, bunların %5' i Kuzey Kutbu, %3' ü ise dağlık bölgelerdir. Bu ekosistemler dünya florasının sadece %4' ünü oluşturur ve bunun 1500 türü Kuzey Kutbunda, 10.000'i ise dağlık bölgelerdedir.
- **Çayırlar:** Dünya üzerindeki karasal alanların yaklaşık %25' ini kaplayan çayırlar zaman zaman kuraklıkla karşılaşılacak doğal ekim alanlarını oluştururlar. İnsan kaynaklı etkenlerden önce çayırların yaklaşık %40' lık bir alanı kapladığı tahmin edilmektedir. Doğal (ağaç büyümesinin adaptasyon zorlukları veya iklimsel değişiklikler nedeniyle, doğal olarak baskılandığı ekosistemler),

yarı-doğal (bitki örtüsünün insan eliyle ekilmediği ancak tür çeşitliliğinin insan aktivitesinden etkilendiği ekosistemler) ve yapay (bitki örtüsünün insanlar tarafından tohumla ekilerek oluşturulduğu ekosistemler) olarak sınıflandırılan çayır ekosisteminde ot ve ot benzeri türler baskındır, ancak bazı bölgelerde ağaçlar ve çalı benzeri türler de bulunur. Çayırlardaki biyoçeşitliliğin sınırlanmasından kuraklık, yangın ve otobur saldırıları sorumludur.

- **Deniz Ekosistemleri:** Denizler yeryüzünün %71' ini kaplasa da, deniz ekosistem çeşitliliği ne yazık ki çok fazla bilinmemektedir. Bunun başlıca nedenleri karmaşık biyocoğrafik yapısı, müdahale edilememesi ve içsel hareketlerinin gözlemlenmesindeki güçlülüdür. Deniz üç boyutludur ve karaya göre çok daha dinamiktir. Dolayısıyla, ilke olarak her deniz canlısı deniz ekosisteminin her bir bölgesine ulaşım yerleşebilir. Yine de 49 büyük deniz ekosistemi tanınmakta ve bunlar 20.000 kadar deniz bitkisine ev sahipliği yapmaktadır.
- **Agroekosistemler:** Agroekosistemler insanların belirli türleri seçerek doğal bitki örtüsü yerine bunları ekmesiyle oluşmuştur. Dolayısıyla yapay ekosistemlerdir ve insan aktivitelerine bağlı olarak tür çeşitliliği gösterirler ve bu çeşitlilik oldukça sınırlıdır.

1.1.2 BİYOÇEŞİTLİLİĞİN KAYBI

Bir önceki bölümde bahsedildiği gibi biyoçeşitlilik üç farklı düzeyde incelenebilmektedir: (i) Gen, (ii) Tür ve (iii) Ekosistem çeşitliliği. Bu üç farklı organizasyon seviyesinin birbiri ile hiyerarşik olarak bağlantılı olduğu anlatılmıştı. Doğal olarak, biyoçeşitliliğin kaybı da bu üç farklı organizasyon seviyesinin birbirleri ile etkileşimleri ile olmaktadır.

1.1.2.1 Genetik Çeşitliliğin Kaybı

Genetik çeşitliliğin kaybı bir türe ait tüm gen havuzunun ve o havuzu oluşturan popülasyonun kaybı ile gerçekleşir. Genetik çeşitliliğin kaybından aşağıdaki etkenler sorumludur:

- **Kurucu etkisi:** Bu etki bir popülasyon içerisindeki bir bireyin kendi, orijinal popülasyonundan ayrılarak başka bir popülasyon kurması ile gerçekleşmektedir. Bu yeni oluşan popülasyonunda gen havuzuna aldığı kaynak eski popülasyondan kopan bireyler olmaktadır. Eğer ku-

rucu bireyler köken aldıkları popülasyondaki gen havuzunun tamamını temsil edemiyorlarsa yeni kurulan popülasyondaki gen havuzu da eski popülasyondan farklı ve daha sınırlı olacaktır. Bu da eski popülasyonun genetik çeşitliliğinin kaybı ile sonuçlanır.

- **Demografik darboğaz:** Büyük popülasyonların ani ciddi küçülmesi şeklinde açıklanabilen bu etken sonucunda, yeni popülasyon sadece yaşanan ani küçülmeye dayanabilen bireylerle oluşacağından, orijinal popülasyona ait sınırlı sayıda birey içerir. Hayatta kalan bu bireyler gen havuzunun hepsini temsil edemeyecekleri için bu süreç içerisinde eski popülasyona ait gen havuzu daralır. Böylece genetik çeşitlilik azalır.
- **Genetik kayma:** Bu etki popülasyonun içindeki herhangi bir genin frekansındaki değişikliklerle ortaya çıkar. Yukarıda anlatıldığı gibi, eğer popülasyonda bir azalma gerçekleşmiş ise çeşitliliği sağlayan farklı alleller yok olur ve bunun sonucunda heterozigotluk azalırken homozigotluk artar ve genetik çeşitliliği sağlayan çekinik alleller gen havuzundan silinir. Genetik kaymanın gen çeşitliliğinin kaybolmasındaki temel etken olduğu düşünülmektedir.
- **Akrabalar arası çaprazlama:** Akrabalar arası çaprazlama, aynı atalara sahip bireylerin çaprazlanması şeklinde tarif edilir. Bunun sonucunda gen frekanslarında ve ortalama karakter sayısında azalmalar gerçekleşir ve bu da popülasyon büyüme hızının azalması, fertilitede düşüş ve hayatta kalma oranında azalma gibi sonuçlar doğurur.

1.1.2.2 Tür Çeşitliliğinin Kaybı

Tür çeşitliliğinin kaybı doğal bir süreçtir. Fosil ve tarihsel verilerden elde ettiğimiz kadarı ile tüm türler belirli bir yaşam süresine sahiptir. Tahminlere göre her yüz milyon yılda bir tür yok olmaktadır. Bu yok olmaları açıklamak için farklı araştırmacılar türler arası rekabet, iklim değişiklikleri, ölümcül genlerin birikimi, akrabalar arası çaprazlanma stresi gibi farklı teoriler ortaya atmıştır.

Bir türün yok olması iki şekilde açıklanabilir. İlki; türlerin tarih sahnesinden tamamen silinmesini tanımlayan “gerçek yok oluş”, diğer tanım ise, türlerin tarihsel alanda sadece izlerinin bulunamaması veya doğada evrimsel süreç içerisinde farklı kollara bölünmesini açıklayan “yalancı yok oluş”.

1.1.2.2.1 Tür Çeşitliliğinin Kaybolmasından Sorumlu Süreçler

Türlerin kaybında, kayba neden olan etkinin rastgele olup olmadığına bağlı olarak 2 farklı süreç bulunmaktadır.

Rastgele olmayan etkiler: Ormanların kesilmesi, habitatların parçalanması gibi belirlenebilme şansı olan, insan kaynaklı etkilerdir. Bu olaylarda bir popülasyon parçalanabilir veya tamamen ortadan kalkabilir. Ayrıca, bu etki sonucunda güçlenen yeni bir popülasyon yerel popülasyonu baskılayarak yok olmasına neden olabilir.

Önceden belirlenemeyen rastgele etkiler: Doğal dinamiklerin işin içine daha çok karıştığı bu süreçte, etkiler önceden tahmin edilememektedir:

- Nüfus belirsizliği: Popülasyon büyüklüğü hayatta kalma şansı açısından en temel etkidir (Lande ve Barrowclough, 1987). Araştırmalar 100 bireyden daha az olan bir popülasyonun soyunu devam ettirebilme şansının oldukça düşük olduğunu göstermiştir. Yani küçük popülasyonlar yok olmaya daha yakındırlar.
- Çevresel belirsizlikler: İklimlerdeki ani değişiklikler, besin kaynaklarının azalması, hastalık ve zararlıların yaygınlaşması, rekabetin artması gibi çevresel etkenler tür çeşitliliğinin kaybolmasında önemlidir (Shaffer, 1987).
- Doğal felaketler: Sel, fırtına yangın kuraklık gibi doğal felaketler de tür çeşitliliğini etkiler. Bunlar genellikle çok kısa sürer, ancak etkisi oldukça büyük olur.
- Genetik belirsizlik: Genomda meydana gelen rastgele değişiklikler ve mutasyonlar da tür kaybına neden olur.

Rastgele ve Rastgele olmayan etkenler, birlikte veya tek başlarına çalışarak, türlerin çeşitliliğini etkilemektedirler.

1.1.2.2.2 Türlerin Doğadaki Durumlarına Göre Sınıflandırılması

Türlerin kaybolma tehlikesi ile karşı karşıya olması ve azalması ile ilgili sorunlar 1992 BM konferansında geniş olarak tartışılmıştır. Sonuçta IUCN (International Union for Conservation of Nature) (1995) kırmızı kategorileri oluşturulmuştur. Buna göre:

1- Kaybolma Tehlikesi Taşıyan Türler:

- Nesli tükenmiş/Yok Olmuş (Extinct, EX): Son 50 yılda yabani formda bulunmayan, ancak tarımsal yöntemlerle (kültürlemelerle) nesli devam ettirilen türlerdir. Bununla beraber, bu türler ancak kültürde yaşatılabildikleri için çoğu araştırmacı “doğada yok olmuş” (EW, Extinct in the Wild) tanımının kullanılmasının daha uygun görmektedir (Koopwitz ve Kaye, 1990).
- Nesli tükenme tehlikesi taşıyan türler (Endangered, EN) : Kısa bir süre içerisinde (birkaç on yıl) doğadaki yabani formlarının yok olacağı öngörülen türlerdir. Bu gruba birey sayısı kritik sayıda azalmış ve/veya habitatları ciddi bir şekilde zarar görmüş/azalmış taksalar girer.
- Kaybolma eğiliminde olan türler (Vulnerable, VU) : Olumsuz şartlar devam ettiği takdirde, yakın bir gelecekte nesli tükenme tehlikesi taşıyan türler grubuna gireceği öngörülen türlerdir. Bu gruba, popülasyonları çok fazla dağılan, habitatları şiddetli bir şekilde bozulan veya popülasyonlarının çoğu veya tamamının boyutunun küçüldüğü taksalar girer.
- Nadir bulunan türler (Rare, R) : Sadece belli bir coğrafik bölgede veya habitatta, küçük, yerel bir popülasyon olarak bulunan türlerdir. Şu anda kaybolma riski olmasa da insan eliyle ve/veya doğal etkenlerle habitatlarının tahrip edilmesi durumunda bir üst tehlike seviyesine dâhil edilebilirler.
- Tanımlanmamış (Indeterminant, I) türler: Bu gruptaki türler, kaybolma riski veya eğilimi taşıyan veya nadir bulunan türleridir, ancak bu sınıflardan hangisine yerleştirilmesi gerektiğinin belirlenebilmesi için daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır.

2- Durumu Bilinmeyen Türler:

- Yeterince bilinmeyen türler (K): Yukarıda anlatılan kategorilerden birine dahil olduğundan şüphelenilen, ancak bilgi eksikliği nedeniyle henüz belirlenmemiş olan türlerdir.
- Belirsiz türler (?, Status Unknown): Bu türler hakkında herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.
- Aday (Candidate, C): Yukarıda tarif edilen kategorilerden birine dahil olduğundan şüphelenilen ancak hala incelenmekte olan türler bu gruba girer.

3- Tehlikede Olmayan Türler:

- Güvenli veya kaybolma riski taşımayan türler (Not Threatened, NT): Yok olma tehlikesi içermeyen türleri tanımlayan sınıftır.

1.1.2.3 Ekosistem Çeşitliliğinin Kaybı

Ekosistem çeşitliliği hem tür hem de genetik çeşitliliğin kaybına yol açmaktadır. Hem tahmin edilebilir hem de tahmin edilemeyen etkenler ekosistem çeşitliliğinin kaybına yol açar.

Aşırılık (bilimsel veya endüstriyel nedenlerle koleksiyonların kontrolsüz birikimi ve bitkilerin öldürülmesi), habitat yıkımı (tarım, bina yapımı, yol veya baraj yapımı, endüstriyel gelişme, sucul alanların doldurulması, turizm gibi organize yürütülen arazi dönüştürme işlemleri), yayılmacı türlerin ekosisteme girmeleri (yayılmacı türler ve zararlılar) ve ikincil kayıplar bu sonuca yol açmaktadır.

Bununla beraber, ekosistem çeşitliliğinin kaybındaki en önemli etken ekosistemin parçalanmasıdır. Parçalanma sonucunda, her biri farklı çevresel şartlara sahip olan, yapay karasal adalar oluşur. Parçalanma ayrıca yabancı türlerin göç edip yerleşmesini de teşvik eder ve bu genellikle kalıcı olup, doğal türlerin yaşamını olumsuz etkiler. Parçalanmanın en büyük etkisi büyük popülasyonların küçük popülasyonlara bölünmesi ve yaşama yeteneklerinin, birey sayılarındaki azalma nedeniyle, düşmesi ile gerçekleşir.

1.1.3 BİYOÇEŞİTLİLİĞİN KORUNMASI

Biyçeşitliliğin korunması en basit tanımla “Biyçeşitliliğin dış etkilere karşı sürdürülebilir bir şekilde korunması” anlamına gelmektedir (Virchow, 1998).

“Birinci Dünya Koruma Stratejisi” konferansında biyçeşitliliğin korunması adına şu şekilde bir tanım yapılmıştır:

“Biyosfer üzerindeki insan etkinliğinin düzenlenmesi ve böylelikle şimdiki nesillerin ihtiyaçları en yüksek verimde karşılanırken gelecek nesillerin ihtiyaçlarının da gözetilmesi ve doğanın sürdürülebilir bir şekilde kullanımının sağlanmasıdır (IUCN 1980).”

Modern koruma biyolojisi, köklerini 1973 yılında San Diego Vahşi hayvan parkında düzenlenen, “Uluslararası Koruma Biyolojisi” Konferansında almıştır. Ardından 1985’li yıllarda da Koruma Biyolojisi topluluğu kurulmuştur (Duthie, 1997).

Günümüzde koruma biyolojisi eskisine oranla daha farklı bir yaklaşım sergilemektedir. Eskiden sadece ekonomik öneme sahip ve yüksek verim veren türler korunurken, şimdi biyçeşitlilik bir bütün olarak ele alınmakta ve türlerden çok ekosistemlerin korunmasına öncelik verilmektedir (Meffe ve Carroll 1994).

Daha önceki bölümlerde Biyçeşitlilik 3 temel seviyeye ayrılmıştı: (i) genetik çeşitlilik, (ii) tür çeşitliliği ve (iii) ekosistem çeşitliliği. Biyçeşitliliğin korunması da bu 3 seviyenin her birinde uygulanabilmektedir. Ancak tür çeşitliliğinin kaybı diğer seviyelere göre daha iyi karakterize edilebilmektedir. Bu yüzden biyçeşitliliğin korunmasında daha çok tür çeşitliliğinin korunmasına öncelik verilmektedir.

1.1.3.1 Genetik Çeşitliliğin Korunması

Genetik çeşitliliğin korunmasında üç temel hedef bulunmaktadır:

- Canlı popülasyonun kısa bir süre içerisinde yok olmasını engellemek
- Popülasyona adaptif yetenekler kazandırmak
- Popülasyonun yaşama kabiliyetini sürdürmek

Ancak genetik çeşitliliği korurken dikkat etmemiz gereken önemli bir nokta vardır: Türlerin evrimleşmesinde ve yeni koşullara adaptasyonunda, genetik varyas-

yonların önemi büyük olmaktadır. Dolayısıyla genetik çeşitliliğin korunması, varyasyonların da etkin bir şekilde korunmasını gerektirmektedir.

1.1.3.2 Tür Çeşitliliğinin Korunması

Biyoçeşitliliğin korunmasındaki en temel ögenin tür çeşitliliğinin korunması olduğu kanıtlanmıştır. Çünkü tür çeşitliliğinin kaybı gen veya ekosistem çeşitliliğine oranla daha kolay tespit edilebilir ve sayısal verilere dökülebilir. Hatta ekosistem çeşitliliğinin korunmasında bile tür çeşitliliğinin korunması temel alınmaktadır (Meffe ve Carol, 1994).

Tür çeşitliliğinin korunmasında öncelikle yok olma tehlikesi yüksek olan türler ön sırada tutulur. Nadir bulunan endemik türler öncelikli olarak korunurlar. Bunu tarımsal açıdan önemi bulunan tahıl bitkilerinin korunması takip etmektedir.

1.1.3.3 Ekosistem Çeşitliliğinin Korunması

Bu koruma stratejisinde ekosistemin tamamen korunması amaçlanmaktadır. Bu da korunmuş alanlar gibi bölgelerde kullanılabilir. Önemli olana nokta yüksek derecede endemik tür barındıran “Sıcak Bölge” ekosistemlerinin korunmasına öncelik tanınmasıdır.

1.1.3.4 Koruma Stratejileri

1.1.3.4.1 *In Situ* Koruma Yöntemleri

Türlerin içine bulundukları ekosistem ile birlikte korunmalarına *in situ* koruma stratejisi adı verilmektedir. Bu stratejide türler evrimsel baskı, doğal tehditler, patojenler gibi dış etkenlere açıktırlar ve bu nedenle, dinamik bir koruma stratejisi olarak da tarif edilmektedir (Frankel ve ark., 1995). Burada temel olan; belirli bir ekosistemin sınırları belirlenmiş olan alanlarda korunmasını sağlamaktır. 1994 IUCN kategorilerine göre korunmuş alanlar şu şekilde tanımlanmıştır (IUCN, 1994):

“Biyolojik çeşitliliğin korunması ve sürdürülebilir bir biçimde kullanılması için kanunlarla belirlenmiş sınırlar içinde ayrılan kara veya deniz parçasıdır.”

Korunmuş alanlara örnek vermek gerekirse; Bilimsel rezervler, Ulusal parklar, Doğal anıtlar, Korunmuş doğal rezervler, Vahşi yaşam parkları, Biyosfer rezervleri, Dünya mirası alanları bu koruma stratejisinin kapsamı içerisinde yer almaktadır.

Günümüzde, Dünya yüz ölçümünün % 8,2'si veya yaklaşık 9,25 milyon kilometre karelik alanda, 1508 tanesi Ulusal park olan 9832 tane korunmuş alan bulunmaktadır. IUCN tarafından seçilen hedef ise, Dünya yüzeyinin %10- 12' ini kapsayan 13 milyon kilometre karelik alana sahip en önemli temel ekosistemlerin korunmasıdır.

1.1.3.4.2 *Ex Situ* Koruma Yöntemleri

Diğer koruma stratejisi ise, türleri bağlı bulundukları ekosistemin dışında bir yerde korumayı tarif eden *Ex-situ* koruma yöntemidir. Bu stratejide türler; dış etkenlere olabildiğince kapalıdırlar ve bu yüzden de statik bir koruma yöntemi olarak tarif edilir (Frankel ve ark. 1995). *Ex-situ* koruma stratejisi son zamanlarda, *in situ* yöntemlere ek olarak geliştirilen bir strateji olarak önem kazanmaya başlamıştır (Heywood, 1990).

Çeşitli *ex-situ* koruma yöntemleri aşağıdaki gibidir:

Germplazma Bankaları ve Koleksiyonları: Germplazma koleksiyonları *in vivo* veya *in vitro* olarak saklanan kültüre alınmış taksaların ve bunların yabani formlarının örneklerini içerir. Saklanan örnekler bitki yetiştiricileri, taksonomistler, ziraat mühendisleri, fitopatologlar vb tarafından deney materyali olarak kullanılır.

Germplazma koleksiyonları ilk olarak 19 YY.' da Paris' te Philippe de Vilmorin tarafından buğdayın korunması için kullanılmıştır. Bunu İngiltere, Almanya, İsveç ve Avustralya'da çeşitli tahılların korunması amacıyla oluşturulan germplazma koleksiyonları takip etmiştir. Ancak ilk profesyonel germplazma bankası ise 1920-1930' lu yıllarda N. I. Vavilov tarafından kurulmuştur (Vavilov, 1949-1950).

Bu yöntem ile günümüzde, 80 farklı taksona ait 6,2 milyon farklı hat 131 ülkede bulunan 1320 germplazma bankasında saklanmaktadır (FAO, 1996). Bunların yaklaşık %7' si çetlik, %5' i mısır, %75' i ise diğer ürünlerdir.

Botanik Bahçeleri: Botanik bahçeleri en kaba tanımla türlerin eğitim, peyzaj veya bilimsel kullanım amacıyla belirli bir toprak parçası üzerinde korunmasıdır. İlk botanik bahçesinin kuruluşu 7. YY' da Hindistan' da kurulan tapınak bahçelerine dayanmaktadır. Bunu 14. YY' da Avrupa'daki ortaçağ bahçeleri takip etmektedir.

Avrupa'daki ilk kayıtlı botanik bahçesi ise 1545 yılında Padua Üniversitesinde İtalya'da kurulmuştur. 17. YY'dan itibaren aktif olarak kullanılan botanik bahçeleri, pek çok faydalı bitkinin dünya üzerinde hareketine olanak sağlamıştır. Şu anda sadece Avrupa'da 540 tane botanik bahçesi bulunmaktadır (Given, 1996). Orkideler, sukkulent bitkiler, bromeliadlar, soğanlı bitkiler ve ılıman iklim ağaçları botanik bahçelerinde en sık rastlanan bitki gruplarıdır. Buna karışılık tropikal ağaçlar, epifitler, etobur bitkiler ve palmiyelere nadiren rastlanır.

Botanik bahçeleri, kullanım alanları ve bitki germplazmasının kıtalararasında hareketini sağlaması açısından en önemli *ex-situ* koruma yöntemlerinden birisidir.

Tohum Bankaları: Tohum bankaları gelecek nesiller için türlerin tohumlarının kontrollü koşullar altında (genellikle %5-7 tohum nem içeriği ve 18°C'nin altındaki sıcaklıklarda) canlılıklarını kaybetmeden saklanmalarını amaçlar. Dolayısıyla tohum ile üreyen bitkiler açısından en önemli koruma stratejisini teşkil etmektedir. Tohum bankalarında, metabolik süreçler en alt seviyeye indirildiğinden, hem genetik kararlılığın korunmasına hem de germplazmanın uzun bir süre boyunca saklanmasına olanak sağlar. Ancak bu bankalarda, nem içeriği %7 seviyesine kadar indirilebilen ortodoks (desikasyona toleranslı) tohumlar korunabilir. Yeterli derecede desike edilmiş ortodoks tohumlar genetik değişikliğe uğramadan uzun yıllar boyunca saklanabilmektedir (Roberts, 1975, 1989). Yarı-ortodoks tohumlar ise kısmen desike edilerek saklanabilirler ama çok düşük nem içeriklerinde canlılıklarını kaybederler. Bu yüzden Ortodoks tohumlara göre görece daha yüksek nem içeriğinde saklanmaları gerekir. Recalcitrant olarak tanımlanan, desikasyona çok hassas tohumlar ise bu yolla saklanamazlar.

Test Tüpü Gen Bankaları: Tohum üretmeyen kısa ömürlü ve yumru çiçek/bitki soğanı, rizom veya köklerle çoğaltılan bitkiler ile vejetatif olarak üretilen, uzun ömürlü ağaç ve çalıların saklanması bu yolla olmaktadır.

Polen Bankaları: Polenlerin kontrollü koşullar altında saklandıkları polen bankaları, hibritleme, çaprazlama gibi çalışmalar için büyük önem arz etmektedir. Ancak ne yazık ki bu yöntemle sadece paternal materyalin saklanması mümkün olmaktadır. Bu yöntemin bir diğer sınırlılığı da polenlerin uzun süreli saklanması sağlayacak yöntemlerin henüz geliştirilmemiş olmasıdır.

Tarla Gen Bankaları: Belirli bir türün *ex-situ* olarak saklanması en önemli yollardan biri de tarla gen bankalarıdır. Tarla gen bankalarında türler belirli bir toprak parçası üzerinde aktif olarak saklanmaktadır. Yöntemde genetik çeşitliliğin korunabilmesi için, koleksiyonlar mümkün olan en fazla bitki sayısına sahip olmalıdır.

DNA Bankaları: DNA bankalarında türlerin genetik bilgileri saklanmaktadır (Peacock, 1989; Adams ve ark., 1994). Bu koruma yöntemi 3 şekilde gerçekleştirilir:

- Total genomik DNA saklanması
- DNA kütüphaneleri oluşturulması
- Klonlanmış DNA fragmentlerinin saklanması

Örneklerin bu şekilde saklanması oldukça kolaydır, dondurma işlemini takiben periyodik bakım ve yenileme gerektirmez. Ancak DNA örneklerinin hazırlanması yüksek teknik bilgi gerektirir.

In-vitro Yöntemler: Bu koruma stratejisi diğer koruma stratejilerine oranla çok yaygın olarak kullanılmaktadır ve çok önemli uygulama alanlarına sahiptir. Bu stratejide temel olarak bir sonraki bölümde bahsedilecek olan “Bitki Doku Kültürü” yöntemleri kullanılmaktadır. Birçok *in-vitro* yöntem, patojen saldırılarına kapalı olması, düşük maliyet ve kısıtlı bir alanda saklamaya olanak sağlaması açısından diğer yöntemlere göre daha avantajlı olmaktadır (Whiters, 1989).

1.2 BİYOÇEŞİTLİLİĞİN BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE KORUNMASI

1.2.1 BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ

Bitki Doku Kültürü; bitkilerden alınan eksplantların, steril ve kontrollü koşullar altında, yapay besi ortamında çoğaltılması ve bu yolla yeni bitkisel dokuların veya ürünlerin elde edilmesi olarak tanımlanabilmektedir (Haberlant, 1902; Thorpe, 1990).

1.2.1.1 Tarihçe

Bitki doku kültürünün teorik temelleri ilk olarak 1902 yılında Haberlant tarafından atılmıştır. Haberlant, izole edilmiş yaprak fotosentetik hücrelerinin kontrollü koşullar altında herhangi bir doku veya organı oluşturulabileceği teorisini ortaya atmış ve böylece “**Totipotensi**” kavramını tanımlamıştır. Ayrıca istenirse, herhangi bir vejetatif bitki parçasından, yapay embriyoların elde edilebileceğini de öne sürmüş olan Haberlant bitki doku kültürünün babası olarak kabul edilmektedir (Haberlant, 1902, 1903). Bu çalışmaların başka bir sonucu da, çok hücreli organizmalarda hücrelerin birbirleri ile olan etkileşimlerine ışık tutmasıdır.

Haberlant'ın ardından farklı araştırmacılar çalışmalara devam etmiştir. F 1934 yılında domates bitkisinin kök ucundan meristem kültürleri elde etmiş ve bunu *Asparagus*, *Tropaeloum malus* L. ve *Lupinus albus* L. bitkilerden elde edilen gövde ucu kültürleri de takip etmiştir (Loo, 1945; Ball, 1946). Çalışmalarının sonucunda Gautheret ilk gerçek bitki doku kültürü sistemini, *Acer pseudopplantanos* bitkisinin kambiyal dokularından elde etmiştir (Gautheret, 1934).

Takip eden çalışmaların arasında Gautheret' in agarla katılaştırılmış glikoz ve sistein hidrolizati içeren Knop çözeltisini besiyeri olarak kullanarak *Robinia pseudoacacia*, *Salix capreae* ve *Ulmus campastreae* bitkilerinin eldesi (Gautheret, 1934; Gautheret, 1935) ve White tarafından *Nicotiana glauca* X *Nicotiana langsdorffii* hibridinden elde edilen kallus kültürleri sayılabilir. Özellikle *Nicotiana glauca* X *Nicotiana langsdorffii* kültürünün oksine ihtiyaç duymaması bu kültürün sınırsız bir şekilde çoğaltılabilmesini sağlamıştır (Gautheret, 1939; Nobecout, 1939; White, 1939).

Bu arada besiyeri formulasyonlarında da gelişmeler yaşanmıştır. 1940'lı yıllara kadar Knop' un 1865 yılında geliştirdiği besiyeri kullanılmıştır. Ancak, bitkilerin bu besiyerinde yeterli büyüme gösterememeleri ve farklı pH aralıklarında oluşan anormallikler nedeniyle yeni formulasyonlara ihtiyaç duyulmuştur. 1943 yılında White tarafından geliştirilen besiyeri 1960'lı yıllara kadar kullanılmış (White, 1943) ve bu süre içinde farklı araştırmacılar bitkilerin daha yüksek oranda mineral tuzlara ihtiyaçları olduğunu tespit etmişlerdir (Hildebrant ve ark., 1946; Heller, 1953). 1962 yılında, *Nicotiana tabaccum* kültürlerinin iyileştirilmesi için yapılan çalışmalar sonucunda, formüle edilebilen ilk besiyeri formulasyonu geliştirilmiştir (Murashige ve

Skoog, 1962). Bu besiyerinde, yüksek oranda inorganik tuzlar, myo-inositol, vitaminler ve kültürlerin canlılığını uzatmak için de kelator olarak demir bulunmaktadır. Doku kültürü ile yapılan öncü çalışmaların hepsinde farklılaşmamış meristem dokularından elde edilen kültürler kullanılmaktaydı. Skoog ve arkadaşlarının çalışmaları sonucunda kültür ortamına eklenen yüksek konsantrasyonlarda adenin ve fosfatların, meristematik olmayan dokularda da kök ve gövde farklılaşması oluşturabildiği gösterilmiştir (Skoog ve ark., 1948).

Kinetin' in keşfi (Miller ve ark, 1955) ile birlikte, kültürlerdeki oksin ve sitokinin dengesinin ayarlanmasıyla, kök ve gövde morfogenez de kontrol edilmeye başlanmıştır. Yüksek orandaki oksin/kinetin seviyeleri köklenmeyi teşvik ederken, bu oran kinetin lehine döndürüldüğünde kültürlerde gövde oluşumu hız kazanmıştır. Daha sonraki çalışmalarda ise, doğal olarak oluşan sitokininlere ek olarak, sentetik sitokininlerin de elde edilmesi ve apikal dominansının kırılması, mikroçoğaltım ve geniş ölçekli üretimin önünü açan bir etken olmuştur (Skoog ve Miller, 1957).

1.2.1.2 Totipotensi ve Morfogenez

“Totipotensi” terimi, tarihçe kısmında açıklandığı gibi, herhangi bir bitki hücresinin tüm bir bitkiyi verebilme yeteneği olarak tanımlanabilir. 1950' li yıllardan itibaren bu tanımlı desteklemek için çalışmalar yapılmıştır. Muir ve arkadaşları 1954 yılında tütünden elde ettiği farklılaşmamış tekil hücreleri, canlı kallus dokusunun üzerine koyarak (burada canlı kallus dokusu, farklılaşmamış hücreler için yardımcı kültür olarak kullanılmıştır) hücrelerin farklılaşmasını sağlamış tır. Bergmann (1959) ve Jones (1960) adlı araştırmacılar da aynı şekilde yaptıkları çalışmalarda benzer sonuçlara ulaşmıştır.

Morfogenez ise, farklılaşmamış dokuların veya hücrelerin, dışsal bir etki ile farklılaşarak istenilen dokuyu oluşturması olarak tarif edilebilir. Morfogenezin gelişimi ise, yukarıda anlatıldığı gibi Skoog tarafından yüksek oranda adenin ve fosfatların ilavesi ile gerçekleşmiştir. Ayrıca sitokininlerin keşfi ve bitki morfogenezinde oynadıkları rol sayesinde, istenilen doku çeşidi üretilebilir duruma gelmiştir. 2 temel morfogenez şekli bulunmaktadır. Morfogenez sırasında önce gövde ardından kök oluşuyorsa bu “organogenez” olarak adlandırılmaktadır. Bunun tam tersi olarak, embriyo oluşumu gerçekleşiyorsa, sürece “embriyogenez” denilmektedir (Thorpe, 1902).

Organogenez bitkilerde temelde 2 farklı yoldan teşvik edilebilmektedir: Doğrudan organogenez ve dolaylı organogenez. Doğrudan organogenez sürecinde eksplantlardan doğrudan adventitif gövdeler üretilebilir. Dolaylı organogenez sürecinde ise eksplantlardan öncelikle kallus (organize olmamış ince çeperli parankima hücrelerinin kitlesel topluluğu) oluşumu indüklenir. Ardından bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak, organogenez edilebilir. Ayrıca istenirse, kallus dokusunu içeren hücreler süspansiyon kültürü olarak da kullanılabilir. Organogeneze benzer bir şekilde, somatik embriyogenez de doğrudan vey kallus oluşumunu takiben olabilir.

Eğer eksplant olarak nodlar, gövde uçları ve meristemler kullanılıyorsa doğrudan organogenez indüklenebilir. Bunun sonucunda ise, meristem kültürleri, gövde ucu kültürleri elde edilebilir. Bu yöntemle aynı zamanda mikroçoğaltım da denmektedir. Bu yöntemde, sitokinin/oksin dengesinin artırılmasıyla kültürlerdeki aksiller tomurcuk oluşumunun uyarılması temel alınmıştır. Bu teknik günümüzde bitkilerin vejetatif yollardan çoğaltımı için sıkça kullanılmaktadır.

1.2.1.3 Bitki Doku Kültürünün Aşamaları

1.2.1.3.1 Germplazma Eldesi ve Eksplant Seçimi

Herhangi bir bitkinin doku kültürü kurulurken atılması gereken ilk adım, o bitkiye ait germplazmanın elde edilmesi ve o bitkiden kültüre alınacak en uygun eksplantın seçimidir.

Çalışmalar sonucunda eksplantın canlılığını belirleyen bazı faktörler olduğu anlaşılmıştır. Anaç bitkinin genetik yapısı, bu etkenler içersinde oldukça önemli bir yere sahiptir (Lynch ve ark., 1991). Ayrıca alınan eksplantın tipi ve büyüklüğü de, eksplantın rejenerasyonunun artmasında belirleyici bir yere sahiptir (Kameya ve Widholm, 1981; Atree ve Fowke, 1991; Reeves ve ark. 1983, 1995). Büyük eksplantların, küçüklere göre daha fazla rejenerasyon şansı bulunduğu açıklanmıştır (Al Mazrooei ve ark., 1997). Ancak küçük eksplant kullanmak da virüslerin eliminasyonu açısından daha avantajlıdır (Kartha, 1986). Ayrıca eksplantlar alınmadan önce bazı noktalara da dikkat edilmesi gerekmektedir. Mesela güçlü apikal dominansi bulunan bitkilerde, apikal meristemlerin alınması aksiller tomurcukların vereceği cevap açısından önem teşkil etmektedir.

Bitkilerin içinde bulunduğu ortam ve mevsimsel durum da eksplantın kontaminasyon derecesi açısından önemlidir. Çalışmalar sonucunda tarladan alınan bitkilerden elde edilen eksplantların, kontrollü koşullar altındaki bitkilerden alınan eksplantlara göre daha fazla kontaminasyon içerdiği tespit edilmiştir (Debergh ve Read, 1991). Benzer olarak, yağışlı mevsimlerde alınan eksplantların, kuru mevsimlere oranla daha fazla kontaminasyon içerdiği belirlenmiştir (Enjalric ve ark., 1988).

1.2.1.3.2 Sterilizasyon

Yüzey sterilizasyonu, herhangi bir bitkinin doku kültürünün başlatılması açısından hayati önem taşımaktadır. Çünkü bitkilerin yüzeyleri, ayrıca mikroorganizmalar için de bir yaşam alanı oluşturmaktadır (Campell, 1985). Ayrıca her bitki de kendisine ait bir mikroflora barındırabilmektedir (Cassells, 1991). Bitkiler özelliklerine ve kullanılan eksplanta bağlı olarak birçok farklı epifitik ve endofitik kontaminasyon içerebilirler. Eksplantlar doku kültürüne aktarılmadan önce bu kontaminasyonların temizlenmesi gerekmektedir.

Alınan eksplantın türüne göre, farklı sterilizasyon yöntemleri bulunmaktadır. Örneğin tohumlar dışsal etkilere dayanıklı eksplantlar oldukları için, dezenfektan maddelerle daha uzun süre etkileşebilirler. Ancak, gövde ucu, embriyo gibi eksplantlar sterilizasyon çözeltilerine karşı daha hassastır.

Dışsal kontaminasyonlar temizlense bile, epifitik kontaminasyonlar hala büyük bir sorun oluşturmaktadır. Yüksek sukroz ve tuz konsantrasyonları ve pH koşulları bu kontaminasyonları baskılamakta kullanılabilir. Ayrıca, besiyerine eklenecek antibiyotikler de kontaminasyonların baskılanmasında kullanılabilmektedir (Cassells ve ark., 1988).

Bir diğer endojen kontaminasyon etkeni de virüslerdir. Çalışmalar sonucunda virüs kontaminasyonlarının engellenmesinde en etkili olan yöntemlerin meristem kültürleri eldesi ve termoterapi olduğu gösterilmiştir. Virüslerin eliminasyonunda meristem kültürlerinin kullanılmasına Morel ve Martin öncülük etmiştir (1952). Bu teknikteki temel düşünce, meristematik bölgeyi oluşturan hücrelerin küçük olması ve dolayısıyla virüs içirme ihtimalinin düşük olmasıdır. Patates bitkisinde de bu teknik kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Green ve Lo, 1989). Ancak tüm virüsler bu yolla elimine edilememektedir. Meristem kültürleriyle birlikte ısı şoku uy-

gulasması virüs eliminasyonu açısından olumlu sonuçlar göstermiştir (Brown ve ark. 1988). Ayrıca kemoterapi de uygulanan başka bir yöntemdir. Bu yöntemde kültürlerle antiviral ajanların eklenmesi ile, virüs kontaminasyonu engellenmeye çalışılmaktadır (Cassells, 1987).

1.2.1.3.3 Besiyeri İçeriği

Besiyeri formülasyonlarında bitkilerin optimum gelişme için ihtiyacı olan bütün makro (azot, kükürt, fosfor, kalsiyum, magnezyum) ve mikro elementler (bakır, çinko, mangan, demir, molibden, klor), karbon kaynağı (sukroz, mannitol vb.), azot kaynağı (NH_4^+ ve NO_3^-), vitaminler (nikotinik asit, piridoksin, tiamin, myo-inositol), bitki büyüme düzenleyicileri (oksinler, sitokininler, absisik asit, giberellinler) ve katılaştırıcı maddeler (agar, gelrite gibi) bulunmalıdır. Önceki bölümlerde de anlatıldığı gibi, besiyeri formülasyonları zamanla değişime uğramıştır. İlk besiyerlerinde hindistanevizisi sütü, bitki artıkları, kül gibi maddeler bulunurken, zamanla formülasyonlar değişerek kimyasal açıdan tam olarak tanımlanabilen ve optimum gelişimi sağlayacak içeriğe sahip olmuşlardır.

Makro ve mikro elementler bitki gelişimi için en gerekli maddelerdir ve eksikliklerinde bitkilerde gelişim bozuklukları görülmektedir. Azot, bitkilerde protein sentezi için gerekli temel elementlerdendir ve bitki büyümesini sağlar. Kükürt ise amino asit sentezinde yardımcı olarak iş görmektedir. Fosfor kök gelişimi ve olgunlaşma için gerekliyken, kalsiyum da hücre duvarının sentezinde ve kök – yaprak gelişiminde etkin rol oynamaktadır. Magnezyum ise, klorofilin oluşumundaki en temel elementtir. Ayrıca bakır, çinko gibi diğer mikroelementler de hormon ve enzimlerin sentezinde, fotosentezde, meyve olgunlaşmasında işlev göstermektedirler.

Besiyeri formülasyonlarında azot kaynağı olarak, NH_4^+ ve NO_3^- iyonlarının konsantrasyonları etkili olmaktadır. Bu iyonlar hücre büyümesi ve farklılaşmasında kritik öneme sahiptirler (Grimes ve Hodges, 1990). Organik azot kaynakları varlığında, *Agrostis alba* kültürlerinin rejenerasyon yeteneğinin arttığı gözlemlenmiştir (Shetty ve Asano, 1991). Bununla beraber besiyerindeki yüksek konsantrasyonda azot kaynağının, kültürlerde genetik varyasyona neden olabildiği raporlanmıştır (Feng ve Quyang, 1988).

Karbon kaynağı ise genelde toplam besiyeri hacminin %2-5'i arasında kullanılmaktadır. Daha yüksek konsantrasyonlar, embriyogenezi teşvik etmek veya yavaş büyütme çalışmalarında kullanılmak için tercih edilmektedir. Ayrıca kültüre edilmek istenen bitkinin türüne göre sukroz konsantrasyonunun da optimize edilmesi gerekebilmektedir.

Daha önceki kısımlarda bahsedildiği gibi bitki büyüme düzenleyicileri, doku kültürü sistemlerinde morfogenez için en temel öğelerdir. Oksinler, hücre büyümesini, hücre bölünmesini, kallus ve kök oluşumunun indüklenmesini, vasküler farklılaşmayı ve apikal dominansiyi sağlarken; sitokininler bunun tam tersi olarak hücre bölünmesini, apikal dominansinin engellenmesini, aksiler proliferasyonu ve DNA replikasyonunu artırmaktadır. Bu yüzden aksiller proliferasyonu indüklemek için yüksek konsantrasyonlarda sitokinin ve düşük oranlarda oksin kullanılmaktadır (Lynch ve ark. 1991; Lubrano, 1992). Embriyogenik kallus oluşumunu uyarmak için besiyerine 2-4 di klorofenoksi asetik asit (2,4-D) eklenmelidir.

Doğal olarak bitki bünyesinde üretilen oksinler indol asetik asit (IAA), indol butirik asit (IBA) ve sentetik oksinler, 2-4 D, naftalen asetik asittir (NAA). Bu oksinlerden 2-4 D kallus oluşumunu uyarmak için kullanılmakta, NAA ise organogenezi teşvik etmek için kullanılır. Doğal sitokininler ise zeatin, 2-ip (2-izopentil adenin), dihidrozeatin, yapay olarak üretilenler ise, Benziladenin (BA), thidazuron (TDZ) olarak adlandırılmaktadır.

Giberellinler ise, temel olarak tohum çimlenmesi ve gövde uzamasını teşvik etmekte kullanılırlar. Etilen, bitki tarafından üretilen gaz formunda bir bitki büyüme düzenleyicisidir ve temel görevi meyve olgunlaşmasını sağlamaktır. Ancak bu gazın bitki doku kültürü sistemlerinde üretilmesinin, bitkilerin rejenerasyonuna olumsuz etki yaptığı da bilinmektedir.

1.2.1.3.4 Kültür Eldesinde Karşılaşılan Sorunlar

Kültür eldesinde karşılaşılan en önemli sorunlardan birisi, *in vitro* ortamda oluşması muhtemel olan somaklonal varyasyonlardır. Somaklonal varyasyonlar, bitki doku kültürü sistemlerinde, *in vitro* rejenerasyon yöntemleri kullanılarak üretilen bitkilerde oluşan kalıtsal genetik değişimlere verilen isimdir. Kültür sistemlerindeki somaklonal varyasyonların temel nedenleri, dokuların yaralanması, besiyeri şartları

ve kültür koşulları sonucunda oluşan oksidatif stres ve genomda oluşan yeni düzenlemelerdir (metilasyon, poliploidi/anoploidi, kromozom kırılmaları, transpozon aktivasyonu, baz delesyonu ve eklenmesi gibi). Bu genetik değişimler, eksplant tipine, ana bitkinin genotipine, *in vitro* kültür süresinin uzaması ve bitki büyüme düzenleyicisi derişimlerine bağılı olarak oluşabilmektedir. Bu değişimler önceden tahmin edilemeyeceğı gibi, kültür sisteminin genetik kararlılığını da etkileyecektir.

Eksplantların organizasyon seviyesi, genetik kararlılığını belirleyen en önemli etkenlerden biridir. Meristematik dokulardan ne kadar uzaklaşırsa, genetik kararlılık da o kadar azalacaktır. Bu nedenle kallus oluşumunun gerçekleştiğı dolaylı organogenez sürecinde, genetik kararlılığın bozulması tehlikesi bulunmaktadır. Eksplantların alındığı bitkinin genotipi de somaklonal varyasyonları etkileyecektir. Anaç bitkinin sahip olduğı genetik yapıdaki düzensizlikler (poliploidi, genomun transpozon taşıması gibi) *in vitro* sistemde genetik kararlılığının kaybına neden olan etkenlerdendir. Kültürde kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri de hücre siklusları üzerinde yaptığı değişiklikler nedeniyle, somaklonal varyasyonların oluşmasındaki başka bir etkindir. Ayrıca yaşlı dokularda somaklonal varyasyon oluşma sıklığı genç dokulara oranla daha fazladır.

Kültür ortamındaki diğ er bir sorun da, fenolik maddelerin oluşmasıdır. Fenolik maddeler, *in vitro* ortamdaki strese bağılı olarak bitkiler tarafından üretilen, canlılığı ve rejenerasyonu inhibe eden kimyasallardır. Fenolik maddeler besiyerinde okside olarak kararmalara neden olur. Bu maddelerin bitkiler üzerindeki etkilerini azaltabilmek için inhibitör görevi gören fenolik kimyasalları absorbe etme yeteneğıne sahip olan aktif kömür kullanılmaktadır (Pan ve Staden 1998). Aktif kömür dışında polivinilpirolidon (PVP), askorbik asit ve dihidroksinaftalen gibi antioksidanlar da kullanılabilir. Ayrıca yine bitkiler tarafından kültür ortamına salınan etilen gazının, rejenerasyon üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır. Etilen normalde meyve olgunlaşması, çiçek senesensi, meyve dökülmesi gibi çevresel ve gelişimsel işlemlerin düzenlenmesinden sorumludur (Yang ve Hoffman, 1984). Yapılan çalışmalarda gümüş nitratın ($AgNO_3$) etilen gazının kültür ortamında yayılmasını engellediğı ve böylelikle rejenerasyon üzerindeki olumsuz etkilerinin giderilebildiğı raporlanmıştır.

1.2.1.4 Uygulama Alanları

Günümüzde bitki doku kültürü, hücre biyolojisi, fizyoloji, biyokimya ve moleküler biyoloji dallarını kapsayacak şekilde, disiplinler arası bir alan haline gelmiştir (Raghaven, 1997). Bu da bitki biyoteknolojisi için çok önemli bir adım oluşturmakla birlikte, sadece bilim alanında değil, ticari laboratuvarlar tarafından kullanılmak suretiyle de endüstriyel bir önem kazanmıştır. Bitki doku kültürünün en önemli kullanım alanlarından biri vejetatif yollarla çoğalamayan türlerin yapay yollardan çoğaltılmasıdır. Örneğin düşük çimlenme yeteneğine sahip tohumlardaki embriyolar, embriyo kurtarma tekniği ile kültür ortamında çoğaltılabilirler (Collins ve ark. 1984).

Virüslerden arı bitki kültürlerinin üretilmesi de daha önceki kısımlarda anlatıldığı gibi, mümkündür. Ayrıca bu kültürlerin eldesi uluslar arası bitki ticareti için çok önemlidir (Thorpe, 1990). Bunun için meristem kültürlerinin kullanımı çok yaygın ve etkin bir yöntem olarak göze çarpmaktadır.

Sentetik tohum teknolojisi, tohumla üretim ve klonal bitki çoğaltımının avantajların birleştirdiği için, bitki doku kültürünün önemli bir uygulama alanıdır. Tohumları taklit etme fikri ilk olarak somatik embriyolarla yapılan çalışmalarda ortaya çıkmıştır (Murashige ve Skoog, 1977). Daha sonra apikal ve aksiler tomurcuklarda da kullanılmaya başlanan bu teknik, klonal çoğaltımın da getirdiği avantajlarla birleşince, bitkilerin kitle çoğaltımında verim arttırıcı bir yöntem olarak kullanılmıştır. Bu aşamanın ardından sentetik tohum teknolojisi yeniden tanımlanmıştır. Buna göre sentetik tohum; “somatik embriyolar, zigotik embriyolar, gövde veya diğer bitkisel dokular gibi herhangi bir bitki parçasını içeren ve *in vitro* veya *ex vitro* koşullarda kullanıma uygun, yapay olarak enkapsüle edilmiş bitki parçaları” olarak tanımlanmıştır (Aitken – Christie ve ark. 1995). Ayrıca sentetik tohumlar, germplazma korunması için de çok uygun bir materyal görevi görmektedir. Günümüzde, farklı bitkilerden alınan eksplantlarla geliştirilen sentetik tohumlar için bir hem orta süreli hem de uzun süreli (enkapsülasyon – vitrifikasyon, enkapsülasyon – dehidratasyon) olmak üzere birçok farklı koruma teknikleri geliştirilmiştir (Ozden Tokatli ve ark, 2008; Reed ve ark, 2005). Sentetik tohum teknolojisi eksplantların aljinat, agaroz, agar, selüloz, poliakrilamid, karboksimetil selüloz gibi bir matrikse sabitlenmesi ve bu matriksin jelleştirilerek, yapay bir tohum formu almasına dayanmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda aljinat, sahip olduğu, uzun süreli saklanma özelliği, kalsiyum

klorür ile hızlı bir şekilde katılaşma yeteneği, düşük toksisite özelliği ve suda kolay çözünme yeteneği nedeniyle en çok tercih edilen matrislerden biri olmuştur. (Redenbaugh ve ark. 1968).

Bitki doku kültürünün en önemli uygulama alanlarından birisi de hem orta süreli saklama (kültürlerin büyüme hızlarının azaltılmasıyla alt kültür sürelerini uzatmayı hedefleyen bir koruma yöntemi) hem de uzun süreli saklama (kriyoprezervasyon, bitki parçalarının sıvı azot içinde saklanmalarını hedefleyen koruma şekli) yöntemleriyle biyoçeşitliliğin korunmasıdır.

1.2.2 ORTA SÜRELİ SAKLAMA – YAVAŞ BÜYÜTME

Orta süreli saklamada temel amaç, kültür şartlarında yapılan modifikasyonlarla kültürlerin, canlılıklarında ve genetik kararlılıklarında herhangi bir kayıp olmadan, besiyeri gereksinimlerini azaltarak, alt kültür sürelerini uzatmaktır. Dolayısıyla yöntem yavaş büyütme olarak tarif edilir. Bu modifikasyonları genel olarak besiyeri içeriğinde ve ortam şartlarında yapılan değişimler olarak da tanımlanabilir (Lambardi ve ark., 2010).

Besiyeri içeriğindeki tuz konsantrasyonlarını azaltarak (Heller 1953) bitki büyümesi yavaşlatılacağı gibi, gücü azaltılmış (besiyerindeki mikro ve makro element konsantrasyonları azaltılmış) besiyerleri ile şeker miktarında yapılan değişimler, genellikle tercih edilen sukroz yerine mannitol gibi ozmotik aktif şeker alkollerinin kullanılması, büyüme düzenleyicisi miktarlarının azaltılması ve absisik asit gibi büyüme engelleyici bileşiklerin kullanılması bu amaçla uygulanan modifikasyonlara örnek teşkil etmektedir. Besiyeri değişimleri dışında kültürlerin sıcaklığın düşürülmesi de orta süreli saklama protokollerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Galzy, üzüm bitkisini, 9°C’ ta 10 ay boyunca saklayabilmiştir (Galzy, 1969). Birçok tahıl bitkisi 1 – 22°C arasında saklanabilmektedir. Ayrıca *Prunus* sp. ve *Chrysanthemum morifolium* bitkileri de donma sıcaklığının altında (-3°C) 10 aya kadar başarılı bir şekilde saklanabilmiştir (Marino ve ark., 1985). *Humulus* spp. 3 ay boyunca soğuk şartlarda saklanabilmiştir (Reed ve ark., 2003). Sıcaklığa ek olarak, ışık şiddetinin azaltılması yoluyla da bitkilerin büyüme hızlarında bir yavaşlama elde edilebilir. *Camellia* ve *Humulus* spp. bitkilerine 3-8 µmol ışık şiddeti uygulanarak uygun bir saklama süresi elde edilebilmiştir (Reed ve ark., 2003).

Ayrıca eksplantlar, %2 veya %3 sodyum aljinat içeren çözeltiyle enkapsüle edilerek besiyeri ihtiyaçları azaltılabilir ve düşük sıcaklıklara karşı toleransları artırılabilir. *Cedrela fissilis* bitkisinin sentetik tohumları, 25°C’ ta ve 25 µmol ışık şiddetinde 9 aya kadar bu şekilde saklanabilmiştir (Nunes ve ark. 2003). Bir başka çalışmada, *Photinia fraseri* ve *Nerium oleander* sentetik tohumlarının petrilere, 3 farklı koşulda orta süreli saklanması üzerine denenmiştir. İlk setteki sentetik tohumlar boş petrilere yerleştirilmiş ve parafilm kullanarak sıkıca kapatılmışlardır. İkinci setteki sentetik tohumlar ise steril distile suyla ıslatılmış steril filtre kağıtlarına yerleştirilmiştir. 3. setteki bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen yarı katı MS besiyeri üzerinde saklanmışlardır. 3 ay boyunca +4°C’ ta saklanan kültürlerde saklama sonrası en yüksek çimlenme oranının yarı-katı MS besiyerinde saklanan örneklerden elde edildiği görülmüştür (Ozden-Tokatlı ve ark. 2008). *Hibiscus moscheutos* ve *Splanchnum ampullaceum* bitkilerinde yapılan çalışmalarda ise, bu kültürlerden elde edilen sentetik tohumların sırayla 20 ila 30 aya kadar saklanabildikleri görülmüştür.

Bu anlatılan modifikasyonların dışında, kültürlerin saklama koşullarına aktarılırken bulundukları fizyolojik koşullar da, orta süreli saklamanın başarısı açısından oldukça önemlidir. Ballester ve arkadaşlarının (1997); *Camellia japonica* ve *C. reticulata* bitkilerinin 6 farklı klonu ile yaptığı çalışmada; ince ve az kütinleşmiş gövdelerin saklanması için, 6 ayda bir alkültürlenmesi gerektiğini, diğer gövdelerin ise alkültürlenmeden rahatlıkla 1 yıl boyunca saklanabildikleri tespit edilmiştir.

Bir başka çalışmada ise, kullanılan farklı tipteki kültür kaplarının, kültürlerin hava ile temasında yaptıkları etki yüzünden, orta süreli saklama için ne kadar önemli olduğu belirlenmiştir. Rosa Sant’Antonia di Padova ve Domenica adlı iki farklı gül varyetesi ile yapılan çalışmada, hava geçirgenlikleri farklı seviyelerde olan 3 farklı kültür kabının (gaz geçirgen olmayan 500 cc hacimli cam kültür kapları, 80 cc hacimli yarı geçirgen plastik silindirler ve gaz geçirgen Starpac® plastik torbalar), kültürlerin orta süreli saklanmasında yaptıkları etkiler gözlenmiştir. +4°C’ ta 6 ay orta süreli saklamanın ardından standart kültür şartlarına aktarımdan sonra, en yüksek geri kazanımın %80 ile cam kültür kaplarında olduğu ve gelişen gövde kültürlerinin de sağlıklı olduğu gözlemlenmiştir. Starpac® ve plastik silindirlerde ise düşük geri kazanım ve kültürlerde anormallikler göze çarpmıştır. Ayrıca cam kültür kaplarının ve gaz geçirgen Starpac® torbaların CO₂ seviyeleri incelendiğinde; % 0,4’ ün üzerine

çıkmadığı görülmüştür. Bu da gövde kültürlerinin büyüme hızlarının yavaşladığını gösteren en belirleyici kanıttır (Previati ve ark. 2008).

1.2.3 UZUN SÜRELİ SAKLAMA – KRİYOPREZERVASYON

Kriyoprezervasyon, hücrelerin, dokuların veya organların sıvı azot içinde (-196°C ' ta) canlılıklarını kaybetmeden uzun süreli korunmalarını ve saklanmalarını amaçlayan bir disiplindir. Bu yöntem birçok farklı organizma ve biyolojik doku için kullanılmakta, ayrıca bitki germplazmalarının uzun süreli saklanması için de tercih edilmektedir. Ayrıca bu yöntemde kullanılan oldukça düşük sıcaklık hücre içindeki tüm metabolik süreçlerin neredeyse tamamen durmasını sağladığından, genetik kararlılığın korunması da mümkün olmaktadır (Lambardi ve ark., 2008)

Son yıllarda yapılan çalışmalar, kriyoprezervasyonun, yok olma tehlikesiyle karşı karşıya olan türlerin korunması için oldukça umut verici bir yöntem olduğunu göstermektedir (Touchell ve Dixon 1996).

Kriyoprezervasyon protokolleri bitki germplazmasının korunması amacıyla, tohum (Ozden-Tokatli ve ark., 2007), zigotik embriyolar, gövde uçları, embriyonik dokular (Ozudogru ve ark., 2010) gibi birçok farklı eksplant tipine rahatlıkla uygulanabilmektedir. Ancak, kriyoprezervasyon bitki doku kültürü temelli *in vitro* tekniklere dayandığından, kullanılacak eksplantın yüzey sterilizasyonun sağlanması ve uygun *in vitro* rejenerasyon protokollerinin optimize edilmiş olması da tekniğin başarıya ulaşmasındaki önemli faktörlerdir.

1.2.3.1 Kriyoprezervasyonun Temelleri

Kriyoprezervasyon sonrası canlılığın elde edilmesi, donma potansiyeline sahip olan hücre içi ve hücreler arası suyun sahip olduğu fizikokimyasal özelliklere bağlı olduğundan, öncelikle suyun çeşitli özelliklerinin irdelenmesi akılcı olacaktır.

Su (H_2O), sahip olduğu küçük moleküler yapısı yüzünden farklı davranış özellikleri göstermektedir. Suyun moleküler yapısı incelendiğinde, bu farklı davranış özelliklerini de rahatlıkla anlaşılabilir. Su moleküler olarak dipolar yapıdadır. Yani pozitif yüklü hidrojen atomları ve negatif yüklü olan oksijen atomu karşılıklı olarak yerleşmiştir. Su molekülünün bu özelliği ona tetrahedron bir yapı kazandırmaktadır. Moleküldeki bu yük farklılığı, pozitif yüklü oksijen atomlarının ve negatif yüklü

hidrojen atomlarının aynı hizaya gelerek Hidrojen (H) bağı oluşturmalarını sağlamaktadır. Bu şekilde etkileşime geçen su molekülleri arasında sürekli yapılıp bozulabilen H bağları oluşur. H bağlarının sürekli değişim halinde olması da suyun diğer sıvılara göre daha kararsız olmasını açıklayan bir etkidir. Suyun bu kararsız yapısını anlamak için, buharlaşma ve donma süreçlerine göz atmak yeterli olacaktır:

Su moleküllerine dışarıdan bir miktar enerji verilirse, yüzeyde bulunan moleküller arasında H bağları kopar ve moleküller buharlaşır. Bunun tersine, 0°C veya daha altındaki sıcaklıklarda su molekülleri -aralarında boşluklar meydana getirerek- tetrahedral bir yapı oluşturacak şekilde kristalize olurlar. Bu nedenle de su sıvı haline göre yoğunluğunu kaybeder.

Ancak, kriyoprezervasyon için önemli olan suyun nasıl buz kristallerine dönüştüğüdür. Çünkü oluşan buz kristalleri hücreler ve dokular için öldürücü etkiye sahiptir. Bu yüzden de başarılı bir kriyoprezervasyon protokolünün geliştirilmesindeki en önemli adım, hücre içi buz kristali oluşumunun kontrol edilmesidir.

Buz kristali oluşumu öncelikle ortamda buz çekirdeklerinin oluşmasına bağlıdır. Eğer ortamın enerji durumu, su moleküllerinin güçlü hidrojen bağları kurmalarını sağlıyorsa ortamda buz çekirdekleri oluşmaya başlar ve buz çekirdeklerinin varlığında su 0°C' ta donar. Buz çekirdeği oluşumunun ardından buz kristalleri oluşumu gerçekleşir ve hızlı bir biçimde tüm ortama yayılır. Ancak ortamdaki buz çekirdeklerinin oluşumları engellenebilirse, su 0°C' in altındaki sıcaklıklara kadar, buz kristalleri oluşumu gerçekleşmeden süper soğutulabilmektedir. Bu sıcaklık en düşük -40°C olabilmektedir. Bu sıcaklıktan sonra buz çekirdekleri oluşur ve homojen buz oluşumu gerçekleşir (Benson, 2008).

Buz kristalleri oluşumu hücrelerin yapısal ve ozmotik bütünlüğünü bozduğu için, kriyoprezervasyon süreçlerinde istenmeyen bir durumdur. Dolayısıyla kriyoprezervasyon sırasında hücre içi buz oluşumunun engellenmesi gerekmektedir. Bunu engellemek için iki farklı kriyoprezervasyon yöntemi bulunmaktadır: (i) İki aşamalı kontrollü soğutma yöntemleri, (ii) Tek aşamalı dondurma yöntemleri.

1.2.3.2 Kontrollü Soğutma Yöntemleri

Bu yöntem, dokuların kriyoprezervasyonu için geliştirilen ilk yöntemdir. Kontrollü soğutma yöntemlerinde koligatif (hücre içine girebilen) kriyokoruyucular (DMSO - Dimetilsülfoksit, Etilen Glikol) ile muamele edilen hücrelerin, kontrollü soğutma yöntemleriyle kriyodehidratasyonu amaçlanmaktadır. Bu sayede hem koligatif kriyokoruyucuların toksik etkileri azaltılır hem de hücre içi buz oluşumu engellenir. Sıcaklığın kontrollü olarak azaltılması sırasında ozmotik olarak hücre içindeki suyun hücre dışına doğru akımı gerçekleşir. Oluşan bu hareket, etkin bir kriyokoruyucu mekanizma olarak işlev görür. Bu da, buz kristali oluşumunun hücre dışında gerçekleşmesini sağlar. Böylelikle, hücre içinde buz oluşumu engellenir.

Yöntemde soğutma oranı çok iyi kontrol edilmelidir. Genellikle sıcaklık, programlı bir soğutucu yardımıyla dakikada 0,5°C ile 1°C soğutma oranıyla homojen buz oluşumun gerçekleştiği -40°C' ta kadar indirilir. Bu sayede su hücre içinden hücre dışına doğru hareket eder ve sitoplazmanın konsantrasyonu artar. Sıcaklık aşağıya doğru inerken; yaklaşık -9°C' ta, buz çekirdekleri oluşmaya başlar, ancak sitoplazmanın konsantre hale gelmesi yüzünden hücre içinde buz oluşumu gerçekleşmez. Bunun tam tersi olarak, su oranı artan hücre dışı bölgelerde ise buz çekirdekleri oluşumu başlar.

Gerçekleştirilecek çok hızlı bir soğutma, hücrelerin hem hızlı bir şekilde su kaybetmelerine hem de koligatif solüsyonlar yüzünden hasara uğramasına sebep olacaktır. Bu da hücrelerin canlılıklarını olumsuz etkiler. Çok yavaş bir soğutma oranında ise, hücreler yeteri kadar dehidrate olamayacakları için, hücre içinde buz kristali oluşumu gerçekleşecektir. Yani, optimum bir soğutma oranı, hücrelerin canlılığı açısından önemlidir (Reed ve Uchendu, 2008).

Kontrollü soğutma; gövde uçları, kallus, embriyogenik kültürler, gibi bir çok farklı eksplantın kriyoprezervasyonunda (Reed, 2001; Ozudoğru ve ark., 2010) başarıyla kullanılmaktadır.

Kontrollü soğutma tekniğini 4 temel adımda incelenebilir:

- i. Önkoşullandırma adımları: Eksplantların kriyokoruma adımlarına hazırlanmaları için gerekli koşulları tanımlamaktadır. Ayrıca bu adımlar, sıvı azot sonrasında canlılığın artması için de oldukça önemlidir.

- ii. Kriyokoruma: Kriyoprezervasyon sonrasında canlılığın elde edilmesindeki temel adımdır. Bu adımdaki temel amaç, kriyoprezervasyon sırasında hücrelerde oluşabilecek hücre içi buz oluşumunu kriyokoruyucu muamelesi ile engellemektir.
- iii. Sıvı azot içinde saklama: Eksplantların sıvı azot içine aktarılımları ve en az 1 saat süreyle bekletilmelerini tanımlamaktadır.
- iv. Çözme: Eksplantların sıvı azottan alınıp, besiyeri ortamına alınmaları ve ardından canlılık testlerine tabi tutulmalarıdır.

1.2.3.2.1 Önkoşullandırma Adımları

Yukarıda anlatıldığı gibi; eksplantları soğuğa alıştırmak, ozmotik aktif kimyasallarla kültürlemek ve stres önleyici ajanların kullanımı, eksplantların kriyodehidratasyonuna hazırlık için önemli bir adımdır.

Soğuk Koşullarda Kültürleme

Bu aşama, ılıman ve tropik iklimlerde yaşayan bitkilerin kriyoprezervasyon sonrasında hem canlılık (Sakai 1960; Sakai ve Nishiyama, 1978) hem de rejenerasyonun artması açısından çok etkili olmuştur (Reed, 1988). Böğürtlen bitkisinde yapılan çalışmada; kültürler hem soğuk koşullarda (-1°C, karanlık koşullar) hem de normal kültür şartlarında (22°C, 16/8 fotoperiyod) kültürlenmiştir. Kriyoprezervasyon sonrasında, soğuğa alıştırılmış örneklerde, soğuğa alıştırmamış örneklere oranla 2 kat fazla canlılık tespit edilmiştir. Armut bitkisinde yapılan benzer bir çalışmada da soğuk koşullarda kültürlenен bitkilerde kriyoprezervasyon sonrasında %95 canlılık elde edilirken normal sıcaklık koşullarında kültürlenен bitkilerde canlılık sadece %5 oranında olmuştur (Reed, 1990).

Stres Önleyici Ajanlarla İnkübasyon

Prolin , absisik asit (Bravo ve ark., 1998; Heino ve ark., 1990) veya trehaloz gibi stres önleyici ajanlar bu amaçla kullanılabilirler. Özellikle absisik asidin hücre içindeki su dengesini düzenleme rolü (Tanino ve ark., 1990) ve donmayı engelleyici kimyasalların salınımını indüklemesi (Lee ve ark., 1991) kültürlerin geri kazanımı için önemli rol oynamaktadır. Mısır bitkisinde yapılan çalışmada ise, eksplantların 3-4 gün boyunca %10 prolin ile inkübasyonunun geri kazanımı belirgin bir şekilde

arttırdığı gözlenmiştir (Whiters ve King, 1979). Kış buğdayının süspansiyon kültürlerinin 20°C' ta 5 gün boyunca $7,5 \times 10^{-5}$ M ABA ile kültürlenmesi, kontrol bitkilerine oranla daha yüksek geri kazanım sağlamıştır (Chen ve ark, 1985). Ayrıca *Triticum aestivum* L. zigotik embriyolarının 0,5 mg/l ABA ile kültürlenmesi de kriyoprezervasyon sonrası canlılığı arttırmıştır. Böğürtlen bitkisinde yapılan bir çalışmada ise, sadece ABA ile kültürlemenin kriyoprezervasyon sonrası canlılığı belirli bir şekilde arttırmadığı, ancak 1 haftalık soğuğa alıştırma evresi sonunda canlılığın belirli bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir (Reed, 1993).

Gövde uçlarının 48 saat boyunca %5 DMSO ile kültürlenmesi de kullanılan bir başka önkültür yöntemidir. Çilek gövde uçları kullanılarak yapılan çalışmada sıvı azota aktarımdan önce 2 gün boyunca %5 DMSO ile kültürleme, kriyoprezervasyon sonrasında %95 oranında canlılığı sağlamıştır (Kartha ve ark, 1980). Ayrıca %7,5 DMSO ile inkübasyondan önce 2 gün boyunca 0,5 M sorbitolde kültürlenen *Arabidopsis* ve tütün hücrelerinde %95 oranında geri kazanım elde edilmiştir (Menges ve Murray, 2004). Mısırdaki yapılan çalışmada ise, 3 veya 4 gün boyunca 0,3 M mannitol ile kültürlenen süspansiyon kültürleri, kriyoprezervasyon sonrasında olumlu cevap vermiştir (Whiters, 1985).

1.2.3.2.2 Kriyokoruma

Kriyokoruyucu kimyasallar, kriyoprezervasyon sırasında hücrelerde oluşabilecek ölümcül buz kristallerinin engellenmesi açısından çok önemlidir. DMSO, kontrollü soğutma protokolleri için en fazla kullanılan kriyokoruyucu kimyasallardan bir tanesidir. Belirli bir oran olmamakla birlikte, DMSO genelde besiyeri miktarının %10-15' i kadar kullanılır. DMSO'nun bitkilerde ilk kullanımı, Quatrano tarafından *Linum usitatissimum* kültürlerinin kriyoprezervasyonunda görülmektedir (Quatrano, 1968). Çalışmada, -50°C' ta DMSO ile muamele edilen kültürlerden, %14 oranında canlılık elde edilmiştir. Lovelock ve Bishop' a göre DMSO, geçerli donma sıcaklığını aşağıya çekmekte ve böylece buz kristali oluşumunu engellemektedir (Lovelock ve Bishop, 1959). *Puccinellia distans* bitkisinin %12,5 ve %15 DMSO oranı kullanılarak gerçekleştirilen kontrollü soğutma ile kriyoprezervasyonunda %95 canlılık elde edilmiştir (Heszky ve ark, 1990). Kullanılan diğer bir kriyokoruyucu L-prolin'dir. *Zea mays* bitkisinde besiyerine ilave edilen %2,5 ile %24 oranında L-prolin, kriyoprezervasyon sonrası canlılığın elde edilmesinde kullanılmıştır (Whiters ve

King 1979). Olumlu etkileri gözlenen diğer bir yaklaşım, hızlı bir şekilde hücre içine nüfuz eden kriyokoruyucularla, yavaş yavaş hücre içine giren kriyokoruyucuların birlikte kullanılmasıdır. Örneğin *Saccharum* sp.'nin kallus kültürlerinde uygulanan bir protokolda %10 PEG, %8 Glikoz ve %10 DMSO karışımından oluşan bir kriyokoruyucu solüsyon, kriyoprezervasyon sonrası canlılığın elde edilmesinde etkili olmuştur (Ulrich ve ark, 1979). Farklı kriyokoruyucuların düşük konsantrasyonlarda bir arada kullanılması, toksik etkilerin azaltılması açısından da önemlidir (Chen ve ark., 1984). *Pinus roxburgh* Sarg. ile yapılan çalışmada; somatik embriyoların 0,2 M sorbitol ve %5 DMSO ile muamele edilmeleri kriyoprezervasyon sonrasında en iyi canlılığı vermiştir (Malabadi ve Nataraja, 2006). Ayrıca PVS-2 (Sakai ve ark., 1990) (%30 gliserol, %15 etilen glikol, %15 DMSO, büyüme düzenleyicisi içermeyen MS taban besiyeri ve 0,4 M sukroz) kriyokoruyucu çözeltisinin de kullanımı *Prunus* kriyoprezervasyonunda olumlu sonuçlar sağlamıştır (Brison ve ark. 1995).

1.2.3.2.3 Kriyodehidratasyon

İki aşamalı soğutma yönteminde kriyodehidratasyon aşaması; dokuların ve hücrelerin programlanabilir soğutucunun yardımıyla, belirli oranlarda kademeli olarak soğutulmasını içermektedir. Ayrıca, isopropanol gibi alkoller içeren özel kaplar da (Mr. Frosty[®]) 1°C/dak oranında soğutmayı sağlamak için kullanılabilir.

Hücre süspansiyon kültürleri için, genel olarak, -30°C' ye kadar 1°C/dak. kademeli soğutma kullanılmaktadır. -40°C' a kadar 0,1°C/dak.' lık bir soğutma oranı; armut ve nane bitkileri için optimal bir dehidratasyon sağlamaktadır. Buna benzer olarak, *Rubus* germplazmasının korunmasında 0,3°C/dak.' lık bir soğutma oranı kullanılırken nane gövde uçlarının kriyodehidratasyonunda 0,25°C/dak.' lık bir soğutma oranı kullanılmıştır. Ayrıca enkapsülasyon gibi diğer bitki doku kültürü tekniklerinin de kontrollü soğutmayla birlikte kullanılması iyi sonuçlar verebilmektedir. Enkapsüle edilmiş üzüm aksiller tomurcuklarının -100°C' a kadar 0,1°C/dak. kademeli soğutulması, kriyoprezervasyon sonrasında, enkapsüle edilmeyenlere oranla daha yüksek canlılığın elde edilmesini sağlamıştır (Plessis ve ark, 1993).

1.2.3.2.4 Çözme ve Geri Kazanım

Çözme, başarılı bir kriyoprezervasyon için en kritik aşamalardan birisidir. Buz kristallerinin yeniden oluşmalarını engellemek için çözme olabildiğince hızlı

yapılmalıdır. Yapılan ilk çözme çalışmalarında, 20°C' ta çözme en iyi sonuçları vermiştir. *Arabidopsis* hücre süspansiyon kültürleri 40°C' ta 3 dakika çözülduğünde %90 oranında canlılık elde edilmiştir. Çam için de buna benzer olarak, 35°C' ta 5 dakika çözme işlemi uygulanmıştır.

1.2.3.3 Tek Aşamalı Dondurma Yöntemleri

Tek aşamalı dondurma yöntemleri hücre içeriğinin vitrifikasyonu temeline dayanmaktadır. Bunu gerçekleştirmek için; etilen glikol tabanlı vitrifikasyon çözeltilerinin, PVS-2 ve PVS-3 (Nishizawa ve ark. 1993) (%40 gliserol, %40 sukroz ve MS besiyeri) gibi vitrifikasyon çözeltilerinin kullanımı, fiziksel dehidratasyon, enkapsülasyon vitrifikasyon, enkapsülasyon - dehidratasyon ve damlacık - dondurma gibi yöntemler kullanılmaktadır.

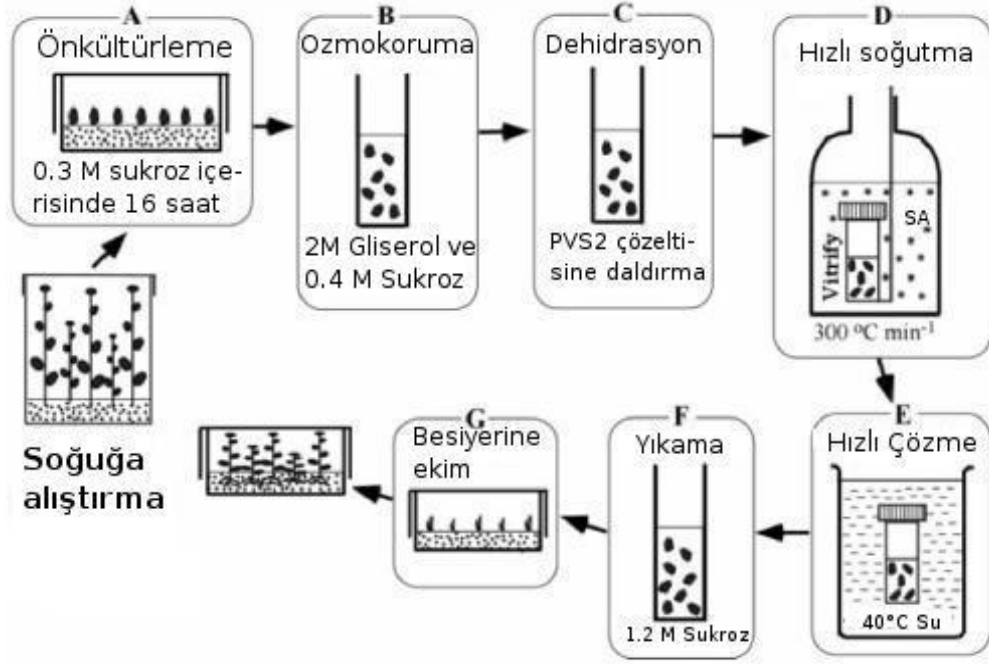
Tek aşamalı dondurma yöntemlerinde, dokuların vitrifikasyon çözeltileri ile yeteri kadar dehidrate edilmeleri ve bu sayede ölümcül buz oluşumunun engellenmesi amaçlanmıştır. Dokuların vitrifikasyon çözeltileri olmadan soğutulmaları buz kristallerinin oluşumuna neden olacak ve bu da dokuların ölümünü beraberinde getirecektir. Bu nedenle etilen glikol ve gliserol tabanlı vitrifikasyon çözeltileri (PVS-2 ve PVS-3 gibi) kullanılmaktadır.

PVS-2 ve PVS-3 çözeltileri, sahip oldukları -100 °C' a kadar süper soğutulma yetenekleri nedeniyle, düşük sıcaklıklarda, dokularda vitrifikasyona neden olmaktadır.

Buna göre vitrifikasyon, sıvıların yüksek konsantrasyonlu kriyokoruyucu çözeltiler sayesinde, buz kristalleri oluşturmada camı bir yapıya geçmelerine verilen isimdir (Fahy ve ark. 1984). Sonuçta, buz kristallerinin oluşumu engellenecek ve dokuların canlılığı korunacaktır. Ayrıca vitrifikasyon esnasında, metabolik tepkimler en alt seviyeye inecek ve bunu doğal bir sonucu olarak doku yıkımı engellenerek ve genetik stabilitenin korunması sağlanacaktır (Burke 1986). Ayrıca bu kriyokoruyucu çözeltilere ilave olarak, 0,4 M sukroz ve 2 M gliserol içeren LS (Loading Solution – Yükleme Solüsyonu) çözeltisi de, dokuların vitrifikasyon süreçlerine hazırlanmasında ozmokoruyucu olarak kullanılmaktadır. Bu çözelti dokulardaki, dehidratasyon ve soğuk toleransının arttırması açısından oldukça önemli olduğu daha önceki çalışmalarda açıklanmıştır (Sakai ve ark. 1991; Nishizawa ve ark. 1992).

Vitrifikasyon prosedürlerinde de, kontrollü soğutmada olduğu gibi önkültür, ozmokoruma, sıvı azota aktarım ve çözme süreçleri bulunmaktadır. Protokol basitçe şu şekilde özetlenebilir:

- A. Bitkiden alınan eksplantların normal bitki büyütme koşullarında, 0,3 M sukroz içeren besiyerinde önkültürlenir (Şekil 1-2 A).
- B. Eksplantlar kriyokoruyucu bir çözeltiyle (LS) 20-30 dakika ozmokorumaya tabi tutulurlar. Bu adımda hücrelerde, vitrifikasyon solüsyonlarının neden olacağı hasar engellenmeye çalışılır (Şekil 1-2 B).
- C. Dehidratasyon: Ozmokoruyucu solüsyondan arındırılan eksplantlar bu adımda farklı sürelerde ve farklı sıcaklıklarda (0°C - 25°C) 1-2 mL vitrifikasyon solüsyonlarıyla (PVS-2 veya PVS-3 gibi) muamele edilirler. Bu sürenin ardından kriyokoruyucu solüsyon ortamdan çekilir ve tazelenir (Şekil 1-2 C).
- D. Hızlı dondurma: Eksplantlar sıvı azota (-196°C) aktarılırlar. Bu ortamda en az 1 saat süreyle bekletilirler (Şekil 1-2 D).
- E. Çözme: Bu adımda eksplantlar 1-2 dakika boyunca 40°C su banyosunda çözülürler (ısınma oranı yaklaşık: 250°C/dak.) (Şekil 1-2 E).
- F. Yıkama: Su banyosunda çözülen eksplantlar 1,2 M sukroz içeren sıvı besiyeri içerisine aktarılırlar ve kriyokorucu solüsyonların hücre dışına atılmalarını sağlamak için 30 dakika boyunca muamele edilirler (Şekil 1-2 F).
- G. Besiyerine aktarım: 1,2 M sukroz içerisinde yıkanan eksplantlar rejenerasyon besiyerine aktarılırlar ve normal kültür ortamında canlılıkları gözlenir (Şekil 1-2 G)



Şekil 1-2: Genel bir vitrifikasyon protokolünde izlenen adımlar.

1.2.3.3.1 Önkoşullandırma

Önkültür aşamaları odunsu ve otsu bitkilerde farklılık göstermektedir. Odunsu bitkilerde, +4 ile +5 °C koşullarında 3 haftalık önkültür süreci, elma ve armut bitkilerinde sıvı azot sonrasında canlılığı arttıran bir etken olarak raporlanmıştır (Niino ve ark. 1992). Yine elma bitkisinde yapılan başka bir çalışmada ise, 8 günlük soğuğa alıştırma süreci ardından 0,7 M sukroz içerisinde 1 gün süreyle kültürlenmiş gövde uçlarında yüksek seviyede canlılık elde edilmiştir. Önkültür aşamalarında sukroz dışında başka kimyasalların da kullanılmasının kriyoprezervasyon sonrasında canlılığı arttırdığı raporlanmıştır. Örneğin *Ribes* germplazmasının, 1 hafta soğuğa alıştırmanın ardından %5 DMSO ile 2 gün boyunca kültürlenmesi kriyoprezervasyon sonrasında en iyi canlılığı sağlamıştır (Reed 1992; Lou ve Reed 1997).

Otsu bitkilerde ise, sadece ozmotik aktif şekerler ile yapılan önkültürleme süreçleri rahatlıkla kullanılabilir. 0.3 ve 0.7 M sukroz ilave edilmiş besiyerlerinde 1 veya 2 gün süreyle önkültürlenmiş gövde uçlarının sıvı azot sonrasında yüksek canlılık gösterdikleri raporlanmıştır (Dereuddre ve ark. 1988). Önkültür sürecinin, şeker ve şeker alkoller gibi endojen kriyokoruyucuların hücre içinde birikimini teşvik ettiği ve membran stabilitesini arttırdığı da bildirilmiştir (Crowe ve ark.

1984 a,b). Kriyoprezerve edilen tütün gövde uçlarıyla yapılan bir çalışmada ise, 0.3 M mannitol ile 1 gün boyunca kültürlen hücrelerde ozmotik stresin yaptığı etkiler incelenmiştir. Önkültür sürecinde, absisik asit, prolin ve embriyogenezin son aşamalarında sentezlenen bazı proteinlerin varlığı tespit edilmiş ve hücrelerin bu süreç içerisinde besiyerindeki mannitolu kullandıkları anlaşılmıştır (Reinhoud, 1996). *Solemostemon rotundifolius* bitkisinin tomurcukları ile yapılan çalışmada ise, 25°C' ta 0,3 M sukroz ile 3 gün boyunca önkültürlemenin en iyi rejenerasyonu verdiği tespit edilmiştir (Niino ve ark., 2000).

1.2.3.3.2 Ozmokoruma

Bu adımda dokuların dehidratasyona karşı dirençlerini arttırmak amaçlanmaktadır. Çünkü bazı otsu ve odunsu bitkilerde sadece şeker alkollerini kullanılarak yapılan önkültürleme süreçleri kriyoprezervasyon sonrasında istenilen canlılığı sağlamamaktadır. Örneğin, LS kullanımıyla birlikte %50 PVS-2 uygulanmasının wasabi gövde uçlarının sıvı azot sonrasındaki canlılıklarını arttırdığı görülmüştür (Matsumoto ve ark. 1994).

1.2.3.3.3 Vitrifikasyon Aşaması ve Sıvı Azota Aktarım

Bu aşamada, eksplanlar belirli sürelerde vitrifikasyon çözeltilerine maruz bırakılarak dehidrate olmaları sağlanmaktadır. Ancak, bu süre içerisinde kriyokoruyucuların toksik etkileri de göz ardı edilmemelidir. Bu nedenle vitrifikasyon çözeltilerinin eksplantlar üzerindeki uygulama süresi çok iyi optimize edilmelidir. En uygun etkileşim süresi hem eksplantları sıvı azota girmeden vitrifiye edebilmeli hem de onların canlı kalmalarını sağlamalıdır. Wasabi bitkisinin yaklaşık 1 mm boyutlarındaki meristemleri 0.3 M sukroz ile önkültürlenmiş ve ardından, LS ile 20°C' ta 25 dakika inkube edilmiştir. Ardından eksplantlar, PVS-2 ile hem 0°C' de hem de 25 °C' ta farklı sürelerde inkübe edilerek kontrol ve sıvı azot grupları oluşturulmuştur. Meristemlerin rejenerasyon sonuçlarına bakıldığında PVS-2'nin meristemler üzerindeki toksik etkileri rahatlıkla görülebilmektedir. 25°C' ta 10 dakika uygulama süresi sonunda sıvı azot gruplarında en yüksek rejenerasyon elde edilmiştir. Ancak kontrol gruplarındaki rejenerasyon 10 dakika sonra azalmaya başlamıştır. Bu süre üzerindeki PVS-2 uygulaması ise, sıvı azot gruplarındaki canlılığının hızlı bir şekilde azaltılmasının neden olmuştur. Aynı etki kontrol gruplarında da 20 dakikanın ardından gözlenmektedir. PVS-2'nin 0°C' ta uygulandığı diğer meristemlerde

ise farklı sonuçlar elde edilmiştir. Sıvı azot gruplarında en yüksek gövde oluşum oranı ise 30 dakika PVS-2 uygulaması ile alınmıştır. Kontrol gruplarına bakıldığında rejenerasyon 30 dakikaya kadar azalma gösterirken ilerleyen sürelerde stabil kalmıştır. Bu bulgular incelendiğinde PVS-2'nin toksik etkileri rahatlıkla anlaşılmaktadır. 23°C' ta PVS-2 uygulamasının meristemler üzerinde toksik etkisi fazlayken 0°C' taki PVS-2 uygulaması, meristemler üzerinde fazla bir toksik etki oluşturmamıştır (Matsumoto ve ark. 1994). 3 hafta boyunca 5°C' ta soğuğa alıştırılıp yine aynı sıcaklıkta 0,7 M sukroz besiyerinde 1 gün önkültürlenmiş elma gövde uçlarında en uygun PVS-2 uygulama süresi 25°C' ta 80 – 90 dakika arasında olmaktadır (Niino ve ark. 1992). *Camellia sinensis* bitkisinde de benzer sonuçların elde edildiği raporlanmıştır. Dikkat edilmesi gereken başka bir husus da kullanılan meristemlerin boyutlarıdır. 0.5 mm'den küçük meristemlere PVS-2 uygulanması toksik bir etki oluştururken, 3 mm'den büyük meristemlerde ise daha uzun süre dehidratasyon gerekmektedir.

Kriyoprezervasyon ise, polipropilen kriyoviallerdeki meristemlerin, doğrudan sıvı azota aktarılma ile gerçekleştirilir.

1.2.3.3.4 Çözme ve Geri Kazanım

Sıvı azottan alınan meristemler sıcak su banyosunda 1-2 dakika süreyle çözünür ve PVS-2'nin dokulardan dışarı atılmasını sağlamak için 1,2 M gibi yüksek sukroz konsantrasyonu içeren çözeltide yıkanarak rejenerasyon besiyerine aktarılırlar. Ancak çözme sürecinde dikkat edilmesi gereken nokta, dokuların devitrifiye olma ihtimalleridir. Bu nedenle, çözme hızı iyi optimize edilmelidir. Bu aşamada dokuların canlılık ve rejenerasyonları incelenir. Rejenerasyon besiyerinin içeriği canlılığı uyarması açısından çok önemlidir. Örneğin besiyerine aktif kömür ilavesi veya amonyum iyonları içermeyen (besiyerlerinin kullanımı, canlılığı tetiklemede etkenlerdir).

Çalışmalar; başarılı bir çözme sonrasında yeşil olarak elde edilen meristemlerin bir süre canlılık belirtisi göstermeden bekledikleri ve ardından rejenere olduklarını göstermiştir (Yamada ve ark 1991; Niino ve ark 1992 a; Matsumoto ve ark. 1994). Bunlara ek olarak, histolojik analizler de dokulardaki canlılığın tespit etmek üzere kullanılmaktadır (Suzuki ve ark., 1997).

1.2.3.3.5 Enkapsülasyon – Dehidratasyon

Bu teknik eksplantların sodyum aljinat kapsüller içersinde hapsedilmesine dayanan sentetik tohum teknolojisi ile birlikte kullanılmış (Redenbaugh ve ark. 1986) ve ilk olarak armut ve patates gövde uçlarının kriyoprezervasyonu için geliştirilmiştir (Dereuddre ve ark. 1990; Fabre ve Dereuddre 1990). Bu teknik, enkapsüle edilmiş eksplantların yüksek konsantrasyon da sukroz içeren sıvı ve ya katı besiyerlerinde önkültürlenmesi ve dehidrate (yatay akımlı kabin veya silika jel üzerinde) edilerek sıvı azota aktarılması aşamalarını içermektedir. Eksplantların enkapsüle edilmeleri canlı kalabilecekleri en düşük nem seviyesine kadar desike edilmelerine olanak tanır.

Desikasyon yüzünden eksplantlardaki su içeriği azalacak ve bu da hücrelerin içindeki ölümcül buz oluşturacak su içeriğini azaltacağından eksplantların sıvı azota aktarımında vitrifikasyon gerçekleşecektir (Engelmann, 1997). Bu teknik günümüzde okalıptüs (Poissonnier ve ark., 1991), üzüm (Plessis ve ark., 1991), armut, havuç (Deruddre ve ark., 1991) gibi birçok farklı bitki çeşidi üzerinde uygulanmıştır. Enkapsülasyon – dehidratasyon tekniği genel olarak vitrifikasyon protokolleriyle benzerlik göstermektedir. Bu tekniğin genel vitrifikasyon protokolünden ayrıldığı en önemli kısım ise enkapsüle edilmiş eksplantların desikasyona maruz bırakılmalarıdır. Bu protokolün aşamalarını: (i) Önkültürleme (ii) Enkapsülasyon, (iii) Ozmokoruma, (iv) Dehidratasyon ve (v) Sıvı azota aktarma şeklinde özetlenebilir.

Soğuğa alıştırma ve önkültürleme süreçleri, dehidratasyon aşaması için büyük bir önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalar, bitki materyalinin fizyolojik durumunun dehidratasyonla olan ilişkisini göstermiştir. Sürekli alt kültürlenen bitkilerin meristemlerinin su içeriğinin sürekli alt kültürlenmeyenlere oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmalar bize göstermiştir ki kriyoprezervasyon sonrasındaki canlılığın sağlanması eksplantların su içeriği ile bağlantılıdır. Önkoşullandırma sırasında soğuk ortamda kültürleme sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Matsumo ve Sakai 1995; Hirata ve ark 1996; Wu ve ark. 2001; Zhao ve ark 1999, 2001).

Yüksek sukroz konsantrasyonunda kültürleme de yine farklı araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (Decruse ve ark., 1999; Grosbiecht ve ark., 1999). Bitkilerden alınan eksplantlar yüksek sukroz konsantrasyonlarında önkültürlemek suretiyle kısmen dehidrate edilirler. *Citrus madurensis* bitkisinin gövde uçları sırasıyla önce 0,1 M sukroz besiyerinde ardından 0,3 M sukroz ve 0,5 M gliserol ile birlikte kültürlenmiş-

lerdir (Cho ve ark., 2002). Kivi, çilek ve krizantem gövde uçları ise, bir veya birkaç gün boyunca yüksek oranda sukroz içeren besiyerlerinde kültürlenmişlerdir (Bachiri ve ark. 2001; Clavero – Ramirez ve ark 2005; Sakai ve ark. 2000).

Enkapsulasyon ise bitki materyalinin sodyum aljinatla (genel olarak %3 oranında) kaplanması ve 100 mM CaCl_2 içeren MS besiyerinde polimerizasyonu sürecine verilen isimdir (Gonzales-Arno ve Engelmann, 2006). Bu süreç sonunda eksplantlar desikasyona karşı bir korumaya sahip olurlar.

Ozmokoruma sürecinde sentetik tohumlar desikasyon ve kriyoprezervasyon öncesine yüksek sukroz konsantrasyonlarında bir süre kültürlenirler. Yapılan farklı çalışmalar, sentetik tohumların 0,5 ve 0,75 M sukroz içeren sıvı besiyerlerinde 16 – 17 saat kültürlenebildiklerini göstermiştir (Paulet ve ark., 1993; Gonzalez – Arno ve ark., 1993). Bazı türlerde sukroz kültürünün canlılık ve rejenerasyon üzerindeki olumsuz etkileri görülse de sukroz konsantrasyonunun kademeli olarak arttırılmasıyla bu sorun çözülebilir. Üzüm bitkisinde 0,25 M – 1 M sukroz konsantrasyonundaki kademeli artış sonucunda %80 oranında canlılık elde edildiği raporlanmıştır (Plessis ve ark., 1991).

Dehidratasyon aşaması ise; sentetik tohumların yatay akımlı kabin içerisinde veya silika jel üzerinde desike edilmesine dayanmaktadır. Yatay akımlı kabinde yapılan desikasyon ortamının nem içeriği ve sıcaklıkla doğrudan bağlantılı olduğu için elde edilen sonuçlar değişken olabilmektedir. Bu yüzden genellikle silika jel üzerinde yapılan dehidratasyon süreci tercih edilmektedir (Gonzales-Arno ve Engelmann 2006). Desikasyon sürecinde sentetik tohumun içerisindeki su içeriğinin %20'ye düşürülmesinin canlılığı sağladığı raporlanmıştır. Ancak bu oran türden türe değişiklik gösterir. Armut gövde uçlarında %27'lik su içeriği canlılık sağlarken (Scottez ve ark., 1992) elma bitkisinde bu oran %33' tür (Niino ve Sakai, 1992).

Kriyoprezervasyon, sentetik tohumların 1,2 mL polipropilen kriyotüpler içerisinde sıvı azota daldırılması ile gerçekleşir. Çözme işlemi de vitrifikasyon sürecine benzer bir şekilde iki ve ya üç dakika süreyle 40°C' taki su banyosunda gerçekleştirilir.

Alternatif olarak çözme süreci; oda sıcaklığında yavaş olarak da gerçekleştirilebilir (Gonzales-Arno ve Engelmann 2006). Ancak 40°C su banyosunda 2-3 dakika

süreyle çözme farklı araştırmacılar tarafından daha yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Matsumoto ve Sakai, 1995; Matsumoto ve ark., 1995). Ayrıca bazı araştırmacılar tomurcukların rehidrate olmaları için, 5-10 dakika boyunca sıvı besiyerinde yıkama da kullanmışlardır (Chang ve ark., 2000; Reed ve ark. 2006).

1.2.3.3.6 Enkapsülasyon – Vitrifikasyon

Bu yöntem, enkapsülasyon ve PVS-2 vitrifikasyon tekniklerinin avantajlarını birleştirmek amacıyla geliştirilmiştir (Matsumoto ve Sakai, 1995). Bu teknik yukarıda anlatılan vitrifikasyon tekniklerine uygun olarak; soğuğa alıştırılan ve ozmo aktif şekerlerle önkültürlenmiş tomurcukların, %2 veya %3 sodyum aljinat içeren besiyerlerinde enkapsüle edilerek, PVS-2 ile inkubasyonuna dayanmaktadır (Fabbre ve Dereuddre, 1990). Bu teknik ile, statice (Matsumoto ve ark. 1998), nane, patates (Hirai ve Sakai, 1999), gentian (Tanaka ve ark., 2004), çilek (Hirai ve ark., 1998) gibi birçok bitkinin kriyoprezervasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

1.2.3.3.7 Damlacık Dondurma ve Damlacık Vitrifikasyon

Bu teknik, meristemlerin alüminyum folyolar üzerinde PVS-2 veya DMSO ile çeşitli sürelerde inkubasyonunu takiben, ultra hızlı bir şekilde dondurulmalarını tanımlamaktadır. İlk olarak patates gövde uçlarının kriyoprezervasyonunda (kriyokoruyucu olarak DMSO uygulanmıştır) kullanılmıştır (Schafer – Menhur ve ark., 1997). Daha sonra, kriyokoruyucu olarak, PVS-2 ozmo aktif çözelti kullanılarak muz (*Musaceae*) ve *Colocasia esculenta* var. *esculenta* bitkilerinde denenmiştir (Panis ve ark. 2005; Sant ve ark. 2008). Teknik temel olarak vitrifikasyon prosedürleriyle aynıdır. Ancak diğer vitrifikasyon süreçlerinden ayıran en temel özelliği, eksplantların yaklaşık 1 mm X 3 mm alüminyum folyolar üzerinde bulunan yaklaşık 4 µl PVS-2 damlacıklarının içerisine yerleştirilmesi esasına dayanmaktadır.

İşlem eksplantların 23°C' ta veya 0°C' ta belirli bir süre dehidratasyonunu takiben, folyoların içlerine sıvı azot doldurulmuş kriyoviallerin içine aktarılması ile gerçekleşir ve kriyoviallerin de sıvı azot tankına daldırılmasıyla, kriyoprezervasyon tamamlanır. Çözme işlemi ise 1,2 M sukroz besiyeri içerisinde 25°C' ta ultra hızlı bir şekilde gerçekleştirilir ve ardından eksplantlar rejenerasyon besiyerine aktarılır.

Damlacık dondurma ve vitrifikasyon tekniğinin en önemli özelliği, geniş bir genotip aralığındaki bitkilere uygulanabilmesidir (Leunufna ve Keller 2003,2005, Sakai ve Engelmann 2007; Sakai ve ark. 2008; Kim ve ark. 2006,2007). Teknik günümüzde en çok kullanılan kriyoprezervasyon yöntemlerinden birisidir.

1.3 *Sequoia sempervirens* D. Don. (Endl.)

1.3.1 KÖKENİ VE YAYILMA ALANLARI

Taxodiaceae ailesinin bir üyesi olan *Sequoia* genusunun, Kratese döneminde kalan, *Rhombostrobus* genusunun bir kolundan köken aldığı düşünülmektedir (LaPasha ve Miller, 1981). *Sequoia* genusu içinde günümüzde yaşayan tek tür ise *S. sempervirens* D. Don. (Endl.) olarak bilinmektedir (Chadefaud ve Emberger, 1960). *Sequoia* genusunun şu anki yayılım alanı Amerika Birleşik Devletleri (A.B.D.)'nin, güneybatı Oregon'dan kuzeydoğu Kaliforniya'ya kadar uzanan okyanusun 60 km üzerindeki pasifik sahilleridir.

Alüvyonlu topraklarda yetişen *S. sempervirens*, *Pseudotsuga menziesii*, *Chamaecyparis lawsoniana* ve diğer konifer türleriyle birlikte bulunmaktadır (Little 1980, Watson 1993). Ayrıca 19. yüzyılda bu türün ağaçları Avrupa'ya ihraç edilmeye başlanmıştır. Türkiye'de de, 1950 yıllarından sonra ormancılık politikasındaki değişimler ile yurtdışından tür ithaline izin verilmiş ve ithal edilen türlerden birisi de *S. sempervirens* olmuştur. 1972 yıllarında da Doğu Karadeniz sahili için adaptasyon denemelerine başlanan *S. sempervirens*'in sahil şeridine oldukça iyi uyum sağladığı gözlenmiştir (Eyüboğlu ve ark. 1995).

1.3.2 GENEL ÖZELLİKLERİ

S. sempervirens, sadece uzun ömürlü olması nedeniyle değil, sahip olduğu odunun üretkenliği ve kalitesi nedeni ile de oldukça önemli her dem yeşil bir konifer türüdür (Stokey, 1981).

Bu ağaçlar, 60 – 110 metre uzunluğunda olabilmektedir. Gövdeleri, geniş ve 35 cm kalınlığında kırmızı – kahverengi, fibrilli bir kabuğa (bu kabğunun rengi nedeniyle bu ağalar İngilizcede “Redwood” olarak da adlandırılırlar) sahiptir ve reçine kanalları içermez. Monopodial bir büyüme gösteren *Sequoia sempervirens* konik bir taç yapısına sahiptir. Dalları aşağıya doğru sarmakta ve 1- 30 mm boyundaki yap-

rakları her iki yüzünde de stoma içermektedir. Poliploid olan *S. sempervirens* 66 kromozoma sahiptir (Stebbins, 1948). Birçok farklı varyeteleri tescillenmiş ve ticari olarak kullanıma sunulmuştur (Redher, 1958; Chaudun, 1977)

Bu ağacın üreme potansiyeli oldukça değişkendir, çünkü oluşturduğu tohumların bir kısmı boştur veya sahip olduğu embriyolar yapısal olarak bozuktur, dolayısıyla tohumların canlılığı %15 civarındadır, bunların da çoğu çimlenememektedir (Donnet, 1984; Bourgard ve Favre, 1989). Bu düşük canlılık, tohumla beslenen hayvanlara karşı geliştirilen bir adaptasyondur. Tohum üretimi bitki 10 – 15’li yaşlardayken başlar ve düzenli aralıklarla devam eder. Kanatlara sahip tohumlar 3,3 – 5 mg arasında çok küçük ve çok hafiftirler. Tohumlar rüzgâr ile ana bitkiden ancak 60 – 120 metre uzaklaşabilirler. Çimlenen tohumlar 20 metrelik uzunluğa 20 yıl gibi kısa bir sürede erişebilirler. Kozalakları 15 – 32 mm uzunluğunda ovoid bir yapıya sahiptir ve 15 – 25 spiral düzenlenmiş tohum içermektedir. Kış aylarında tozlaşmaya başlayan bitkilerin tohumları 8 ila 9 ay sonra olgunlaşır.

S. sempervirens ayrıca dünya üzerindeki en geniş hacimli, en yüksek ve en yaşlı canlılarından da bir tanesidir. 1998 yılında Steve Sillet ve Michael Taylor tarafından California Redwoods Eyalet Parkında keşfedilen Del Norte Titan, 10447m³’lük hacmi ve 93.57 metre uzunluğuyla dünyanın en fazla hacme sahip ağacıdır (Van Pelt, 2001). Sekoyaların dünya üzerindeki en uzun ağaçlardan biri olabileceği düşünülmektedir. Şimdiye kadar tespit edilen en uzun sekoya olan Hyperion, 115.55 m boyundadır ve Redwood Ulusal parkında bulunmaktadır. Elimizdeki bulgular, sekoyaların 2000 yıl yaşayabildiklerini göstermiştir. Fritz tarafından Kuzey Kaliforniyadaki bir ağacın yaş halkaları ölçüldüğünde ağacın 2200 yaşında olduğu ortaya çıkmıştır (Brown, 1996). Başka bir ağacın halkaları ölçüldüğünde ağacın 1935 yaşında olduğu anlaşılmıştır.

1.3.3 KULLANIMI

S. sempervirens, düşük çimlenme oranları ve genç ağaçların soğuğa karşı hassasiyeti nedeniyle, uzun yıllar ticari amaçlar için kullanılamamıştır. Bununla beraber, çok soğuk geçen kış mevsimlerine dayanabilen olgun ağaçlar, yeniden ormanlaştırma çalışmaları için en uygun tür olarak göze çarpmaktadır (Donnet, 1984). Ayrıca bu ağaçlar; patojenlere karşı olan dirençleri (Dufrenoy, 1922; Bull, 1951; Gale, 1962; Roy, 1966) ve uzun ömürleri nedeniyle endüstriyel olarak da kullanıma oldukça uy-

gundurlar. Sahip olduğu yüksek kaliteli odun ve biyokütlesi; endüstride, kereste ve ağaç işlerinde kullanılmaktadır (Panshin ve ark., 1964).

1.3.4 UYGULANAN KORUMA PROGRAMLARI

1800' lü yıllarda, Avrupa'dan Amerika'ya doğru başlayan göçler nedeni ile Amerika kıtası üzerinde yeni yerleşim alanları açılmaya başlanmıştır ve alanların açılabilmesi için bolca keresteye ihtiyaç duyulmuştur. Sahil sekoyası ise sahip olduğu kolay işlenebilen kaliteli odunu nedeniyle en çok kesilen ağaç olmuştur. Sekoya kesiminin başladığı 1850'li yıllara kadar 800 bin hektarlık sekoya ormanları bulunmaktaydı. Bundan sonraki 60 yıl içinde Avrupa'dan göç edenler yüzünden bu sayı yüzlerce hektara kadar inmiştir. 1910'ların sonunda antik sekoya ormanlarının neredeyse hepsi kesilmişti.

1918 yılında Amerikan doğal tarih müzesi palentolojisti Henry Fairfield Osborn, New York Zooloji Cemiyetinden Madisson Grand ve Kaliforniya Üniversitesinden John Meriam, Redwood'ları Kurtarma Cemiyetini (Save the Redwoods League) kurmuştur. Bu topluluk kar amacı gütmeyen bir organizasyon olup bu ağaçları korumak için Kaliforniya bölgesindeki sekoya ormanlarını satın almaya başlamıştır. Bağışlar ve bütçe desteği sayesinde topluluk 1920 ve 1960'lı yıllar arasında 400 bin hektar sekoya ormanı satın almıştır. Bu çabalar sonucunda 1920'li yıllara kadar Jedediah Smith Redwoods State Park, Del Norte Coast Redwoods State Park, Prairie Creek Redwoods State Park ve Humboldt Redwoods State Park gibi parklar kurulmuştur.

Günümüze kadar bu topluluk Redwood'ların korunması için çalışmaya devam etmiştir. Günümüzde orijinal Sekoya ormanlarının ancak %10'luk bir kısmı kurtulabilmiştir. Bu kalan kısım ise tamamen *in situ* koruma programları ile korunmaktadır. 1994 yılında Kaliforniya sahil bölgesi dünya mirası listesine alınmış ve buradaki sekoya parkları "biyosfer rezervi" adı ile adlandırılmıştır. Ayrıca günümüzde Sekoya ağaçları IUCN kategorilerine göre "Kaybolma tehlikesi taşıyan, Vulnerable" olarak, biyoçeşitliliği tehlikede olan türler sınıfına alınmıştır (www.savetheredwoods.org).

1.3.5 YAPILAN ÇALIŞMALAR

S. sempervirens ile yapılan ilk *in vitro* kültür çalışması, Restool (1956) tarafından gövde ucu segmentlerinin *in vitro* koşullara adaptasyonunu incelemekle gerçekleştirilmiştir. Ardından Murashige (1977), *in vitro* gelişimi arttırmak ve köklenmiş bitkicikler elde etmek için besiyeri formülasyonu geliştirmek için çalışmıştır. Bu ilk çalışmaları takip eden yıllarda, *Sequoia sempervirens* bitkisinde *in vitro* rejenerasyon birçok araştırmacı tarafından gövde, embriyo, kotiledonlar ve hipokotil gibi farklı eksplant türleri kullanılarak bütün yönleriyle çalışılmış (Thorpe ve ark., 1991), gövde eksplantları kullanılarak elde edilen kültürlerin, çoğalmaları, uzamaları ve köklenmeleri incelenmiştir (Walker, 1986; Fouret ve ark. 1986; Fouret ve ark., 1989). Mikroçoğaltım, gövde, yaprak, olgunlaşmamış embriyo gibi birçok farklı eksplantlarla da denenmiştir (Que, 1983; Walker ve ark., 1985; Fouret ve ark., 1988; Hunter ve O'Donnel, 1989; Sul ve Korban 1994, 2005; Chen ve ark., 2003; Hu ve ark., 2003).

Farklı sitokininlerin (BA (Walker ve ark. 1985; Fouret ve ark. 1989), Kinetin (Boulay, 1987; Ball ,1987) ve BPA (Ball, 1987)) gövde çoğalması üzerindeki etkileri de pek çok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Ancak Ill Whan Sul ve arkadaşları (1994), 5 farklı genotipteki *S. sempervirens* bitkiciklerinde farklı sitokininleri karşılaştırmalı olarak deneyerek *in vitro* rejenerasyon kapasitesini incelemişlerdir. Bu çalışmada; Zeatin, Kinetin, TDZ, 2-İp, BA, BPA ve BA+AH (Adenin hemisülfat) bitki büyüme düzenleyicileri değişik konsantrasyonlarda kullanılmış ve tüm genotipler incelendiğinde 15 µM zeatin konsantrasyonun 3 farklı klon için en iyi proliferasyonu sağladığı belirlenmiştir. İkinci en yüksek proliferasyon ise 2-İP ile sağlanırken, TDZ kullanılan klonlarda nekroz olduğu belirlenmiştir. Adenin hemisülfat ilavesi ise, gövde proliferasyonunu azaltıcı bir etki göstermiştir, Bir başka çalışmada *in vitro* çoğaltım için MS besiyerine (Murashige ve Skoog ,1962) 2.2×10^{-6} M BA ve 5×10^{-8} M NAA ilave edilmiş (Boulay, 1989), elde edilen aksiller tomurcukların uzaması için ise, eksplantlar 20 gr/lt AK içeren MS besiyerine aktarılmıştır (Boulay, 1987).

Aynı araştırmacılar 3 farklı genotipteki sekoya bitkilerinin yaprakları değişik konsantrasyonlarda (0,5, 10, 15 ve 20 µM BA ile BPA ve 0, 0,1, 0.5 ve 1 µM 2,4-D) ile inkübe ederek direk organogenezi incelemiştir. Çalışma sonucunda 3 farklı

genotipin de farklı sonuçlar verdiği, ancak besiyerine 2,4-D ilavesinin tüm genotiplerde organogenez verimini arttırdığı ve adventitif tomurcuk gelişimini etkilediği belirlenmiştir. Ayrıca BPA ile kombine edilen 2,4-D 'nin BA' ya göre daha iyi proliferasyon verdiği gözlenmiştir.

Gerçek ve Şahin (2002) tarafından yapılan bir çalışmada ise, farklı indol butirik asit (IBA) (3, 3,5, 3, 2,5 mg/lt) ve indol asetik asit (IAA) (2, 1.5, 1, 0,5 mg/lt) konsantrasyonlarının köklenme ve gövde oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda, 1 mg/lt IAA ve 4 mg/lt IBA konsantrasyonlarının, köklenme ve gövde gelişimi üzerinde olumlu etki yaptığı sonucuna varılmıştır.

1.4 TEZİN AMACI VE LİTERATÜRE KATKISI

Genel bilgiler bölümünde de anlatıldığı gibi, mikroçoğaltım amacıyla yapılan farklı *in vitro* çalışmalara rağmen, sekoya bitkisi günümüzde yalnızca “Jedediah Smith Redwoods State Park”, “Del Norte Coast Redwoods State Park”, “Prairie Creek Redwoods State Park” ve “Humboldt Redwoods State Park” gibi biyosfer rezervlerinde *in situ* koruma programları ile korunmaktadır. Yine biyoçeşitliliği koruma yöntemlerinde belirtildiği üzere *in situ* koruma stratejileri yangın, patojen saldırısı, kötü iklim koşulları gibi doğal etkenlere açıktır. Ayrıca sekoya tohumlarının gösterdiği düşük canlılık hem bu ağaçların tohum bankalarında saklanması engellemekte hem de *in situ* koruma stratejileri için bir sorun teşkil etmektedir.

Bununla beraber; orta süreli saklamayı sağlayan yavaş büyütme ve uzun süreli saklamayı sağlayan kriyoprezervasyon gibi *in vitro* koruma yöntemleri, germplazmaların hem kısıtlı bir alanda korunması hem de genetik kararlılığın kontrol edilmesini sağladıklarından, çevre şartlarına açık olan *in situ* koruma yöntemlerinde karşılaşılan sorunları ortadan kaldırma potansiyeli sayesinde son yıllarda geleneksel yöntemlere tamamlayıcı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Sekoya bitkisinde *in vitro* rejenerasyon yöntemlerinin daha önce çalışılmış olması da orta ve uzun süreli koruma tekniklerinin bu bitkide uygulanması için kolaylaştırıcı bir etkidir. Ancak günümüzde konifer türlerinde uzun süreli saklama (kriyoprezervasyon) çoğunlukla kontrollü soğutma yöntemleri ile embriyonik kültürler üzerinde uygulanmaktadır. Tek aşamalı dondurma yöntemlerinin konifer türleri üzerinde uygulanmasına dair çok az çalışma bulunmaktadır. Bu yüzden bu tez çalış-

ması hem konifer bitkileri üzerinde yapılan ilk tek aşamalı dondurma çalışmalarından biri hem de sekoya bitkisi üzerinde yapılan ilk *in vitro* koruma çalışması olacaktır. Bu nedenle çalışma, konifer bitkileri üzerinde uygulanacak olan tek aşamalı kriyoprezervasyon yöntemlerine öncülük edecektir.

2 GEREÇ VE YÖNTEM

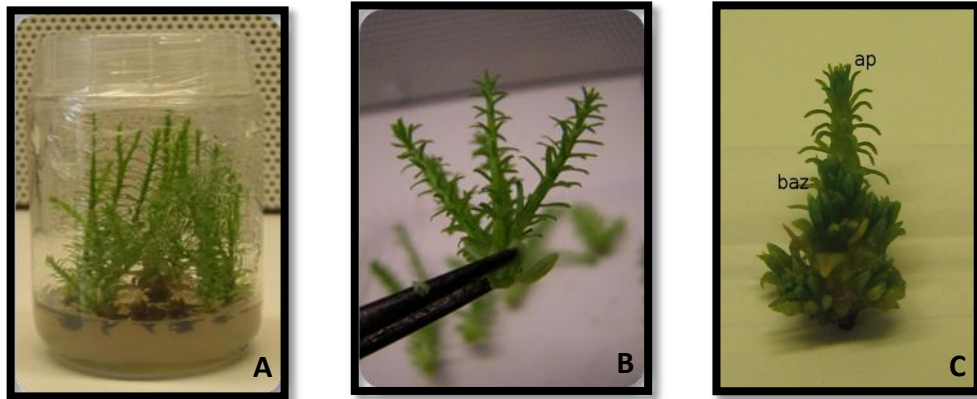
2.1 GEREÇLER

2.1.1 BİTKİ MATERYALİ

Sequoia sempervirens (D. Don.) Endl. *in vitro* gövde kültürleri, Floransa (İtalya)' da bulunan elit bir ağaçtan alınan apikal gövde uçlarının 1 mg/lt BA içeren MS besiyerine aktarılması ile elde edildi. Elde edilen *in vitro* gövdelerin periyodik alt kültürleri 4 haftada bir taze besiyerine aktarılması yoluyla yapıldı. Tez kapsamında yapılan bütün deneylerde bu kültürlerden elde edilen apikal ve bazal tomurcuklar ile tüm gövdeler kullanıldı (Şekil 2-1).

2.1.2 TEZ KAPSAMINDA KULLANILAN SARF MALZEMELER VE CİHAZLAR

Bitki materyallerinin alt kültürlenmesi ve deneylerin yürütülmesinde Duchefa firmasından temin edilen Vitrovent ® kültür kapları (200 ml kapasiteli) ile Sigma firmasından temin edilen bebek maması kapları (170 ml kapasiteli) ve cam petri kapları (9 cm Ø, 30 ml kapasiteli) kullanıldı. Tüm kültür kapları ve deneyler için gerekli olan cihazlar ve sarf malzemelerinin ve cihazların listesi çizelgede ve şekilde verilmiştir (Çizelge 2-1, Çizelge 2-2, Şekil 2-2).



Şekil 2-1: Çalışmada kullanılan *Sequoia sempervirens* bitkileri. (A) Bebek maması kaplarında kültürlenmiş bitkiler. (B) Yatay akımlı steril kabin altında alınmış çoklu gövdeler. (C) Deneylerde kullanılan apikal ve bazal tomurcukları içeren bitki.

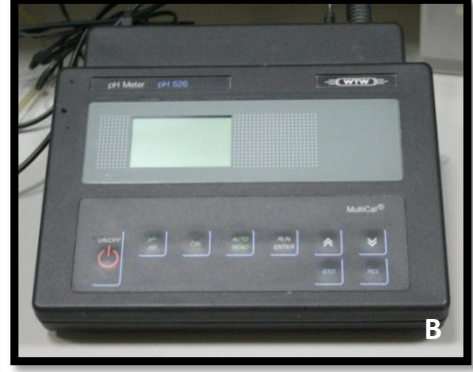
Doku kültürü deneyleri steril kabin içerisinde gerçekleştirildi ve kullanılan bistüri, pens gibi malzemelerin sterilizasyonunda kuru sterilizatör kullanıldı.

Çizelge 2-1: Deneylerde kullanılan kimyasal sarf malzemelerinin listesi.

Kimyasal Adı	Üretici Firma
Etanol	Prolab Kimya
Myo-Inositol	Sigma I-3011
Thiamine HCl	Sigma T-3902
Nikotinik Asit	Sigma N-0765
Piridoksin HCl	Sigma P-8666
L-Glisin	Merck K 27061401
Sukroz	Merck L 01614
Gelrite	Merck G 1101
NaOH	Merck 06462
DMSO	Merck 1.02952
Gliserol	Merck 1.04093
Etilen Glikol	Merck 1.00949

Çizelge 2-2: Çalışmada kullanılan gereçler.

Cihaz Adı	Cihazın Markası
+4 °C Buzdolabı	Indesit
-20 °C Buzdolabı	Indesit
Analitik Terazı	Sartorius BL3100
Bitki Büyütme Odası	BOTES Klima Taahüt San. ve Tic. Ltd.
Hassas Terazı	Sartorius BL2105
Manyetik Karıştırıcı	Schoot
Otoklav	Hirayama HVE-50
PH metre	WTW pH526
Sterilizatör	Sigma S-3273
Yatay akımlı	Heraeus



Şekil 2-2 : Deneylerde kullanılan cihazlar. (A) Manyetik karıştırıcı. (B) pH metre. (C, D) Bitki doku kültürü odası. (E) +4°C ve -20°C dolaplar. (F) Sıvı azot tankı

2.2 YÖNTEM

2.2.1 BESİYERİ İÇERİĞİ VE KÜLTÜR ŞARTLARI

Çalışmalarda kullanılan tüm besiyerleri şeker olarak 30 gr/lt sukroz ve katılaştırıcı olarak 3 gr/lt gelrite veya 7 gr/lt agar içermekteydi. Besiyerlerinin pH'sı otoklav öncesinde 1 N NaOH veya HCl kullanılarak 5,8 – 6,0' a ayarlandı. *Sequoia sempervirens* bitkileri, 1 mg/lt BA içeren MS besiyerinde 16/8 saat fotoperiyod altında, 23°C koşullarda ve bitki büyütme odasında kültürlendi.

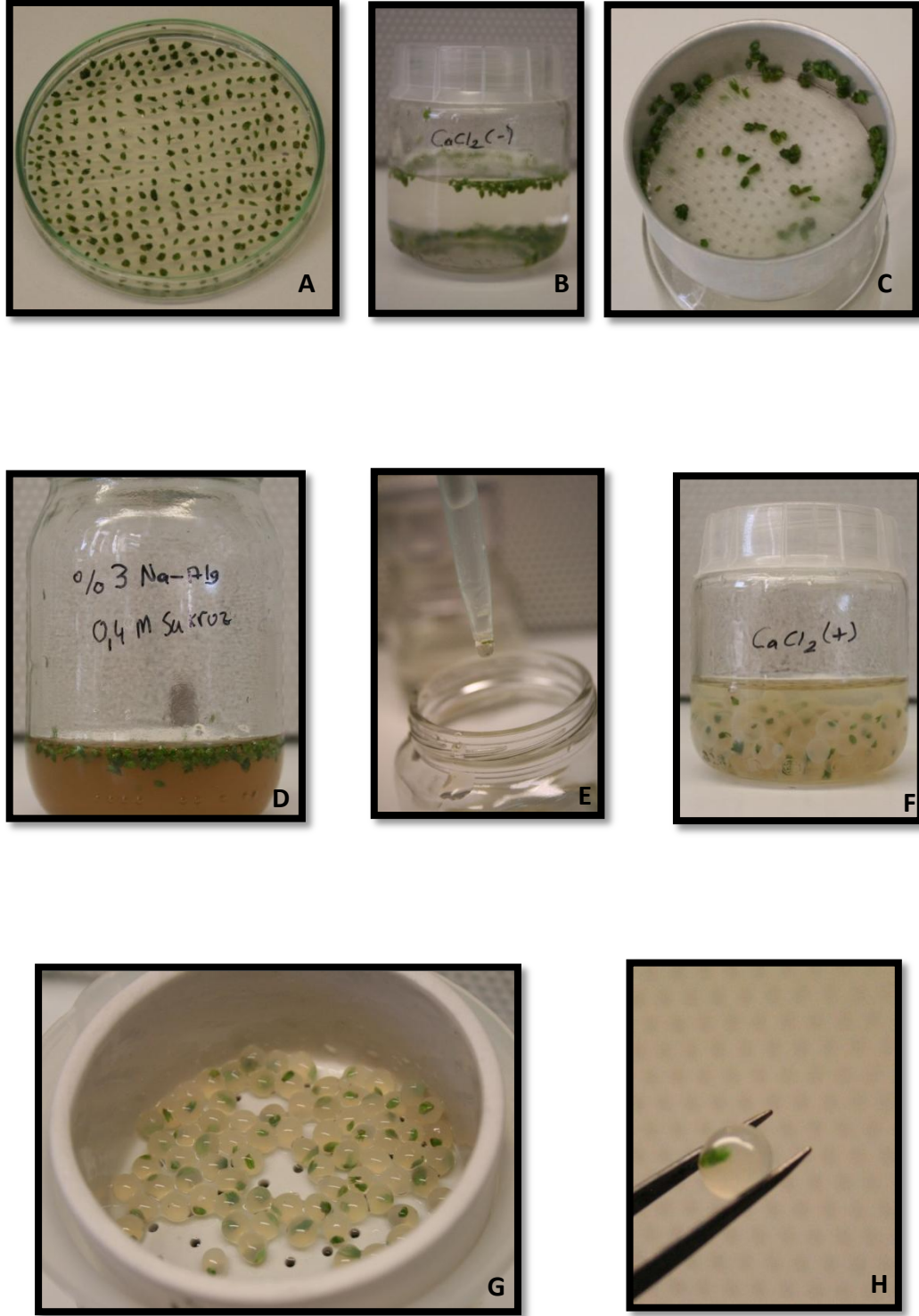
Orta süreli saklama deneyleri için MS0, 1 mg/lt BA içeren MS, QL0, 1 mg/lt BA içeren QL yarı katı besiyerleri kullanıldı.

En iyi rejenere olabilen tomurcuk çeşidi ve en uygun rejenerasyon besiyerinin belirlenmesi amacıyla 6 farklı besiyeri MS0, 1 mg/lt BA içeren MS, 20 gr/lt AK içeren MS, QL0, 1 mg/lt BA içeren QL, 20 gr/lt AK içeren QL) denenmiştir. Deneylerde kullanılan tüm besiyerleri otoklav kullanılarak 121°C 'ta 20 dakika steril edilmiş ve yatay akımlı kabin altında kültür kaplarına döküldü.

2.2.2 SENTETİK TOHUMLARIN HAZIRLANMASI

Sentetik tohumlar Redenbaugh ve ark. (1986) tarafından geliştirilen yöntemle göre hazırlandı. Buna göre (Şekil 2-3):

- Hâlihazırda CaCl_2 içeren yarı katı MS besiyerinde kültürlenen tomurcukların kalsiyumdan arınmaları için 5 dakika boyunca CaCl_2 içermeyen 0,4 M sukroz içeren sıvı MS besiyeri ile hazırlanan besiyerinde yıkandı.
- Tomurcuklar daha sonra 0,4 M sukroz içeren sıvı MS besiyeri ile hazırlanan Na- aljinat solüsyonu ile 20 – 30 dakika muamele edildi.
- Bu sürenin sonunda Na – Alg solüsyonu otomatik pipet yardımıyla alınarak her damlada 1 tomurcuk olacak şekilde damla damla, 100 mM CaCl_2 çözeltisine aktarıldı ve 20 – 30 dakika süreyle kapsüllerin sertleşmesi için bekletildi.



Şekil 2-3 : *S. Sempervirens* apikal veya bazal tomurcuklarını içeren Sentetik tohumların hazırlanma süreci: (A) Enkapsüle edilecek olan apikal veya bazal tomurcuklar. (B) Tomurcukların CaCl_2 içermeyen besiyerinde 5 dakika süreyle yıkanmaları. (C) Süzülen tomurcuklar. (D) Tomurcukların %3 Na-aljinat ve 0,4 M sukroz içeren MS besiyerinde bekletilmeleri. (E) Tomurcukların otomatik pipet yardımıyla 100 mM CaCl_2 içeren çözeltiliye damla damla aktarılımları. (F) Ca-aljnat kapsüllerin oluşması. (G) Süzölmüş sentetik tohumlar. (H) Tek bir tomurcuk içeren sentetik tohum.

- Sertleşen sentetik tohumlar steril süzgeç yardımıyla toplandı ve steril dH₂O ile 1 – 2 kez yıkandı.
- Süzgeçten alınan sentetik tohumlar yavaşlatılmış büyütme veya kriyoprezervasyon deneylerinde kullanıldı.

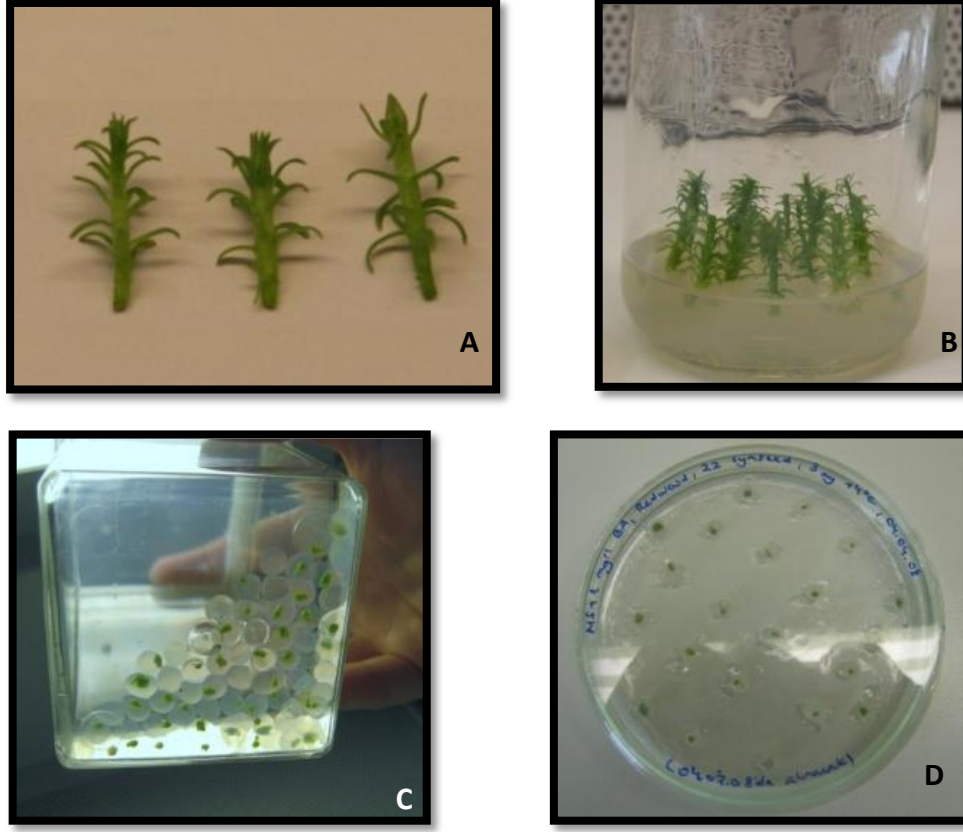
2.2.3 ORTA SÜRELİ SAKLAMA

2.2.3.1 Gövde Kültürlerinin Saklanması

Standart bitki büyüme koşullarında (23°C, 16/8 saat fotoperiyod) alt kültürlenen bitkilerden alınan yaklaşık 1 cm boyundaki tekli gövdeler, 4 farklı besiyerine (MS 0, 1 mg/lt BA içeren MS, QL 0 ve 1 mg/lt BA içeren QL) aktarıldı. 2 hafta süreyle kültürlenen bitkiler daha sonra karanlık koşullarda +4°C' ye kaldırılıp 15 ay süreyle saklandılar (Şekil 2-3 A, B). Saklama süresince, 3 aylık periyotlarda, bir grup gövde kültürü standart bitki büyüme şartlarına geri alınarak bitki gelişimleri gözlemlendi.

2.2.3.2 Sentetik Tohumların Saklanması

In vitro gövde kültürlerinden izole edilen apikal ve bazal tomurcuklar 1 mg/lt BA içeren taze MS besiyerlerine alınarak +4 °C' ta ve karanlık koşullarda soğuğa alıştırıldı. Daha sonra 0,5 M sukroz içeren MS besiyerinde 24 saat süreyle standart büyüme koşullarında ön kültürlendi (Şekil 2-4 A, B). Bunu takiben yukarıda ayrıntılı olarak tarif edilen protokole uygun olarak hazırlanan sentetik tohumlar, MS 0, 1 mg/lt BA içeren MS, QL 0 ve 1 mg/lt BA içeren QL besiyerlerine aktarıldılar ve 15 ay süreyle +4 °C' ta saklamaya alındılar (Şekil 2-4 C, D). Gövde kültürlerinde olduğu gibi, burada da her 3 ayda bir, bir grup sentetik tohum standart büyüme koşullarına geri alınarak tohum çimlenmesi ve bitki gelişimleri izlendi.



Şekil 2-4 : *In vitro* gövde kültürlerinin ve apikal ve bazal tomurcukları içeren sentetik tohumların orta süreli saklanması. (A, B) +4°C' a aktarılan yaklaşık 1 cm uzunluğundaki tekli *Sequoia sempervirens* gövdeleri. (C, D) +4°C' a aktarılan apikal ve bazal tomurcukları içeren sentetik tohumlar.

2.2.4 UZUN SÜRELİ SAKLAMA

Kimyasal vitrifikasyona dayalı üç farklı tek-aşamalı dondurma tekniği *S. sempervirens* apikal ve bazal tomurcuklarının uzun süreli saklanması için denendi. Denenen yöntemler: (a) vitrifikasyon (b) enkapsülasyon – vitrifikasyon ve (c) damlacık dondurma. Ayrıca sıvı azotta saklanmaya karşı toleransın artırılması amacıyla, kriyokoruma öncesindeki soğuğa alıştırma ve sukroz önkültürü basamaklarının etkileri de araştırıldı.

2.2.4.1 Soğuğa Alıştırma ve Önkültür Şartlarının Belirlenmesi

Son altkültürden 14 gün sonra alınan gövdeler +4°C, karanlık koşullara alındı ve 1, 2, 3 veya 4 hafta boyunca soğuğa alıştırıldı. Daha sonra bu bitkilerden alınan apikal, aksiller ve bazal tomurcuklar 6 farklı besiyerine (MS 0, 1 mg/l BA içeren

MS, 20 gr/lt AK içeren MS, QL 0, 1 mg/lt BA içeren QL ve 20 gr/lt AK içeren QL) aktarıldı ve standart büyüme koşullarında kültürlendi. Eksplantların 4 haftalık büyüme periyodu sonucundaki canlılık ve rejenerasyon oranları belirlenerek en uygun soğukta bekletme koşulu belirlendi.

Önkültür şartlarının optimizasyonu amacıyla soğuğa alıştıran veya alıştırmayan, apikal ve bazal tomurcuklar 0,12 – 0,25 – 0,5 M sukroz içeren QL besiyerinde 24 – 48 veya 72 saat süreyle standart büyüme koşullarında kültürlendi. Ardından tomurcuklar 20 gr/lt AK içeren QL rejenerasyon besiyerine aktarıldı. Tomurcukların canlılık ve rejenerasyon oranları 4 haftalık ilk altkültür periyodu sonunda kaydedildi ve optimal sukroz önkültür koşulları belirlendi.

2.2.4.2 Vitrifikasyon

Tek aşamalı kriyoprezervasyon tekniklerinden biri olan vitrifikasyon, soğuğa alıştırma ve sukroz ön kültür süreçlerinin ardından 2mL'lik kriyoviallere aktarılan tomurcukların (15 tomurcuk/kriyovial) önce 30 dakika boyunca LS, ardından da 15, 30, 45, 60..., 180 dakika arasında 0°C' ta PVS-2 ile muamele edilmeleri ile gerçekleştirildi. Bu süreçlerin ardından tomurcuklar 2 farklı gruba ayrıldı. İlk grup 0,6 ml taze PVS-2 ile inkübe edilerek doğrudan sıvı azota daldırılırken, ikinci grup kontrol olarak kullanıldı ve buna göre PVS-2 uygulamasının ardından 1,2 M sukroz içeren MS besiyeri ile 25°C' ta 20 dakika boyunca yıkanarak 20 gr/lt AK içeren QL rejenerasyon besiyerine aktarıldı ve standart büyüme koşullarında kültürlendi.

Sıvı azota giren tomurcuklar ise en az 1 saatlik saklama süresinin ardından 40°C su banyosunda 2 dakika bekletilerek çözüldü. Ardından 1,2 M Sukroz içeren sıvı MS besiyerinde 30 dakika yıkanarak, 20 gr/lt AK içeren QL rejenerasyon besiyerine aktarıldı (Şekil 2-5).

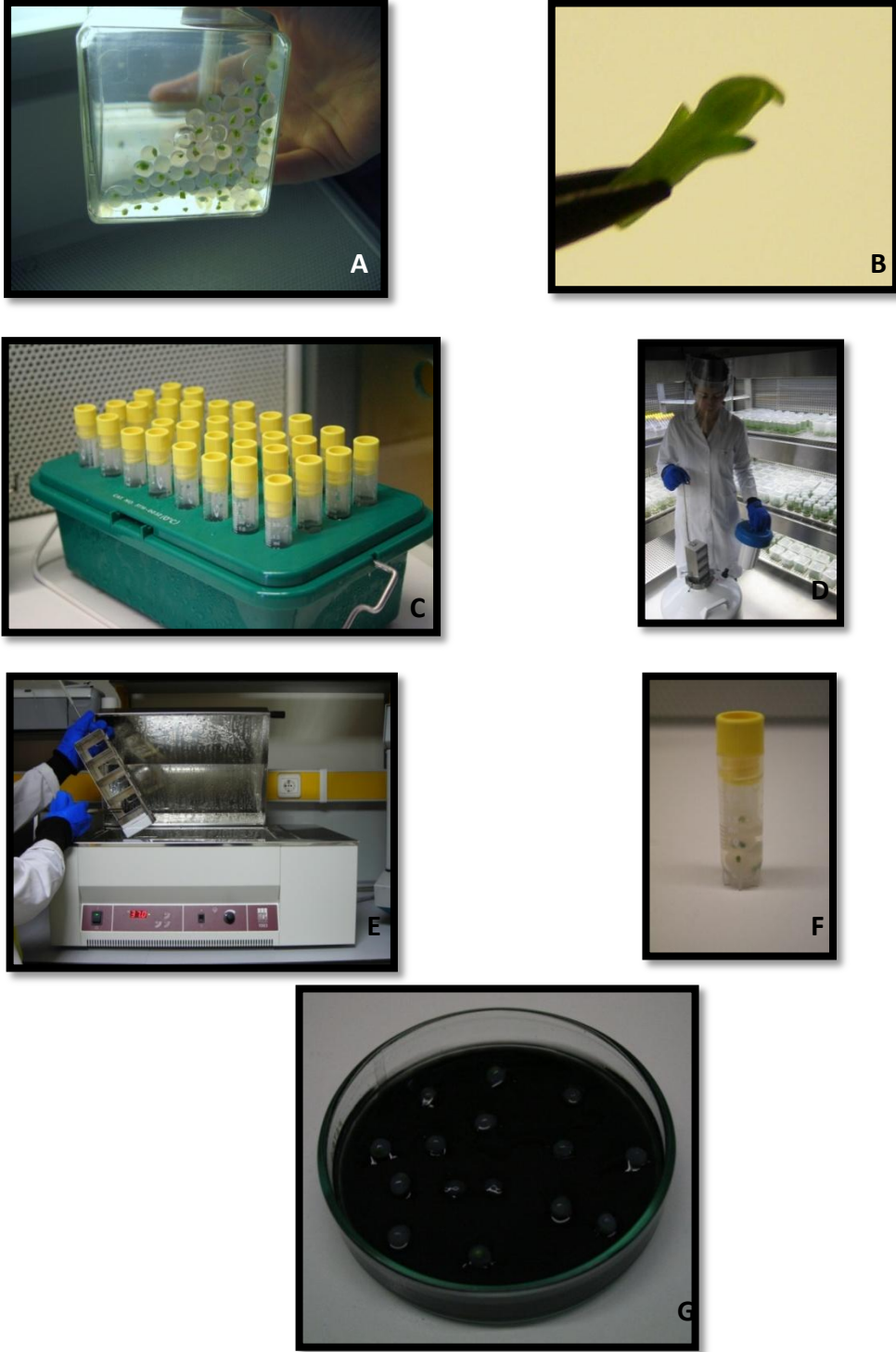
2.2.4.3 Enkapsülasyon Vitrifikasyon

Soğuğa alıştırma ve sukroz önkültür optimizasyonlarını takiben tomurcuklar daha önce anlatıldığı şekilde enkapsüle edildi ve elde edilen sentetik tohumlar 2mL kriyovialler içerisinde (5-6 sentetik tohum/kriyovial) vitrifikasyon protokolünde olduğu üzere önce 30 dakika boyunca oda sıcaklığında LS ile, daha sonra da 15, 30, 45, 60..., 180 dakika arasında 0°C' ta PVS-2 ile muamele edildi.

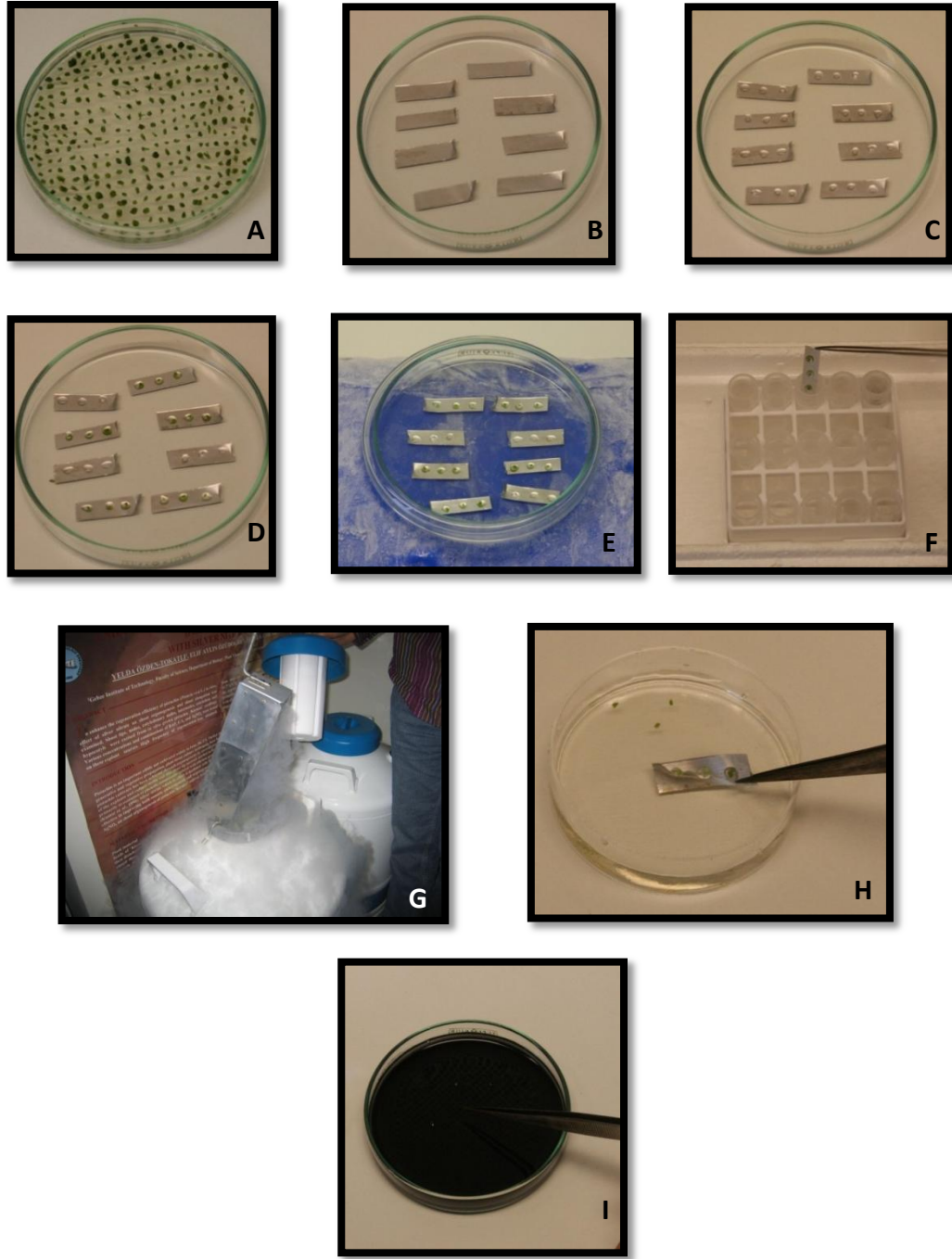
Örnekler daha sonra kontrol (SA-) ve sıvı azot (SA+) grupları olarak ikiye ayrıldı. Sıvı azot grupları taze PVS-2 eklenerek doğrudan sıvı azot içine daldırılmış ve en az 1 saat süreyle sıvı azot içinde bekletildi. Ardından 40°C' ta sıcak su banyosunda 2 dakika süreyle çözülen sentetik tohumlar 1,2 M sukroz besiyeri ile 30 dakika yıkanarak 20 gr/lt AK içeren QL rejenerasyon besiyerine aktarıldı. Kontrol grupları ise sıvı azota aktarılmadan doğrudan MS + 1,2 M Sukroz besiyerinde çözülüp 20 gr/lt AK içeren QL besiyerine aktarıldılar (Şekil 2-5).

2.2.4.4 Damlacık Dondurma

Önceden hazırlanmış steril alüminyum folyolar (yaklaşık 5 X 15 mm boyutlarında) petri kaplarına alındı ve sıcaklıklarının 0°C olması için, buz şarjlarının üzerine yerleştirildi. Her bir folyo üzerine her biri yaklaşık 4 – 5 µl miktarında 3 damla PVS-2 damlatıldı. Soğuğa alıştırmaya ve önkültür süreçlerinden geçen tomurcuklar her damlada 1 tomurcuk olarak şekilde PVS-2 damlacıklarının içine yerleştirildi ve 0°C' ta 15, 30, 45, 60..., 180 dakika boyunca muamele edildi. Daha sonra sıvı azotta saklanacak örnekler, üzerinde 3 tomurcuk içeren 1 alüminyum folyo olmak üzere önceden soğutulmuş 2 ml'lik kriyoviallere aktarıldı ve doğrudan sıvı azota daldırıldı. En az 1 saat süreyle sıvı azotta bekletilen örnekler, saklama süresi sonucunda sıvı azottan alınarak oda sıcaklığında 1,2 M sukroz çözeltisi içerisinde 30 dakika boyunca yıkanarak 20 gr/lt AK içeren QL içeren besiyerinde standart büyüme koşullarına aktarıldı. Kontrol grubu ise, PVS-2 ile inkübasyon sonrasında 1,2 M sukroz besiyerinde yıkanarak rejenerasyon besiyerine aktarıldı (Şekil 2-6).



Şekil 2-5 : Enkapsülasyon – Vitrifikasyon ve Vitrifikasyon tekniklerindeki adımlar: (A, B) Enkapsüle edilen eksplantlar ve kullanılan tomurcuklar (C) Eksplantların 1,2 mL LS ile 25 °C’ de inkübe edilmesi ve eksplantların 0°C’ ta PVS-2 ile 15, 30, 45, ... 180 dakika sürelerle etkileşime sokulmaları. (D) Sıvı azota aktarım. (E) 40°C ‘ta 1, 2 dakika süreyle çözme. (F) Eksplantların 1,2 M sukroz ile 30 dakika süreyle yıkanmaları (G). Bu Eksplantların 20 gr/lt AK içeren QL rejenerasyon besiyerine aktarılmaları.



Şekil 2-6 : Damlacık dondurma yöntemi ile *S. sempervirens* bitkisinin apikal ve bazal tomurcuklarının kriyoprezervasyonu. (A) Önkültür sürecinden gelen tomurcuklar. (B) Steril alüminyum folyolar. (C) Yaklaşık 4 mikrolitre PVS-2 damlatılan alüminyum folyolar. (D) Tomurcukların damlacıkların içine yerleştirilmesi. (E) 15-180 dakika süreyle 0°C' ta inkübe edilmeleri. (F) İçinde sıvı azot bulunan 2mL'lik kriyoviallere koyulan alüminyum folyolar. (G) Doğrudan sıvı azota aktarılma. (H) Sıvı azottan alınan tomurcukların hızlı bir şekilde 1,2 M sukroz içeren MS besiyerinde 30 dakika süreyle çözülmesi. (I) Tomurcukların 20 gr/lt AK içeren QL besiyerine aktarılımları.

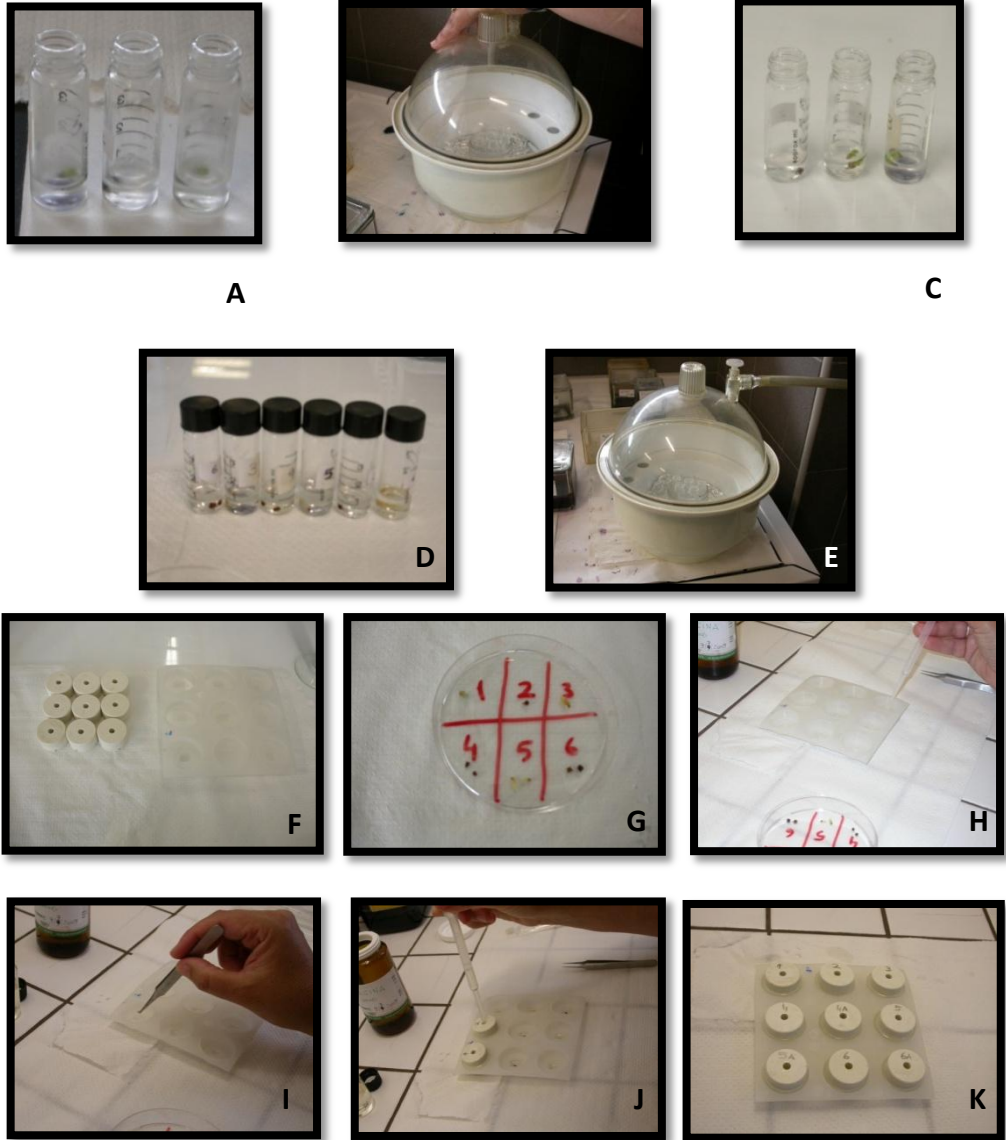
2.2.4.5 Histoanatomik analizler

Histoanatomik analizlerde damlacık dondurma yöntemi kullanılarak dondurulan ve sıvı azotta saklama sonucunda canlılıklarını koruyan veya koruyamayan örnekler ile kontrol grubu tomurcuklarından canlılıklarını koruyan veya koruyamayan çeşitli örneklerden kesitler alındı. Örnekler hazırlanırken 4 aşamalı bir prosedür izlendi. (i) Tomurcukların dehidratasyonu (ii) Historesin içinde bloklama (iii) Mikrotom ile kesim (iv) Pas-Amido siyah boyama.

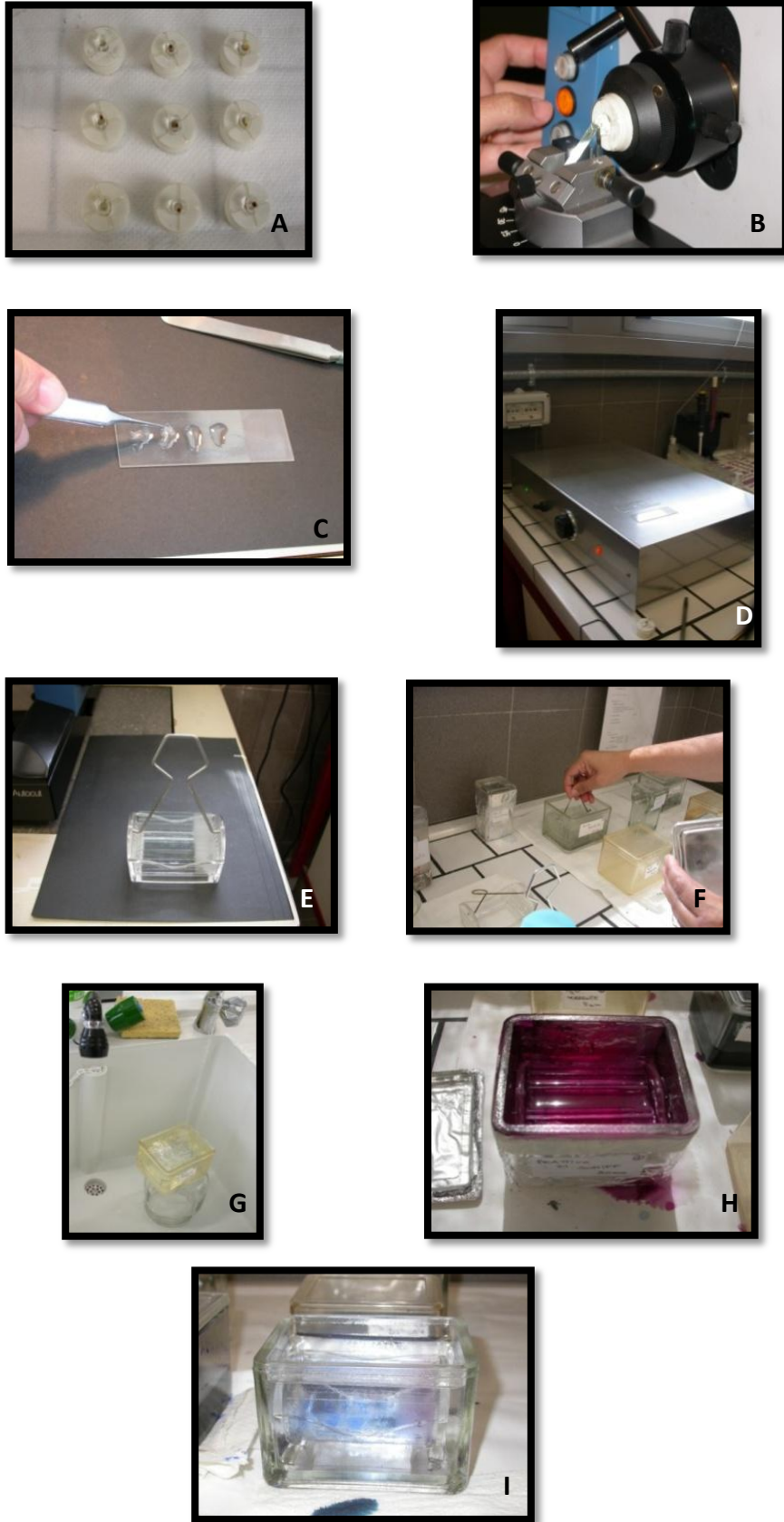
- i. Tomurcukların dehidratasyonu
 - Glutaraldehit + Formaldehit (2:2) solüsyonu içinde +4°C' ta 24 saat bekletildi (Şekil 2-7 A).
 - 24 saat sonunda örnekler 30 dakika boyunca vakumlandı (Şekil 2-7 B).
 - Etilen glikol mono metil eter solüsyonunda 4°C' ta 24 saat bekletildi (Şekil 2-7 C).
 - Saf Alkol içinde 4°C' ta 24 saat bekletildi (Şekil 2-7 D).
 - 30 dakika boyunca vakumlandı (Şekil 2-7 E).
 - Saf Alkol + Historesin (1:1) 4°C 24 saat bekletildi.
 - Historesin solüsyonunda birkaç saat bekletildi.
- ii. Sabitleme: 15 ml Historesin + 1 ml katılaştırıcı madde içeren solüsyonun bir kısmı kalıplara döküldü, üzerine örnekler yerleştirildi ve solüsyon eklendi. Kalıpların kapakları kapatıldı ve historesinin iyice donması için 1 – 2 gün bekletildi (Şekil 2-7 F, G, H, I, J, K).
- iii. Mikrotom ile kesim: Historesin kalıplar mikrotoma yerleştirildi ve çeşitli kalınlıklarda kesitler alındı (0,2 – 1 mikron). Her bir kesit dikkatlice lamın üzerinde bulunan su damlacığının içine yerleştirildi (her bir lamda 4 damlacık) ve lamlar sıcak tabla üzerine alınarak suyun buharlaşması ve bu sırada da örneğin lam üzerine sabitlenmesi sağlandı (Şekil 2-8 A, B, C, D).
- iv. Pas-Amido siyah boyama: Boyama işlemi birbirini takip eden, aşağıdaki basamaklar yoluyla yapıldı. Buna göre, kesitleri içeren lamlar sırasıyla:
 - %1 Periyodik asit ile 10 dakika muamele edildi (Şekil 2-8 E, F)

- Musluk suyu ile 5 dakika yıkandı(Şekil 2-8 G)
- Schiff ile 30 dakika muamele edildi(Şekil 2-8 H)
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (%0,5) 2,5 dakika muamele
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (%0,5) 2,5 dakika muamele
- Akan musluk suyunda 10 dakika yıkandı
- Amido siyah boyama, 2 dakika
- Asetik asit ile yaklaşık 5 dakika muamele (Şekil 2-8 I)
- Distile su ile 2 – 3 kes 1 – 2 dakika boyunca yıkandı
- Sıcak tabla üzerine yerleştirilerek hızla kuruması sağlandı.

Boyanan kesitler daha sonra ışık mikroskopunda incelendi ve fotoğrafları çekildi.



Şekil 2-7 : Tomurcukların dehidratasyonları ve historesine sabitleme aşamaları.



Şekil 2-8 : Tomurcukların miktrotom ile kesimi ve PAS-Amido siyah boyama çözeltilerine maruz bırakılmaları.

2.3 SONUÇLARIN ALINMASI VE İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Gövde kültürlerinin orta süreli saklanması her deneme için, her biri 15 adet gövde içeren ve rastgele seçilmiş olan 8 adet bebek maması kabı kullanıldı. 30 tane gövde kullanıldı. Sentetik tohumların saklanması ise her deneme için yaklaşık 45 sentetik tohum kullanıldı. Tüm denemeler 2 kez tekrarlandı. Gövde ve sentetik tohumların canlılık ve rejenerasyon oranları, standart kültür şartlarına alınmayı takiben, 4 haftalık alt kültür periyodu sonucunda kaydedildi.

Soğuğa alıştırma ve tomurcukları çalışmalarında yaklaşık 100 gövdeden alınan apikal ve bazal tomurcuğun 6 farklı besiyerine aktarılıp standart kültür şartlarına alındıktan 4 hafta sonra gösterdikleri canlılık ve rejenerasyon oranları alınmıştır.

Sukroz önkültürü ve kriyoprezervasyon çalışmalarında da ortalama 30 tomurcuğun standart büyüme koşullarına (sukroz önkültürü) veya rejenerasyon besiyerine (kriyoprezervasyon) aktarıldıktan sonraki canlılık ve rejenerasyon verilerine bakıldı ve denemeler en az 3 kere tekrar edildi.

Kültürlerin canlılık ve rejenerasyon sonuçları alınırken aşağıdaki adımlara dikkat edilmiştir:

- Herhangi bir tomurcuk veya gövde oluşturmayan ancak canlılıklarını koruyan eksplantların yüzdesi (canlılık yüzdesi)
- Yeni gövde veya tomurcuk oluşturan eksplantların yüzdesi (rejenerasyon yüzdesi)
- Her bir eksplant üzerinde oluşan yeni gövde sayısı (gövde/eksplant oranı)
- Her bir eksplant üzerinde oluşan yeni tomurcukların sayısı (tomurcuk/eksplant oranı)
- Eksplantların gövde oluşturma kapasitesi (her bir eksplant üzerinde oluşa ortalama gövde sayısı, GOK indeksi = gövde/eksplant oranı X rejenerasyon yüzdesi)

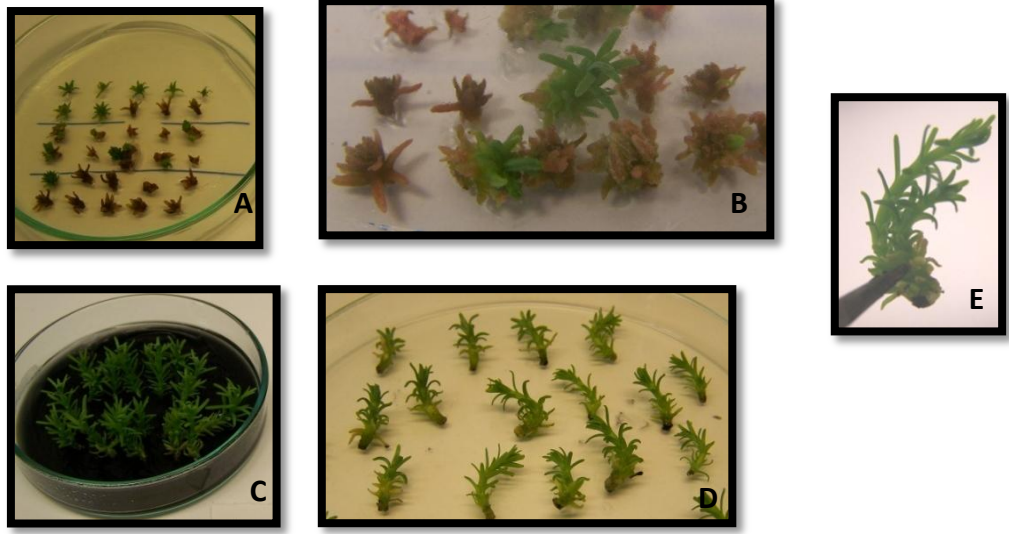
Canlılık ve rejenerasyon yüzdelerinin hesaplanmasında χ^2 testi (karşılaştırmalar iki değer arasında olduğunda) veya post hoc çoklu karşılaştırma testi (3 veya daha fazla veri karşılaştırıldığında) kullanılmıştır. Gövde veya tomurcuk sayısı ile gövde boyu sonuçları ANOVA, LSD benzerlik testi ile karşılaştırılmış ve $p \leq 0,05$ e göre benzerlik ve farklılıklar analiz edilmiştir.

3 BULGULAR

3.1 REJENERASYON BESİYERİNİN BELİRLENMESİ

Sequoia sempervirens bitkilerinden alınan apikal ve bazal tomurcukların (apikal ve bazal) gelişim ve rejenerasyonları farklı besiyeri çeşitlerinde (MS 0, 1 mg/lt BA içeren MS, 20 gr/lt Ak içeren MS, QL 0,1 mg/lt BA içeren QL ve 20 gr/lt AK içeren QL) denemiş ve böylece tomurcukların optimum düzeyde rejenere olabileceği besiyeri çeşidi belirlenmeye çalışılmıştır. Bu sonuçlara bakıldığında hem apikal hem de bazal tomurcuklar için en yüksek canlılık, rejenerasyon ve gövde oluşturma kapasitesi değerlerinin aktif kömür içeren besiyerlerinde olduğu görülmektedir (Çizelge 3-1). Diğer besiyerlerine aktarılan tomurcukların verdikleri cevaplar ise değişken olmaktadır. Apikal tomurcukların aktif kömür içermeyen besiyerlerinde gösterdiği canlılık ve rejenerasyon değerleri bazal tomurcuklara göre daha düşük tespit edilmiştir. Sadece QL 0 besiyerinde gelişen apikal ve bazal tomurcuklar benzer canlılık ve rejenerasyon sonuçları vermiştir. 1 mg/lt BA içeren QL besiyerinde ise hem apikal hem de bazal tomurcuklarda rejenerasyon elde edilememiştir. Ayrıca aktif kömür içermeyen besiyerlerindeki kültürlerde nekroz olmuş doku ve tomurcuklar da göze çarpmıştır. Ancak aktif kömür içeren besiyerlerinde gelişen gövdelerin ise oldukça sağlıklı oldukları görülmüştür (Şekil 3-1). Aktif kömür içeren besiyerlerine baktığımızda en yüksek gövde/eksplant ve gövde oluşturma kapasitesi değerlerinin QL besiyerinde (apikal tomurcuklar için sırasıyla 1.22 ± 0.13 ve 0.98 ; bazal tomurcuklar için sırasıyla 1.50 ± 0.14 ve 1.50) olduğunu görmekteyiz.

Tomurcukların oluşturdukları ortalama gövde sayıları 1 – 1,5 arasında değişmektedir. Bu da *S. sempervirens* apikal ve bazal tomurcuklarından çoklu gövde eldesinin kolay olmadığını göstermektedir.



Şekil 3-1 : Normal kültür koşullarından alınan *Sequoia sempervirens* bitkisi tomurcuklarından farklı besiyeri koşullarında gelişen gövdeler. (A, B) QL + 1 mg/lt BA ve MS 0 besiyerlerindeki nekroz olmuş tomurcuklar. (C, D) 20 gr/lt AK içeren MS besiyerinde gelişen gövdeler, 20 gr/lt AK içeren QL besiyerinde gelişen gövdeler. (E) QL + AK besiyerinde gelişen çoklu gövde.

Çizelge 3-1: Normal kültür şartlarındaki *S. sempervirens* bitkilerinden alınan apikal ve bazal tomurcukların farklı besiyeri çeşitlerindeki canlılık ve rejenerasyon oranları. (C; canlılık, R; rejenerasyon, GOK; gövde oluşturma kapasitesi.)

Besiyeri İçeriği	Apikal Tomurcuklar					Bazal Tomurcuklar				
	C (%)	R (%)	Gövde/Eks.	Gövde Boy (cm)	GOK	C (%)	R (%)	Gövde/Eks.	Gövde Boy	GOK
MS0	55 b	25 c	1.00±0.00 a	1.16±0.09bc	0.25	60 b	50 b	1.10±0.17 b	1.75±0.09 b	0.55
MS + BA	30 b	30 bc	1.17±0.16 a	1.05±0.07 c	0.35	100 a	65 ab	1.31±0.17ab	1.09±0.07 c	0.85
MS + AK	100 a	90 a	1.00±0.00 a	2.10±0.12 a	0.90	100 a	75 ab	1.00±0.00 b	2.27±0.13 a	0.75
QL0	95 a	55 b	1.00±0.00 a	1.03±0.09 c	0.55	95 a	50 b	1.10±0.10 b	0.95±0.05 c	0.55
QL + BA	40 b	0 c	-	-	-	15 c	0 c	-	-	-
QL + AK	100 a	80 a	1.22±0.13 a	1.48±0.09 b	0.98	100 a	100 a	1.50±0.14 a	1.44±0.14 b	1.50

3.2 ORTA SÜRELİ SAKLAMA

3.2.1 GÖVDE KÜLTÜRLERİNİN SAKLANMASI

In vitro gövde kültürlerinin farklı besiyerlerinde 3, 6, 9, 12 ve 15 ay sonunda verdikleri yanıtlar ve saklama sonrası elde edilen etiyole gövdeler Çizelge 3-2’de ve Şekil 3-2’de görülmektedir. Buna göre; MS 0 besiyerindeki bitkilerde, ilk 9 ay canlılıkta herhangi bir düşüş görülmezken, bu sürenin aşılmasıyla canlılığın neredeyse yarı yarıya düştüğü tespit edilmiştir. Benzer şekilde rejenerasyon oranında da 9 aydan sonraki saklama dönemlerinde oldukça ciddi bir düşüş görülmektedir. Yani sürenin uzaması kültürlerin rejenerasyon yeteneklerini ve gövde oluşturma kapasitelerini azaltmaktadır. 3 ay soğuk koşullarda kültürlenen bitkilerdeki GOK değeri 6.42 olurken 15. ayda bu değer 0.91’e kadar düşmektedir.

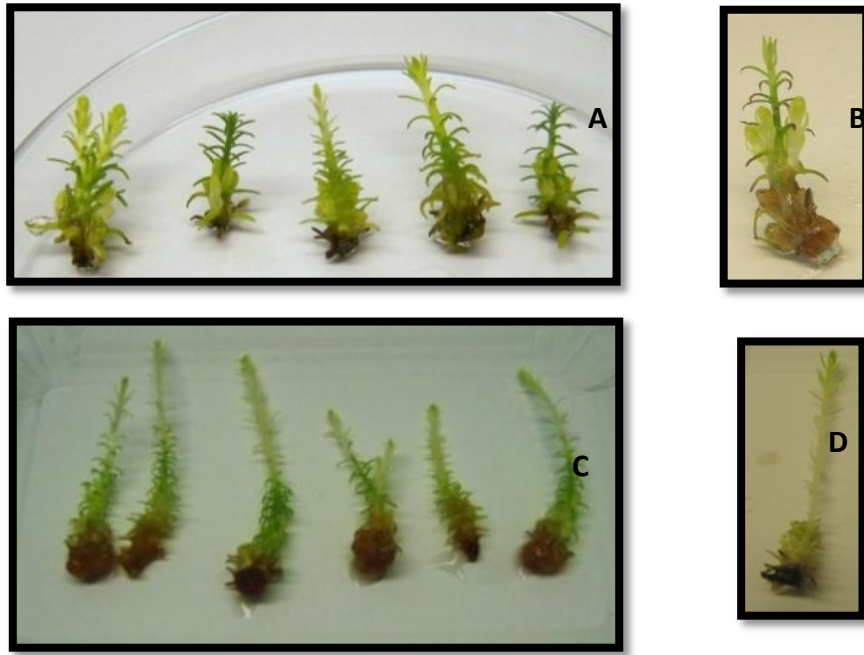
1 mg/lt BA içeren MS besiyerindeki kültürler incelendiğinde ise canlılığın 6. aydan itibaren azalmaya başladığı rahatlıkla görülmektedir. Canlılıktaki bu düşüş 12. aya kadar devam etmiş ve 15. ayda bir artışa geçmiştir. Rejenerasyon değerlerindeki düşüş ise 3. aydan sonra belirgin olmaya başlamış ancak 12. aya kadar azalarak devam eden rejenerasyon, 15. ayda artmıştır.

MS 0 besiyerinde gözlenene benzer bir şekilde QL 0 besiyerinde de 9. aya kadar canlılığın en üst düzeyde kaldığı görülmektedir. 12. aydan itibaren canlılıktaki azalma tespit edilmiştir. Ancak rejenerasyon seviyelerine bakıldığında 9. aya kadar süren azalmanın 12. ayda %86’ya çıktığı görülmektedir. 1 mg/lt BA içeren MS ve QL 0 besiyerlerinde gözlenen bu durum, kültürlerin soğuğa adaptasyonunda besiyeri içeriğinin etkili olduğunu ve 1 mg/lt BA içeren MS ve QL 0 besiyerlerinde *S. sempervirens* gövdelerinin metabolizmalarının elverişli bir şekilde yavaşlatılabilmeleri için en az 12 ay veya daha uzun sürelerde bekletmenin gerekli olduğunu göstermektedir. Gövde oluşturma kapasitelerine ve rejenerasyon oranlarına bakıldığında kültürlerin 3. ve 12. aylardaki sonuçlar arasında büyük bir farklılık olmadığı gözlemlenmektedir.

1 mg/lt BA içeren QL besiyerinde de, QL 0 besiyerine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre 9 ay süreyle %100 seviyesinde olan canlılık 12. ayda %90 seviyesine inmiş, rejenerasyon sonuçları da bu süre içerisinde azalma eğilimi gösterirken 12. ayda %76’ya yükselmiştir. GOK değeri ise 3. ayda 6.15 iken 9. ayda 3.15

seviyesine inmiş, ancak 12. ayda 5.04'e yükselmiştir. Bu da bitkilerin soğuğa karşı adaptasyon geliştirebildiğini gösteren bir sonuçtur.

Elde edilen tüm sonuçlar *S. sempervirens* gövde kültürlerinin büyüme düzenleyicileri içermeyen veya 1 mg/lt BA içeren QL besiyerinde, altkültürleme işlemi gerektirmeden, 12 ay boyunca elverişli şekilde saklanabildiğini göstermektedir. MS 0 besiyerinde ise gövdeler 9 ay boyunca elverişli bir şekilde saklanabilmektedir.



Şekil 3-2 : 3 ve 9 ay +4 °C' ta saklama süresi sonunda elde edilen uzamış etiyole gövdeler. (A) 3 ay süreyle QL + 1 mg/lt BA besiyerinde saklanan gövdeler. (B) 1 mg/lt BA içeren MS besiyerindeki tek gövde. (C) 9 ay süreyle 1 mg/lt BA içeren MS besiyerinde saklanma sonunda gelişen uzamış etiyole gövdeler. (D) QL 0 besiyerindeki uzamış etiyole gövde.

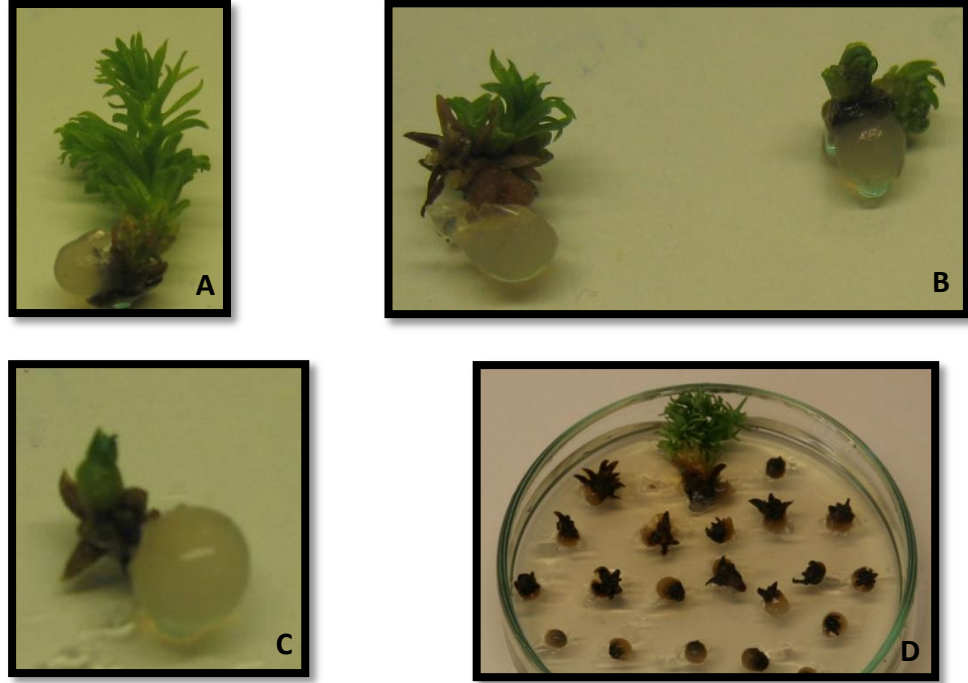
Çizelge 3-2: +4°C’ ta 3 – 6 – 9 – 12 ve 15. ay saklanan *S. sempervirens* kültürlerinin bu süreler sonundaki canlılık ve rejenerasyon sonuçları. (C; canlılık, R; rejenerasyon, GÖK; gövde oluşturma kapasitesi.)

Saklama Süresi	C (%)	R (%)	Gövde / Eks.	Gövde Boyu	GÖK
MS.0					
3 ay	100 a	93.1 a	6.90 ± 0.62 a	0.76 ± 0.09 b	6.42
6 ay	100 a	76.6 a	4.93 ± 0.59 b	1.04 ± 0.17 b	3.78
9 ay	100 a	80.0 a	5.57 ± 0.67 ab	0.91 ± 0.15 b	4.46
12 ay	56 b	43.0 b	4.12 ± 0.84 b	2.90 ± 0.63 a	1.77
15 ay	73 ab	23.3 b	3.89 ± 0.63 b	1.29 ± 0.27 b	0.91
MS +1 mg/lt BA					
3 ay	100 a	93.3 a	7.07 ± 0.59 b	0.96 ± 0.21 b	6.60
6 ay	86 a	66.4 b	3.52 ± 0.58 c	0.75 ± 0.07 b	2.34
9 ay	50 b	50.2 b	9.67 ± 0.73 a	0.70 ± 0.07 b	4.85
12 ay	30 b	26.4 c	4.56 ± 1.12 c	1.65 ± 0.26 a	1.20
15 ay	60 b	46.0 bc	4.53 ± 0.74 c	1.84 ± 0.41 a	2.08
QL.0					
3 ay	100 a	80.0 a	5.57 ± 0.69 a	1.08 ± 0.18 b	4.46
6 ay	100 a	50.0 b	2.34 ± 0.35 b	1.98 ± 0.30 a	1.17
9 ay	100 a	63.2 ab	6.36 ± 1.04 a	0.87 ± 0.08 b	4.02
12 ay	93 a	86.0 a	4.79 ± 0.52 a	1.81 ± 0.42 ab	4.12
15 ay	23 b	60.2 ab	4.57 ± 0.81 ab	1.95 ± 0.89 ab	2.75
QL + 1 mg/lt BA					
3 ay	100 a	90.0 a	6.83 ± 0.68 a	0.73 ± 0.10 a	6.15
6 ay	100 a	90.0 a	5.57 ± 0.56 ab	0.75 ± 0.11 a	5.01
9 ay	100 a	66.0 ab	4.77 ± 0.87 b	1.24 ± 0.24 a	3.15
12 ay	90 a	76.0 ab	6.63 ± 0.71 ab	1.27 ± 0.32 a	5.04
15 ay	60 b	60.7 b	6.00 ± 0.85 ab	0.76 ± 0.06 a	3.64

3.2.2 SENTETİK TOHURLARIN SAKLANMASI

Deneyler sonucunda, sentetik tohum ile orta süreli saklamada istenen başarı sağlanamamıştır. Sürecin 9 aya kadar uzatılması bir miktar canlılık sağlamıştır ancak bu, *Sequoia sempervirens* germplazmasının sentetik tohumlarla orta süreli saklanması için yeterli bir sonuç değildir. 9 aydan sonra ise canlılık tamamen kaybolmuştur.

QL 0 ve MS 0 besiyerlerinde 6 ay süreyle sakama sonucunda %2 ve % 4 oranlarında canlılık elde edilmiştir. 1 mg/lt BA ilaveli MS besiyerinde ise 9 ay sonunda sadece %2 canlılık tespit edilmiştir (Şekil 3-3).



Şekil 3-3 : Sentetik tohumlarından +4°C’ tan alınıp 1 mg/lt BA içeren MS besiyerine aktarıldıktan sonra gelişen gövdeler. (A) 6 ay süreyle MS 0 besiyerinde kültürlenmiş sentetik tohumlar (B) 6 ay süreyle QL 0 besiyerinde kültürlenmiş sentetik tohumlar. (C) 6 ay süreyle 1 mg/lt BA ilaveli QL besiyerindeki gelişim.. (D) 9 ay 1 mg/lt BA ilaveli MS besiyerinde kültürlenildikten sonra elde edilen gövde.

3.3 UZUN SÜRELİ SAKLAMA SONUÇLARI

3.3.1 SOĞUĞA ALIŞTIRMA VE ÖNKÜLTÜR OPTİMİZASYON SONUÇLARI

Soğuğa alıştırma ve önkültür süreçleri, bitkilerin ozmokoruma adımlarına hazırlanmaları için hayati önem taşıyan basamaklardır. Bu nedenle de bu adımların çok iyi optimize edilmesi gerekmektedir.

3.3.1.1 Soğuğa Alıştırma Sonuçları

Apikal tomurcukların soğuğa alıştırma sonuçları incelendiğinde (Çizelge 3-3); MS 0 besiyerinde ilk haftada düşük olan canlılığın 4. haftaya kadar arttığı gözlenmektedir. Ancak rejenerasyon değerleri ise azalma göstermektedir. 1 mg/lt BA içeren MS besiyerine bakıldığında ise, tomurcukların canlılığı ilk haftada düşüken 2. haftada artışa geçmiştir. Ancak ilerleyen haftalarda yine bir düşüş gözlenmektedir. Rejenerasyon değerleri ise sürekli bir azalma göstermektedir ve son haftalarda hiç rejenerasyon elde edilememiştir. 20 gr/lt AK içeren MS besiyerine bakıldığında ise, canlılık değerlerinin iyi oluşunu ancak rejenerasyon oranlarının düştüğünü görülmektedir. Sonuçlar irdelendiğinde, MS besiyerinin tomurcukların canlılığı üzerinde yeteri kadar indükleyici bir etkisinin olmadığını söylenilebilir.

Apikal tomurcukların QL besiyerlerindeki sonuçlarına bakıldığında ise; QL 0 besiyerinde ilk haftalarda düşük olan canlılık ilerleyen haftalarda artışa geçmiştir. Rejenerasyon ise azalmış ve 3. haftada artmıştır. 1 mg/lt BA içeren QL besiyeri incelendiğinde, canlılığın azaldığı ve rejenerasyonun da hiç görülmediği tespit edilmiştir. Ancak 20 gr/lt AK içeren QL besiyerinde, 4. haftada hem canlılık hem de rejenerasyon değerleri diğer besiyerlerine göre daha üstündür. Ayrıca gövde oluşturma kapasitesi de en iyi olan besiyeri aktif kömür ilaveli QL besiyeridir.

Sonuçlar bu şekilde incelendiğinde, aktif kömürün apikal tomurcukların rejenerasyonu üzerindeki etkisi rahatlıkla görülmektedir.

Bazal tomurcuklarda ise (Çizelge 3-4); yine MS0 besiyerinde canlılık oranı yüksek iken, rejenerasyon oranlarının düştüğü gözlenmiştir. 1 mg/lt BA içeren MS besiyerinde ise düşük canlılık görülmüştür ve rejenerasyon yok denecek kadar azdır.

20 gr/lt AK ilaveli MS besiyerinde de canlılık ve rejenerasyon oranları istenildiği kadar değildir.

QL besiyerlerine bakıldığında ise, yine sadece AK ilaveli QL besiyerinde en iyi sonuçlar elde edilmiştir. Buna rağmen 4. haftadaki rejenerasyon oranı %50 seviyesindedir.

Bu sonuçlara rağmen en iyi canlılık ve rejenerasyon verileri, 20 gr/lt AK içeren QL besiyerine aktarımda alınmıştır. Apikal tomurcukların canlılık ve rejenerasyonlar diğer besiyerlerinde olduğu gibi bazal tomurcuklara göre daha fazladır. İlk haftalarda apikal tomurcukların canlılıkları %75 seviyesindeyken, 4. haftada %100'e kadar çıkmıştır. Ayrıca en iyi GOK değeri de 4 haftalık kültür sonrasında elde edilmiştir. Bazal tomurcuklarda da en iyi canlılık ve rejenerasyon oranlarına 4. haftalık kültürlerde tespit edilmiştir. Ayrıca rejenerasyon verilerini incelersek, hem apikal hem de bazal tomurcuklardaki rejenerasyon değerlerinin her hafta arttığı görülmektedir. Aynı şekilde GOK değerlerinde de, özellikle bazal tomurcuklarda, bir artış söz konusudur. Bu sonuç bize, gövdelerin soğuk koşullara adapte olabildiğini gösteren bir ipucudur.

Kültürleri incelediğimizde yine en sağlıklı gövdelerin aktif kömür ilave edilmiş besiyerlerinde geliştiği görülmüştür. Diğer besiyerlerinde ise, nekroz olmuş tomurcuklar ve dokular göze çarpmıştır.

Çizelge 3-3: +4°C’ ta 1, 2, 3 ve 4 hafta süreyle soğuğa alıştırılan *S. sempervirens* kültürlerinden alınan apikal tomurcukların canlılık ve rejenerasyon oranları. (C; canlılık, R; rejenerasyon, GOK; gövde oluşturma kapasitesi.)

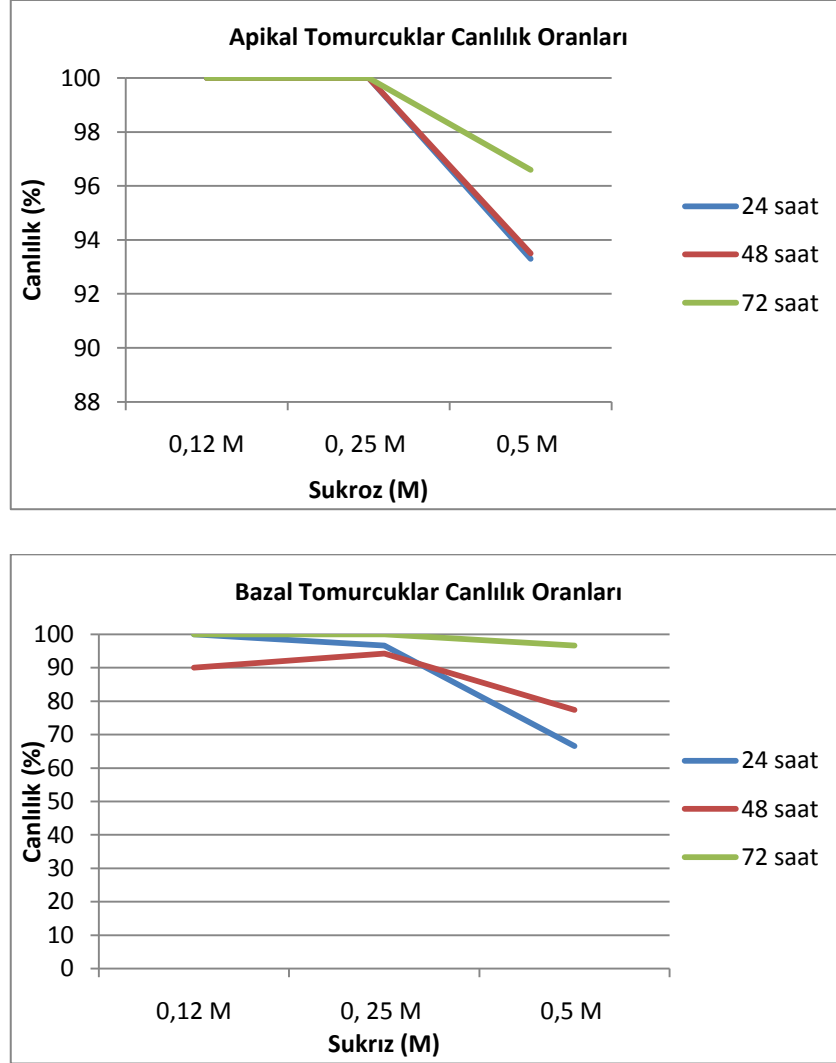
Saklama Süresi	Apikal Tomurcuklar				
	C (%)	R (%)	Gövde / Eksplant	Gövde	GOK
MS.0					
1 hafta	75 b	75 a	1.33±0.16 a	1.46±0.12ab	0.99
2 hafta	95 a	50 b	1.09±0.09 a	2.20±0.23 a	0.54
3 hafta	100 a	50 b	1.00±0.00 b	1.13±0.09 b	0.50
4 hafta	95 a	55 b	1.08±0.08 a	2.25±0.57 a	0.59
MS + 1 mg/lt BA					
1 hafta	55 b	30 a	1.14±0.14 b	0.62±0.07 a	0.34
2 hafta	85 a	5 b	3.00±0.00 a	0.40±0.00 a	0.15
3 hafta	65 b	0 b	-	-	-
4 hafta	65 b	0 b	-	-	-
MS + 20 gr/lt AK					
1 hafta	85 a	75 a	1.14±0.09 a	1.67±0.14 a	0.85
2 hafta	100 a	40 b	1.00±0.00 a	1.66±0.08 a	0.40
3 hafta	100 a	45 b	1.00±0.00 a	1.07±0.08 b	0.45
4 hafta	95 a	50 b	1.00±0.00 a	1.46±0.09 a	0.50
QL.0					
1 hafta	75 b	20 b	1.25±0.25 a	0.85±0.10 b	0.25
2 hafta	70 b	0 b	-	-	-
3 hafta	100 a	45 a	1.00±0.00 a	0.93±0.06 b	0.45
4 hafta	95 a	45 a	1.00±0.00 a	1.38±0.11 a	0.45
QL + 1 mg/lt BA					
1 hafta	55 a	20 a	1.00±0.00	0.65±0.13	0.20
2 hafta	30 b	0 a	-	-	-
3 hafta	35 b	0 a	-	-	-
4 hafta	60 a	0 a	-	-	-
QL + 20 gr/lt AK					
1 hafta	75 b	55 b	1.75±0.32 a	1.46±0.22 b	0.96
2 hafta	75 b	75 b	1.25±0.33 a	1.46±0.22 b	0.93
3 hafta	100 a	75 b	1.00±0.00 b	1.40±0.13 b	0.75
4 hafta	100 a	100 a	1.05±0.05 b	1.94±0.12 a	1.05

Çizelge 3-4: +4°C’ ta 1, 2, 3 ve 4 hafta süreyle soğuğa alıştırılan Sequoia sempervirens kültürlerinden alınan bazal tomurcukların canlılık ve rejenerasyon oranları. (C; canlılık, R; rejenerasyon, GOK; gövde oluşturma kapasitesi.)

Saklama Süresi	Bazal Tomurcuklar				
	C (%)	R (%)	Gövde / Eksplant	Gövde Boyu	GOK
MS.0					
1 hafta	35 b	15 b	1.00±0.00 a	1.53±0.30 a	0.15
2 hafta	65 ab	45 a	1.22±0.22 a	2.12±0.23 a	0.55
3 hafta	75 a	30 a	1.00±0.00 a	1.07±0.12 a	0.30
4 hafta	70 a	0 b	-	-	-
MS + 1 mg/lt BA					
1 hafta	50 a	0 a	-	-	-
2 hafta	10 b	0 a	-	-	-
3 hafta	5 b	0 a	-	-	-
4 hafta	5 b	0 a	-	-	-
MS + 20 gr/lt AK					
1 hafta	35 b	25 a	1.20±0.20 a	1.85±0.31 a	0.30
2 hafta	45 b	15 a	1.67±0.66 a	0.87±0.13 b	0.25
3 hafta	95 a	30 a	1.14±0.14 a	1.00±0.10 b	0.34
4 hafta	40 b	15 a	1.00±0.00 a	1.57±0.03ab	0.15
QL.0					
1 hafta	35 ab	0 a	-	-	-
2 hafta	20 b	0 a	-	-	-
3 hafta	30 ab	25 a	1.00±0.00 a	0.93±0.09 b	0.25
4 hafta	50 a	10 a	1.00±0.00 a	1.55±0.05 a	0.10
QL + 1 mg/lt BA					
1 hafta	10 a	0 a	-	-	-
2 hafta	30 a	0 a	-	-	-
3 hafta	15 a	0 a	-	-	-
4 hafta	0 a	0 a	-	-	-
QL + 20 gr/lt AK					
1 hafta	30 c	20 b	1.50±0.10 a	1.86±0.57 a	0.30
2 hafta	75 b	30 b	1.40±0.30 a	0.78±0.09 b	0.42
3 hafta	75 b	50 a	1.18±0.22 a	1.42±0.13ab	0.59
4 hafta	100 a	50 a	1.20±0.20 a	1.78±0.26 a	0.60

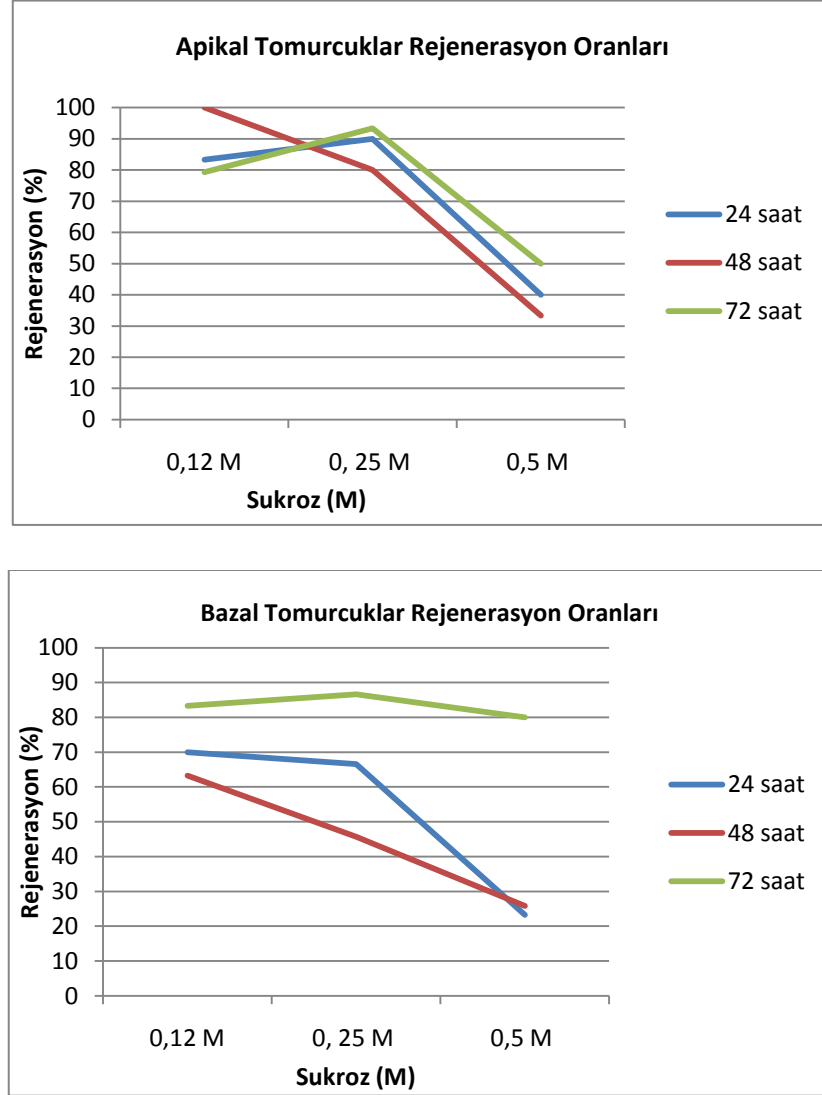
3.3.1.2 Sukroz Önkültürü Sonuçları

24, 48 ve 72 saatlik sukroz kültürünün sonucunda, tomurcukların gelişimleri incelendiğinde sukroz konsantrasyonunun artmasının canlılık üzerindeki negatif etkisi görülmektedir. Bu sonuç hem apikal hem de bazal tomurcuklar için geçerli bir bulgudur (Şekil 3-4, Çizelge 3-5).



Şekil 3-4 : 3 farklı sukroz konsantrasyonunun, apikal ve bazal tomurcukların canlılıklarına olan etkileri.

Rejenerasyon oranları incelendiğinde ise, denenen en yüksek sukroz konsant-rasyonu olan 0,5 M'ın apikal tomurcuklar için inkübasyon süresi ne olursa olsun toksik etki gösterdiği görülmektedir. Benzer şekilde, bazal tomurcuklar için de 0,5 M sukrozda 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar toksik etki göstermektedir (Şekil 3-5).



Şekil 3-5 : Apikal ve bazal tomurcukların 0.12 – 0.25 – 0.5 M sukroz konsant-rasyonlarındaki rejenerasyon oranları.

Ancak inkübasyon süresinin 72 saate çıkarılması bazal tomurcukların bu toksik etkiye karşı tolerans geliştirmeleri ile sonuçlanmıştır. Örneğin bazal tomurcukların 24 saat 0,5 M sukroz konsantrasyonunda kültürlenmeleri sonucu elde edilen rejenerasyon oranı 23,3 iken, bu oran, 48 saatte %25,8 ve 72 saatte de %80'e çıkmaktadır (Şekil 3-4, Çizelge 3-5).

Bu veri bize tomurcukların kendileri için toksik olabilen sukroz derişimlerini bir süre sonra belli bir ölçüde tolere edebildiklerini göstermektedir.

Çizelge 3-5: *Sequoia sempervirens* kültürlerinin 24, 48, 72 saat süreyle 0.12, 0.25 ve 0.5 M sukroz konsantrasyonlarında kültürlenmeleri sonucu alınan sonuçlar. (C; canlılık, R; rejenerasyon, GOK; gövde oluşturma kapasitesi.)

	Apikal Tomurcuklar					Bazal Tomurcuklar				
	C(%)	R(%)	Gövde/Eks.	Gövde Boyu	GOK	C(%)	R(%)	Gövde/Eks.	Gövde Boyu	GOK
24 saat										
0.12 M	100 a	83.3 a	1.12±0.09ab	1.33±0.10 b	0.93	100 a	70 a	1.37±0.26a	1.11±0.10 b	0.96
0.25 M	100 a	90 a	0.90±0.06 b	1.54±0.11ab	0.81	96.6	66.6 a	1.00±0.00a	1.54±0.06ab	0.67
0.50 M	93.3 a	40 c	0.52±0.11 b	0.68±0.15 c	0.20	66.6	23.3 b	1.29±0.18a	0.87±0.11 c	0.30
48 saat										
0.12 M	100 a	100 a	1.10±0.10ab	1.22±0.09bc	1.10	90 a	63.3 a	1.16±0.09a	1.29±0.09 b	0.73
0.25 M	100 a	80 ab	1.12±0.13ab	1.17±0.09bc	0.89	94.2	45.7	1.31±0.15a	1.06±0.09bc	0.60
0.50 M	93.5 a	33.3 c	1.00±0.00ab	0.85±0.07 c	0.33	77.4	25.8 b	1.00±0.00a	0.97±0.08 c	0.26
72 saat										
0.12 M	100 a	79.3	1.00±0.00ab	1.93±0.14 a	0.79	100 a	83.3 a	1.17±0.08a	1.70±0.11 b	0.97
0.25 M	100 a	93.3 a	1.16±0.08 a	1.63±0.09ab	1.08	100 a	86.6 a	1.11±0.12a	1.66±0.17 a	0.96
0.50 M	96.6 a	50 b	1.27±0.12 a	1.37±0.09bc	0.63	96.6	80 a	1.16±0.11a	1.10±0.11 b	0.92

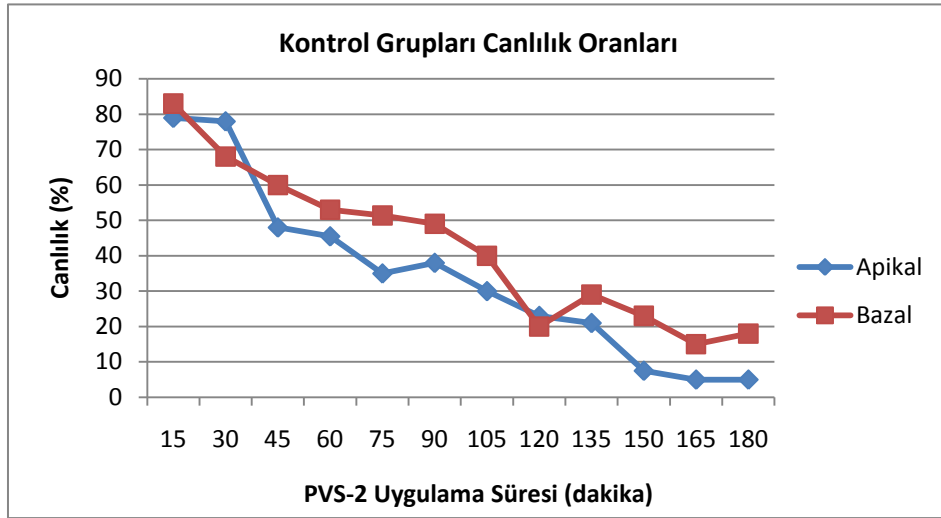
Ancak yine de, elde edilen sonuçlar en uygun sukroz önkültür koşullarının apikal tomurcuklar için 0,12 M' ta 48 saatlik inkübasyon, bazal tomurcuklar için ise 0,25 M sukrozda 72 saatlik inkübasyon olduğunu göstermektedir.

3.3.2 KRIYOPREZERVASYON SONUÇLARI

Uygulanan 3 farklı kriyoprezervasyon yöntemi karşılaştırıldığında *S. sempervirens*'in uzun süreli saklanması en etkili yöntemin damlacık dondurma tekniği olduğu görülmektedir (Çizelge 3-6). Vitrifikasyon tekniğinde sıvı azotta saklama sonucunda sadece %3,3 oranında canlılık görülürken, enkapsülasyon vitrifikasyon tekniğinde sıvı azot sonrasında hiç canlılık elde edilememiştir.

Kontrol gruplarında da canlılığın büyük ölçüde kaybedilmiş olması, PVS-2'nin *S. sempervirens* apikal ve bazal tomurcukları için oldukça toksik olduğunu göstermektedir. Bazal tomurcukların enkapsülasyon sonrasında PVS-2 ile muamele edilmeleri az da olsa bir koruma sağlamış, ancak bu sıvı azot sonrasında canlılığın korunmasında yeterli olmamıştır. Apikal tomurcuklarda ise enkapsülasyonun hiçbir olumlu etkisi görülmemiştir. Tersine, PVS-2 ile muamele sonrası rejenerasyon besiyerine aktarılan örnekler için, muhtemelen besiyerine erişimde bir bariyer gibi rol oynayarak canlılık oranlarının düşmesine neden olmuştur.

PVS-2'nin tomurcuklar üzerindeki toksik etkileri damlacık dondurma tekniğinde de görülmektedir. 15 dakika PVS-2 ile muamele edilen kontrol grubu apikal tomurcuklarında %79 canlılık görülürken, bazal tomurcuklarda ise %83 canlılık görülmüştür. PVS-2 uygulama süresi 180 dakikaya kadar arttırıldıkça bu oranlar sırasıyla %5 ve %18'e düşmektedir. (Şekil 3-6).

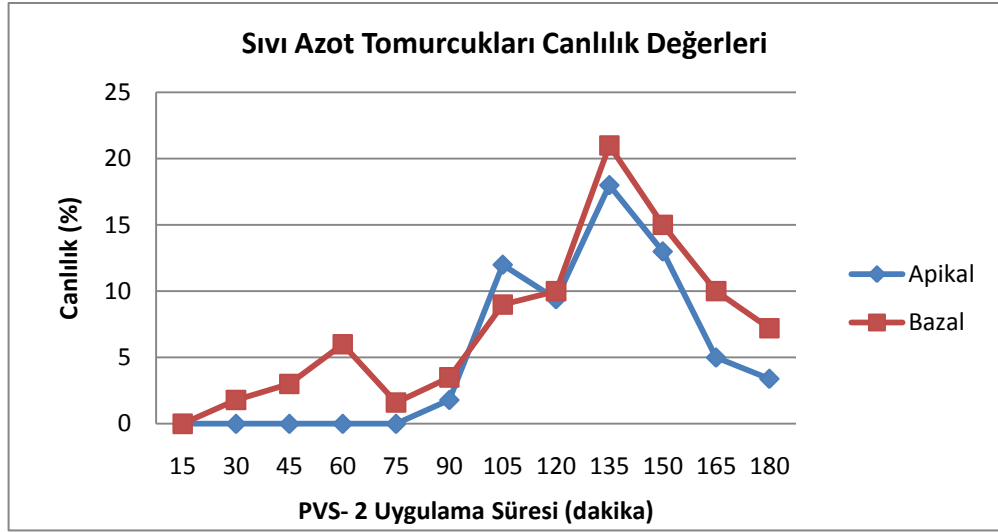


Şekil 3-6 : PVS-2 uygulama süresinin *S. sempervirens* tomurcuklarının canlılığı üzerindeki etkisi.

Çizelge 3-6: Apikal ve bazal tomurcukların 3 farklı yöntemle kriyoprezervasyonu sonrasında elde edilen canlılık sonuçları. (SA; sıvı azot)

PVS2 Uygu- lama Süresi	Apikal Tomurcuklar		Bazal Tomurcuklar	
	SA (-)	SA (+)	SA (-)	SA (+)
(A) Vitrifikasyon				
15	61	-	-	-
30	50	-	-	-
45	25	-	10	-
60	35	-	0	-
75	40	3.3	0	-
90	20	-	10	-
105	15	-	-	-
120	15	-	0	-
135	5	-	13	-
150	20	-	0	-
165	25	-	13	3.3
180	5	-	13	-
(B) Enkapsülasyon - Vitrifikasyon				
15	5	-	5	-
30	15	-	10	-
45	30	-	10	-
60	25	-	5	-
75	10	-	5	-
90	15	-	5	-
105	5	-	0	-
120	5	-	20	-
135	10	-	-	-
150	5	-	-	-
165	15	-	-	-
180	20	-	-	-
(C) Damlacık Dondurma				
15	79.0	-	83.0	-
30	78.0	-	68.0	1.8
45	48.0	-	60.0	3.0
60	45.5	-	53.0	6.0
75	35.0	-	51.4	1.6
90	38.0	1.8	49.0	3.5
105	30.0	12.0	40.0	9.0
120	23.0	9.4	20.0	10.0
135	21.0	18.0	29.0	21.0
150	7.5	13.0	23.0	15.0
165	5.0	5.0	15.0	10.0
180	5.0	3.4	18.0	7.2

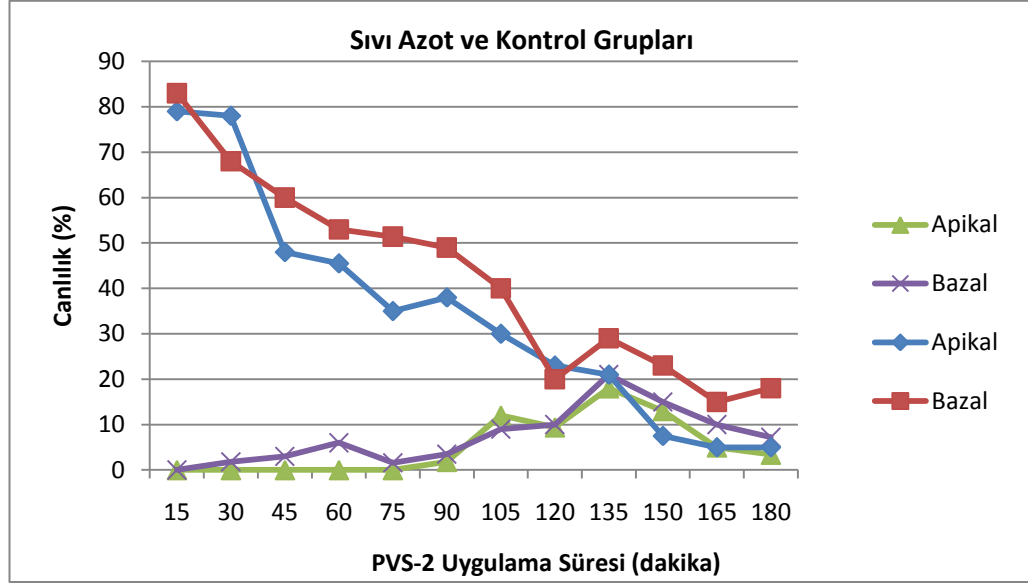
PVS-2 ile inkübasyonun toksik etkilerine karşın sıvı azotta saklamaya karşı toleransın artırılması için PVS-2'nin kullanılması gereklidir. Gerçekten de sıvı azota giren tomurcuklar için uzun süreli PVS-2 ile etkileşimin canlılığı arttırdığı görülmüştür. PVS-2 Apikal tomurcuklar için 90 dakika, bazal tomurcuklar için ise 30 dakika ile inkübasyonun canlılığı tetiklediği tespit edilmiştir. Etkileşim süresinin 135 dakikaya çıkartılması hem apikal hem de bazal tomurcuklar için en iyi canlılık sonucunu vermiştir. Ancak 135 dakikadan daha uzun inkübasyonlar yine toksik etki göstermektedir. (Şekil 3-7).



Şekil 3-7: Damlacık dondurma yöntemi ile kriyoprezerve edilen tomurcukların besiyerine aktarıldıktan sonra gösterdikleri canlılık değerleri.

Özetlenecek olursa, hem SA+ hem de SA- gruplarının PVS-2 ile inkübasyonu sonucu elde edilen canlılık oranları karşılaştırıldığında PVS-2'nin kontrol gruplarındaki canlılığı azaltan, sıvı azot gruplarında ise canlılığı arttıran etkileri rahatlıkla görülmektedir (Şekil 3-8).

Sıvı azot sonrasında ise canlılıklarını kazanabilen tomurcuklar ait fotoğraflar da Şekil 3-9' da görülebilmektedir.



Şekil 3-8: Damlacık dondurma tekniği ile elde edilen apikal ve bazal tomurcukların canlılık değerleri.



Şekil 3-9 : Sıvı azot sonrasında canlı kalan tomurcuklardan gelişen gövdeler. (A) 165 dakika PVS-2 ile etkileşim sonrasında canlı kalan bazal tomurcuk. (B) 135 dakika PVS-2 inkübasyonu sonrasında canlı kalan gövde. (C) 135 dakika PVS-2 ile etkileşim sonrasında canlı kalan bazal tomurcuk.

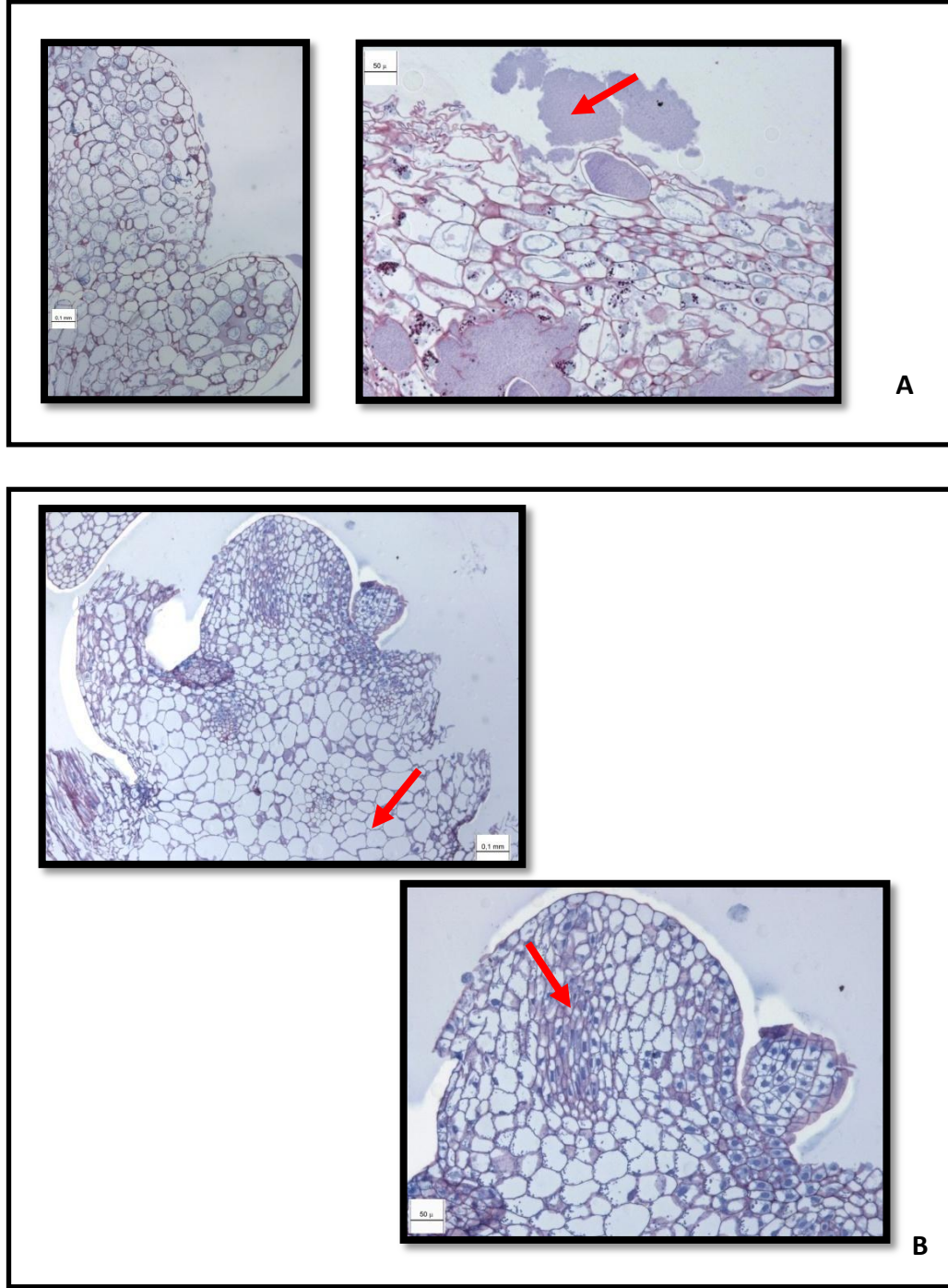
3.3.3 HİSTOANATOMİK ANALİZLER

Histoanatomik analizlerde, kriyoprezervasyon işlemleri nedeniyle canlılıklarını kaybetmiş olan dokulardaki hasarın anatomik olarak belirlenmesi amaçlanmıştır ve bu bağlamda canlılıklarını koruyan ve korumayan örneklerden alınan kesitler karşılaştırılmıştır.

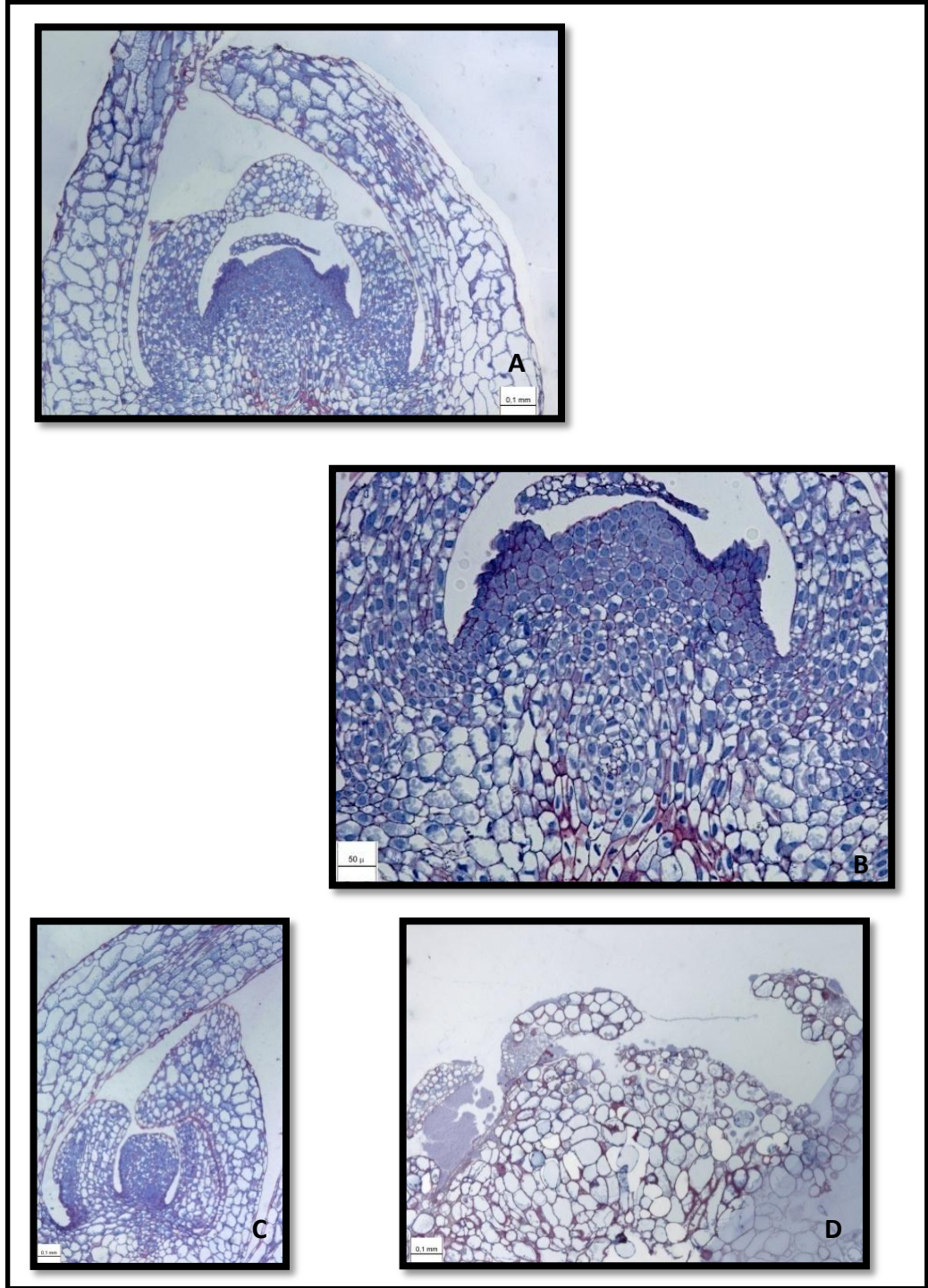
Yapılan analizler özellikle sıvı azotta saklanan örneklerde dokuların büyük oranda hasara uğradıkları ve canlılıklarını kaybettiklerini göstermektedir (Şekil 3-10 A). Bu dokularda hücre bütünlüğü kaybolmuş, hücre içeriği dışarıya salınmıştır. Ayrıca bu hücrelerin nispeten daha büyük, daha fazla vakuollü olduğu ve daha az şeker biriktirdiği de görülmektedir. Canlılıklarını koruyan meristem hücreler Şekil 3-10 B’de görülmektedir. Canlı olan bu hücreler nukleuslarıyla birlikte gözlenmektedir. Ayrıca uygulanan boyama yöntemine bağlı olarak, hücrelerin içindeki amiloplastlar boyanmış ve bu şekilde hücrelerdeki şeker birikimi de kanıtlanmıştır (Şekil 3-10 B). Ölü dokulara baktıldığında, hücrelerin sitoplazmik bütünlüklerinin bozulduğu içlerinin boşaldığı gözlenmektedir (Şekil 3-10 A).

Kontrol gruplarında da, meristem hücreleri büyük nukleusları ve küçük boyutlarıyla rahatlıkla seçilebilmektedir. Ayrıca meristem kubbesinin etrafındaki koruyucu yapraklar da bulunmaktadır. Sitoplazmanın boyanması da dokulardaki şeker birikimine işaret etmektedir (Şekil 3-11 A, C). İçleri boş olan hücreler ise, canlılıklarını kaybetmiş olan hücrelerdir. (Şekil 3-11 D).

Yapılan tüm bu gözlemler, nispeten daha az ve küçük vakuol içeren küçük boyutlu meristem hücreleri hayatta kalırken, daha büyük ve bol vakuollü hücrelerin sıvı azotta saklama sonrasında canlılıklarını kaybettiklerini göstermektedir. Bir diğer önemli bulgu, sukroz önkültüründe amaçlandığı şekilde, hücre içinde biriken şekerin gerçekten de membran kararlılığında ve hücrelerin canlı kalmalarında oldukça önemli olduğunun anlaşılmasıdır. PVS-2 solüsyonunun içeriğinde bulunan sukrozun işlevi de gerçekten membranların kararlı kalması ve böylece hücre bütünlüğünün korunmasıdır.



Şekil 3-10 : Damlacık dondurma tekniği ile kriyoprezerve edilen apikal tomurcukların, kriyoprezervasyon sonrasındaki ışık mikroskobu fotoğrafları. (A) Sıvı azot sonrasında canlılığını koruyamayan tomurcuk ve sağ taraftaki fotoğrafta ölü hücrelerden çıkan sitoplazma kalıntıları. (B) Sıvı azot sonrasında canlı kalmış tomurcuğun genel görünümü. Sağ tarafta aynı tomurcuğun ayrıntılı bir fotoğrafta canlı hücrelerin nükleusları ve hücre içindeki şeker birikimi görülebilmekte. Oklar canlı ve canlılığını kaybetmiş hücreleri göstermektedir.



Şekil 3-11: Kontrol grubu tomurcuklardan alınan kesitler. (A, B) 105 dakika PVS-2 ile inkubasyondan sonra besiyerine aktarılan tomurcuk. (C) 120 dakika süreyle PVS-2 muamelesinin ardından besiyerine aktarılan tomurcuk. (D) 120 dakika PVS-2 muamelesinden sonra canlılığını kaybeden tomurcuk. Fotoğrafta canlı hücreler ve bütünlüğünü kaybetmemiş tomurcuklar kolaylıkla görülebilmektedir. Canlılığını kaybeden tomurcukta ise, hücre içeriklerinin dışarı çıktığı görülmektedir.

4 TARTIŞMA VE SONUÇ

4.1 REJENERASYON BESİYERİNİN BELİRLENMESİ

Kriyoprezervasyon sonrasında canlılığın elde edilmesi için, eksplantların rejenere olabildikleri en uygun besiyerinin optimize edilmesi çok önemlidir. Sunulan çalışmada, apikal ve bazal tomurcukların kriyoprezervasyon sonrasında canlılıklarının korunması ve rejenerasyon ve gövde oluşturma kapasitesinin geri kazanılmasında 4 farklı besiyeri kompozisyonu test edilmiş, özellikle aktif kömür içeren besiyerlerinde kültürlenilen edilen tomurcukların görece daha yüksek canlılık ve rejenerasyon oranları ve gövde oluşturma kapasitesine sahip olduğu, ayrıca bu tomurcukların rejenerasyonu sonucu elde edilen gövdelerin çok daha sağlıklı olduğu belirlenmiştir. Aktif kömür, fenolik maddeler ve bunların oksitlenmiş formları, mela-lin gibi toksik pigmentleri (Sugano ve ark., 1975; Butcher, 1977; Habaguchi, 1977) bitki büyüme düzenleyicileri (IAA, NAA, BA, IBA, kinetin) gibi aromatik özelliğe sahip apolar maddeleri absorblaması (Constantin ve ark., 1977; Weatherhead ve ark. 1978; Nissen ve Sutter, 1990), gövde uzamasını sağlaması (Webb ve ark, 1988) gibi özellikleri nedeniyle pek çok farklı araştırmacı tarafından da yaygın olarak kullanılmaktadır. *S. sempervirens* bitkisinde, aktif kömürün gövde boyunu arttırdığı yapılan başka bir çalışmada da rapor edilmektedir (Boulay, 1978).

Odunsu bitkilerin *in vitro* rejenerasyonları sırasında fenolik maddelerin biriki-minin, rejenerasyon üzerindeki olumsuz etkisi birçok araştırmacı tarafından açıklanmış-tır (Ozudogru ve ark., 2005; Ozden-Tokatli ve ark., 2005). Bu bağlamda aktif kömür içermeyen besiyerlerinde kültüre edilen tomurcukların diplerindeki kararmalar ve düşük rejenerasyon oranları, bu besiyerlerinde fenolik maddelerin birikimini gösteren bir bulgu olmaktadır.

4.2 ORTA SÜRELİ SAKLAMA

Orta süreli saklama yöntemlerinde, kültürlerin saklama süresince büyüme hız-larının yavaşlatılması gerekmektedir. Literatür incelendiğinde, odunsu bitkilerle orta süreli saklamayı hedefleyen çalışmalar çoğunlukla soğuk şartlarda (+4 - +5°C) kültürleme yöntemini kullanmışlardır.

S. sempervirens bitkisinin gövde kültürleri ile apikal ve bazal tomurcukları içeren sentetik tohumlarının orta süreli saklanması amaçlandığı bu çalışmada da kültürlerin büyüme hızlarının soğuk ve karanlık koşullarda kültürleme yolu ile azaltılması hedeflenmiştir. Soğuk koşullarda kültürleme bitkilerin metabolizma hızlarının azaltılmasıyla besiyeri gereksinimlerinin aşağıya çekilmesini sağlamaktadır. Ayrıca, yapılan diğer çalışmalarda besiyeri modifikasyonları, farklı şeker alkoller ve ABA gibi büyümeyi engelleyici bileşikler de kullanılmıştır. Yapılan çalışmada elde edilen veriler, *S. sempervirens* gövde kültürlerinin bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besiyerinde 9 ay süreyle ve bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen QL besiyerinde 12 ay süreyle, canlılık ve rejenerasyon oranlarında büyük bir değişim olmadan rahatlıkla saklanabildiğini göstermektedir. Bu sonuç aynı zamanda soğuk ortam şartlarında saklanan diğer bitkilerle elde edilen sonuçları destekler niteliktedir. Gerçekten de, odunsu bitkilerin gövde kültürleri üzerinde yapılan orta süreli saklama çalışmalarında en iyi sonuçlar genellikle 3 ile 12 ay arasında değişmektedir (Hempel ve Hempel, 1984; Ballaster ve ark., 1997; Reed ve ark., 2003). Ayrıca bu sonuçlar bize kültürlerin soğuğa adaptasyonları hakkında da bilgiler sağlamaktadır. Genel olarak incelendiğinde, ilk 3 ayda kültürlerin canlılık ve rejenerasyon oranlarının yüksek oldukları görülmektedir. Anca ilerleyen aylarda, canlılık ve rejenerasyon oranlarında düşüş gözlenmiştir. Bu bize soğuk stresinin kültürleri etkilediğini göstermektedir. Ancak canlılıktaki bu düşüşün ardından MS besiyerlerinde 15. ayda canlılığın artışı tespit edilmiştir. Ama rejenerasyon oranları ise düşmeye devam etmektedir. Rejenerasyon oranının düşmesi, kültürlerin soğuğa adapte olamadıklarının bir göstergesidir. Buna rağmen QL besiyerlerinde ise canlılık 12. aya kadar fazla bir düşüş göstermezken, rejenerasyon 9. ayda azalmış ardından 12. ayda artışa geçmiştir. Bu sonuç ise kültürlerin QL besiyerinde soğuğa karşı adaptasyon geliştirdiklerini göstermiştir.

Odunsu bitkilerden elde edilen sentetik tohumlarla yapılan orta süreli saklama çalışmaları ise gövde kültürlerine oranla, birkaç istisna hariç, daha düşük süreli bir koruma (1 buçuk ay ile 9 ay arasında) sağlandığını ortaya koymaktadır (Nunes ve ark., 2003; İpekçi ve Gözükmızı, 2003; Mallon ve ark., 2007; Ozden – Tokatlı ve ark., 2008). Rapor edilen bu sonuçlara benzer şekilde, yüksek lisans tez çalışması kapsamında yapılan, sentetik tohumların orta süreli saklanması denemelerinde de düşük bir rejenerasyon oranı elde edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde Na-Aljinat tara-

findan tomurcuk etrafında oluşturulan bariyerin besiyeri ve gaz alışverişinde engelleyici bir etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu da kullanılan %3'lük Na-Aljinat konsantrasyonu ve CaCl_2 içerisindeki 25 dakikalık polimerizasyon sürecinin tomurcukların gelişimi için engelleyici bir etkisi olduğunu düşündürmektedir. Ancak Na-aljinat konsantrasyonu ve polimerizasyon sürecinin yeniden optimize edilmesi bu sorunun ortadan kaldırabileceği düşünülebilir.

4.3 UZUN SÜRELİ SAKLAMA

Soğuğa alıştırma ve sukroz önkültürü süreçleri, tomurcukların soğuk toleranslarını kazanmaları açısından çok önemlidir. Soğuğa alıştırma sürecinde hücrelerdeki membranların yeniden düzenlenmeleri, protein kompozisyonunda değişimler, şeker içeriğinde artış, bitki hormon konsantrasyonlarında değişim ve gen ekspresyonlarında aksamalar gibi birçok değişim olmaktadır (Chen ve Gusta, 1983; Steponkus ve ark., 1983; Crowe ve ark., 1990; Guy, 1990; Lang ve ark., 1994; Thomashow, 1998). Ancak bu değişimlerin ne şekilde işledikleri tam olarak anlaşılamamıştır.

Ayrıca sukroz önkültür sürecinde asıl istenen etki, tomurcukların yeteri şekilde dehidrate olmalarıdır. Ancak bu süreç içerisinde tomurcukların dehidratasyona bağlı olarak canlılıklarında bir düşüşün olmaması gerekmektedir. Bu yüzden tomurcukların canlılıklarını kaybetmeyecek şekilde uygun bir dehidratasyon sürecine alınmaları gerekmektedir.

Sukroz önkültürü süreci de, kriyokoruyucu uygulaması öncesinde hücrelerdeki buz oluşturabilecek suyun atılması için önemlidir. Tomurcukların sukroz veya diğer şeker alkolleriyle önkültürlemesinin, hücrelerdeki ozmolariteyi arttırdığı ve hücre içine girerek membran ve proteinlerin stabilizasyonunu sağladığı raporlanmıştır (Dumet ve ark., 1993; Thomashow, 1998). Kriyoprezervasyon sonrası elde edilen bulgular da görüldüğü gibi, tomurcukların, yeteri kadar dehidrate edildikleri elde edilen canlılık verilerinin incelenmesiyle anlaşılmaktadır.

Eksplantların PVS-2 ile inkübasyon süresi ve PVS-2 ile etkileşim de sıvı azot sonrasında canlılık ve rejenerasyonu sağlayan bir etkidir (Matsumoto ve ark., 1994). PVS-2 içeriğindeki DMSO yüzünden toksik bir etkiye sahiptir. Ayrıca literatür incelendiğinde PVS-2 uygulama sıcaklığının da DMSO'nun hücreler üzerinde gösterdiği toksik etkiler de anlaşılmaktadır. 23°C' ta yapılan çalışmalarda

eksplanlardaki canlılığın hızlı bir şekilde kaybolduğu ancak 0°C’ ta uygulanan PVS-2’nin ise canlılığı daha uzun süre koruduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden tez çalışmasında da 0°C’ ta PVS-2 uygulaması tercih edilmiştir. Ancak yapılan vitrifikasyon çalışmasında, PVS-2 ile inkübasyonun sıvı azot gruplarında canlılık üzerindeki olumsuz etkisi rahatlıkla görülmektedir. Sentetik tohumlarla yapılan vitrifikasyon deneyinde de canlılık elde edilememiştir. Sentetik tohum eldesi ile tomurcukları, etraflarında oluşturulan bariyer sayesinde PVS-2’nin zararlı etkilerinden korumak amaçlanmış ancak, yavaş büyütme çalışmalarında olduğu gibi Na-aljinat kapsül, tomurcukların gelişimi için engelleyici bir etken olmuştur. Daha önce de bahsedildiği gibi, Na-aljinat konsantrasyonu ve polimerizasyon süresinin optimize edilmesi gerekmektedir. Ama burada dikkat edilmesi gereken nokta ise, sentetik tohumların sıvı azot sonrasında bütünlüklerinin bozulabilmesidir. Yani, Na-aljinat konsantrasyonu öyle bir şekilde optimize edilmelidir ki, hem tomurcukların gelişimine izin vermeli hem de sıvı azot sonrasında sentetik tohumun bütünlüğü bozulmamalıdır. Ancak damlacık dondurma tekniğine bakıldığında, PVS-2 uygulama süresi arttıkça sıvı azot gruplarının canlılıklarında da 135. dakikaya kadar bir artış görülmektedir. Ayrıca DMSO’nun toksik etkilerinden kurtulmak için, PVS-3 gibi DMSO içermeyen kriyokoruyucuların da kullanımı tercih edilebilir.

Sonuçlara yeniden bakıldığında tomurcukların PVS-2 ile etkileşim oranının önemli olduğu görülmektedir. Vitrifikasyon deneylerinde, tomurcuk başına yaklaşık 1 ml PVS-2 ile etkileşim varken, bu oran damlacık dondurma yönteminde 4 µl kadar olmaktadır. Bu da PVS-2’nin yüksek oranda alınmasının hücreler için toksik etki gösterdiğinin kanıtıdır. Damlacık dondurma tekniğinde görüldüğü gibi 4 mikrolitre PVS-2 uygulaması hücrelerin vitrifikasyonunu sağlamaktadır. Ayrıca alüminyum folyonun ısıyı hızlı iletmesi de soğutma oranını arttıran ve PVS-2’nin toksik etkisini azaltan bir faktör olmaktadır.

Sentetik tohumlardaki canlılığın az oluşu ise, aljinat kapsüllerin tomurcukların besiyeri ile temasını engelleyen bir bariyer olarak işlev görmesi şeklinde açıklanabilir.

Soğuğa alıştırma, sukroz önkültürü ve kriyoprezervasyon sonrasında eksplantların kesitlerinin hem ışık mikroskobu hem de elektron mikroskobu altında incelendiği pek çok çalışmada hücrelerdeki fizyolojik değişimler araştırılmıştır. Bu

bağlamda hücrelerde biriken amiloplast miktarları, hücrelerdeki vakuolizasyon ve hücre bütünlükleri, alınan kesitler ve yapılan boyamalarla gözlenmiştir (Suzuki ve ark., 1997; Ryyänen, 1998; Padayachee ve ark., 2008). Ayrıca, elektron mikroskopi çalışmalarıyla da hücrelerin sıvı azot öncesi ve sonrasındaki ince yapıları incelenmiştir. Hücrelerin ince yapıları incelendiğinde sıvı azot sonrasında endoplazmik retikulumdaki değişiklikler ve golgi yapılarının artması hücrelerin metabolik olarak aktif olduğunu gösteren bulgulardır (Padayachee ve ark. 2008).

Bu çalışmalarda hücrelerin nukleusları da boyandığı için hücrelerin canlılıkları da tespit edilebilmektedir. Yapılan başka bir çalışmada ise sıvı azot sonrasında canlılığın elde edilmesi için meristem kubbesinin etrafında birkaç yaprak primordiyasının olması gerektiği raporlanmıştır (Thinh, 1997).

Sunulan tez çalışması kapsamında da histoanatomik analizler yapılmış, kriyoprezervasyon işlemlerinin hücrelerde oluşturduğu zararların belirlenmesine çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar sıvı azot sonrasında rejenere olan tomurcuklarda meristem kubbesinin etrafındaki yaprak primordiyalarının bulunduğunu göstermektedir. Bununla beraber, hücrelerdeki amiloplast birikimi ve vakuolizasyon da boyamalar sonucunda tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar daha önceki çalışmaları da destekler niteliktedir.

4.4 SONUÇ

Tez kapsamında, *S. sempervirens* bitkisinde orta ve uzun süreli saklama yöntemleri incelenmiştir. Bu bağlamda yapılan çalışmalarda, orta süreli saklama için gövde kültürleri ve enkapsüle edilmiş sentetik tohumlar kullanılmıştır. Gövde kültürlerinin saklanması için kullanılan 4 farklı besiyerindeki en iyi sonuçlar bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ve QL besiyerlerinde elde edilmiştir. Bu sonuçlar, gövde kültürlerinin büyüme hızlarının azaltılabildiğini göstermiştir. Sentetik tohumların orta süreli saklanması ise yeterli bir rejenerasyon elde edilememiştir.

Uzun süreli saklama çalışmalarında ise, en iyi sonuç damlacık dondurma tekniğinde bazal tomurcuklarda 135 dakika PVS-2 inkübasyonu ile elde edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada PVS-2'nin sıvı azot ve kontrol grupları üzerindeki toksisitesi de belirlenmiştir. Sıvı azot gruplarında PVS-2 inkübasyon süresinin uzaması, tomurcukların canlılığını arttırırken kontrol gruplarında ise canlılığı azaltmıştır.

Vitrifikasyon ve enkapsulasyon – vitrifikasyon çalışmalarında ise sıvı azot sonrasında canlılık elde edilememiştir.

Histoanatomik çalışmalarda ise, hem sıvı azot gruplarından hem de kontrol gruplarındaki tomurcuklardan alınan kesitler incelenerek, canlı kalabilen ve canlılığını kaybeden tomurcuklar arasındaki farklar irdelenmiştir. Bu çalışmada, canlılığını koruyan tomurcukların hücrelerinde amiloplast birikimi ve meristem kubbesinin etrafındaki yaprak primordiyumları tespit edilmiştir.

KAYNAKÇA

Adams, R. P., Miller, J. S., Goldberg, E. M. And Adams, J. E. (1994). Conservation of Plant genes II. Monographs in systematic botany from the Missouri Botanical Garden, Vol. 48., Missouri Botanical Gardens, MO.

Aitken-Christie J., Kozai T., Smith M. A. L. (1995) Glossary. In: Aitken-Christie J, Kozai T, Smith MAL (eds) Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture, Kluwer, Dordrecht, pp ix-xii.

Al Mazrooei S., Bhatti M. H., Henshaw G. G., Taylor N. J., Blakesley D. (1997) Optimisation of somatic embryogenesis in fourteen cultivars of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L) Lam], Plant cell Reports, no.16, pp. 710-714.

Althoff D. M., Gitzendanner M. A., Segraves K. A. (2007) The utility of amplified fragment length polymorphisms in phylogenetics: a comparison of homology within and between genomes. Syst. Biol. 56:477-484.

Atree S. M. Fowke L. C. (1991) Micropropagation through somatic embryogenesis in conifers. In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 17, High-Tech Micropropagation, pp. 53 – 70, Berlin: Springer-Verlag.

Bachiri Y, Song G. Q., Plessis P., Shoar-Ghaffari A., Rekab T., Morisset C. (2001) Routine cryopreservation of kiwifruit (*Actinidia* spp) germplasm by encapsulation- dehydration: importance of plant growth regulators. CryoLetters 22: 61–74

Ball, E. (1946) Development in sterile culture of stems tips and subjacent regions of *Tropaeolum malus* L. and of *Lupinus albus* L. Am. J. Bot. 33, 301–318.

Ball E. A. (1987) Tissue culture multiplication of *Sequoia*. In: Cell and Tissue Culture in Forestry (Bonga JM, Durzan DJ, eds) Martinus Nijhoff KDR, W Junk Publ 3, 146-158.

Ballester, A., Janeiro, L. V., and Vieitez, A. M. (1997) Cold storage of shoot cultures and alginate encapsulation of shoot tips of *Camellia japonica* L. and *Camellia reticulata* Lindley. *Scientia Hortic.* 71, 67-78.

Bardakci F. (2001) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turk. J. Biol* 25:185-196.

Bergmann, L. (1959) A new technique for isolating and cloning cells of higher plants. *Nature* 184, 648–649.

Benson E. E. (2008) Cryopreservation theory In: Reed B. M. *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer.

Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-333.

Boulay M. (1978) Multiplication rapide du *Sequoia sempervirens* en culture in vitro. *Ann Rech Sylv AFOCEL*, 1977. 38-66.

Boulay M. (1987) Conifer micropropagation: applied research and commercial aspects. In: *Cell and Tissue Culture in Forestry* (Bonga JM, Durzan DJ, eds) Martinus Nijhoff Publ 3, 185-206.

Boulay M. (1989) Redwood (*Sequoia sempervirens*). In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry 5, Trees II* (Bajaj YPS, ed) Springer Verlag, Berlin 549-573

Bourgkard F, Favre J. M. (1989) L'embryogenèse somatique chez *Sequoia sempervirens* - possibilités et limites actuelles. *Ann Rech Sylv AFOCEL*, 1988. 83-95.

Bravo L. A., Zuniga G. E., Alberdi M., Corcuera L. J. (1998) The role of ABA in freezing tolerance and cold acclimation. *Physiol Plant* 103: 12–23

Brison M., de Boucaud M. T. , Dosba F. (1995) Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of two interspecific *Prunus* rootstocks. *Plant Sci* 105: 235–242

Brown C. R., Kwiatkowski S., Martin W. M., Thomas P. E. (1988) Eradication of PVS from potato clones through excision of meristems from in vitro, heat treated shoot tips, American Potato Journal, no. 65, pp. 633-638.

Brown, Peter M. (1996). OLDLIST: A database of maximum tree ages. P. 727-731 in Dean, J.S., D.M. Meko and T.W. Swetnam, eds., "Tree rings, environment, and humanity." Radiocarbon 1996, Department of Geosciences, The University of Arizona, Tucson.

Bull RA (1951) A new gall disease of *Sequoia sempervirens*. In: The Gardener's Chronicle. 110-111.

Burke M. J. (1986) The glassy state and survival of anhydrous biological systems. In: Leopold AC (ed) Membrane, Metabolism and Dry Organisms. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY, pp 358–364.

Butcher D. N. (1977) Secondary products in tissue cultures. In: Reinert J and Bajaj YPS (eds) Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Berlin-Heidelberg, New York: Springer- Verlag, pp 668–693.

Campbell R. (1985) Plant microbiology, London: Arnold.

Cassells A. C. (1987) In vitro induction of virus-free potatoes by chemotherapy. In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 3, Potato, pp. 45-50, Berlin: Springer-Verlag.

Cassells A. C. (1991) Problems of tissue culture contamination, In: Debergh P. C., Zimmerman R. H. (Eds.) Micropropagation , Technology and Application, pp. 31-44, Dordrecht: Kluwer Academic.

Cassells A. C., Harmey M. A., Carney B. F., McCarthy E., McHugh A. (1988) Problems posed by cultivable bacterial endophytes in the establishment of axenic cultures of *Pelargonium x domesticum*: The use of *Xanthomonas pelargonii*-specific ELISA, DNA probes and culture indexing in the screening of antibiotic treated and untreated donor plants, *Agra horticulturae*, no.225, pp. 153-162.

Chadefaud M., Emberger L. (1960) *Traité de Botanique*. T. II. Les Végétaux Vasculaires. Masson, Paris, 1539 p.

Chang Y., Barker R. E., Reed B. M. (2000) Cold acclimation improves recovery of cryopreserved grass (*Zoysia* and *Lolium* sp.) *CryoLetters* 21: 107–116.

Chaudun V. (1977) *Sequoia* Endl. In: *Le Bon Jardinier. La Maison Rustique*, Paris, vol 2, 1576.

Chen T. H. H., and Gusta L. V. (1983) Absisic acid induced freezing resistance in cultured plant cells. *Plant Physiol.* 73:451-459.

Chen F., Ma X. D., Chen J. (2003) Industrialized cultivation technology of *Sequoia sempervirens* tissue culture shoot. *Yunnan Forest Sci Technol* 3:11–13.

Chen T. H. H., Kartha K. K., Constabel F., Gusta L. V. (1984) Freezing characteristics of cultured *Catharanthus-roseus* (L.). Don, G. cells treated with dimethylsulfoxide and sorbitol in relation to cryopreservation. *Plant Physiol* 75: 720–725.

Chen T. H. H., Kartha K. K., Gusta L. V. (1985) Cryopreservation of wheat suspension culture and regenerable callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 4: 101–109.

Cho E. G., Hor Y. L., Kim H. H., Ramanatha Rao V., Engelmann F. (2002) Cryopreservation of *Citrus madurensis* zygotic embryonic axes by vitrification: Importance of pregrowth and preculture conditions. *CryoLetters* 23: 325–332.

Clavero-Ramirez I., Galvez-Farfan J., Lopez-Aranda J. M., Gonzalez-Benito M. E. (2005) Apex cryopreservation of several strawberry genotypes by two encapsulation- dehydration methods. *CryoLetters* 26: 17–24.

Constantin M. J., Henke R. R. and Mansur M. A. (1977) Effect of activated charcoal on callus growth and shoot organogenesis in tobacco. *In Vitro* 13: 293–296.

Crowe J. H., Crowe L. F., Chapman D. (1984a) Preservation of membranes in anhydrobioticorganisms: The role of trehalose. *Science* 233: 701–703.

Crowe J. H., Crowe L. F., Chapman D. (1984b) Infrared spectroscopic studies on interactions of water and carbohydrates with a biological membrane. *Arch Biochem Biophys* 232: 400–407.

Crowe, J. H., Carpenter, J. F., Crowe, L. M., and Anchordoguy, T. J. (1990) Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* **27**, 219–231.

Debergh P. C. , Read P. E. (1991) Micropropagation. In: Debergh P. C. And Zimmerman R. H. (Eds.), Micropropagation, Technology and application, pp. 1- 13, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Decruse S. W., Seeni S., Pushpangadan P. (1999) Cryopreservation of alginate coated shoot tips of in vitro grown *Holostemma annulare* (Roxb.) K. Schum, an endangered medicinal plant: Influence of preculture and DMSO treatment on survival and regeneration. *CryoLetters* **20**: 243–250.

Dereuddre J., Fabre J., Bassaglia C. (1988) Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var. Eolo) apical and axillary shoot tips excised from different aged in vitro plantlets. *Plant Cell Rep* **7**: 170–173.

Dereuddre J., Scottez C., Arnaud Y., Duron M. (1990) Effets d'un endurcissement au froid des vitroplants de poirier (*Pyrus communis* L. cv. Beurré Hardy) sur la résistance des apex axillaires à une congélation dans l'azote liquide. *C R Acad Sci Paris* **310 Sér III**: 317–323.

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

di Castri, F. and Younes, T. (1996). Introduction: Biodiversity, The Emergence of a New Scientific field – Its Perspectives and Constrains. In: di Castri, F. and Younes T. (Eds.). Biodiversity Science and Development. Towards a New Partnership. CAB International & IUBS, Wallingford, UK, pp. 1-11.

Donnet A. (1984) Le *Sequoia sempervirens*: programme de recherche et de développement mené en France par l'AFOCEL. Mém 3éanne, École Nationale des Ingénieurs des Travaux des Eaux et Forêts et AFOCEL, région Nord-Ouest, 104 p.

Dufrenoy M. J. (1922) Tumeurs de *Sequoia sempervirens*. *Bull Soc Path Vég Fr* **9**, 148-150.

Dumet D., Engelmann F., Chabrillange N., Duval Y. (1993) Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryo involving a desiccation step. *Plant Cell Rep* 12: 352–355.

Duthie, D. (1997). The Science of Conservation Biology and the extinction crisis. In: Pushpangandan, P., Ravi. K. and Santhosh, V. (Eds.). *Conservation and Economic Evalutaion of Biodiversity*, vol.1. Oxford & IBH Publishing Co., Pvt. Ltd., New Delhi, pp. 31-46.

Engelmann F. (1997) In vitro conservation methods. In: Ford-Lloyd BV, Newburry JH, Callow JA (eds) *Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use*. CAB International, Wellingford, pp 119–162.

Enjalric F., Carron M. P., Lardet L. (1988) Contamination of primary cultures in tropical areas: the case of *Hevea brasiliensis*, *Acta Horticulturae*, no.225, 57- 65.

Eyüboğlu, A. K., Atasoy, H. Ve Küçük, M., 1995. Doğu Karadeniz Bölgesinde Tür Adaptasyon ve Orijin Denemeleri, KTÜ Orman Fakültesi, I. Ulusal Karadeniz Ormancılık Kongresi, Bildiriler 4. Cilt (Orm. Müh.) 23-25 Ekim 1995, s. 73-79, Trabzon.

Fabre J., Dereuddre J. (1990) Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *CryoLetters* 11: 413–426.

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

FAO (Food and Agricultural Organization), (1996). *The State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Background Documentation Prepared for the International Technical Conference on Plant Genetic Resources*. Leipzig, Germany, 17-23 June 1996. FAO, Rome.

Feng G. H., Ouyang J. (1988) The effects of potassium nitrate concentration in callus induction medium for wheat anther culture, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, no. 12, pp. 3-12.

Fouret Y., Arnaud Y., Larrieu C., Miginiac E. (1986) *Sequoia sempervirens* as an in vitro rejuvenation model. *N Z J For Sci* 16, 319-327.

Fouret Y., Larrieu C., Arnaud Y. (1989) Rajeunissement in vitro chez le *Sequoia sempervirens* (Endl): recherche du protocole le plus efficace. Ann Rech Sylv AFOCEL, 1988. 56- 81.

Frankel, O.H., Brown, A.H.D. And Burdon, J.J. 1995. The Conservation of Plant Biodiversity. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

Gale A.W. (1962) *Sequoia sempervirens*; its establishment and uses in Great Britain. Q J For 56, 126-137.

Galzy R. (1696) Recherches sur la croissional de *Vitis rupestris* Scheele sain et court noue cultivate in vitru a differentes temperatures. Ann. Phytopathol. 1:149-166.

Gautheret, R. J. (1934) Culture du tissus cambial. C.R. Hebd. Seances Acad. Sc. 198, 2195–2196.

Gautheret, R. J. (1935) Recherches sur la culture des tissus végétaux. Ph.D. Thesis, Paris.

Gautheret, R. J. (1939) Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. C.R. Hebd. Seances Acad. Sc. 208, 118–120.

Gerçek V., Şahin A. (2002) Değişik hormon konsantrasyonlarının *Sequoia sempervirens* (Lamb.) Endl.'in plantelet gelişimi üzerine etkileri. Gazi Üniversitesi Kastamonu Eğitim Dergisi 10(1):173-180.

Given D. R. (1996) Principles and practice of plant conservation. Timber Press Inc., Portland, OR (2nd ed.).

Gonzalez-Arno M. T., Engelmann F. (2006) Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: Review and case study on sugarcane. CryoLetters 27: 155–168.

Gonzalez-Arno M. T., Engelmann F, Huet C., Urra C. (1993) Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedure and histology. CryoLetters 14: 303–308.

Green S. K. , Lo C. Y. (1989) Elimination of sweet potato yellow dwarf virus (SPVDV) by meristem culture and heat treatment, *Journal of Plant Disease*, no. 96, pp. 464-469.

Grimers H. D., Hodges T. K. (1990) The inorganic (NO_3NH_4^+) ratio influences plant-regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of Indica rice (*Oryza sativa* L.) *Journal of Plant physiology*, no. 136, pp. 362-367.

Grospietch M., Stodulkova E., Zamecnik J. (1999) Effect of osmotic stress on the dehydration tolerance and cryopreservation of *Solanum tuberosum* shoot tips. *CryoLetters* 20: 339–346.

Guy, C. L. (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance: Role of protein metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, 187–233.

Habaguchi K. (1977) Alternations in polyphenol oxidase activity during organ redifferentiation in carrot callus cultured *in vitro*. *Plant Cell Physiol* 18: 181–198.

Haberlandt, G. (1902) Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien. Math.-Naturwiss. Kl., Abt. J.* **111**, 69–92.

Heino P., Sandeman G., Lang V., Nordin K., Palva E. T. (1990) Absciscic acid deficiency prevents development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor Appl Genet* 79: 801–806.

Heller R. (1953) Re'cherches sur la nutrition minerale des tissus ve'ge'taux cultives in vitro. *Ann Sci Nat Bot Biol Veg* 14:1–223.

Hempel, T., and Hempel, M. (1984) Storage of gerbera propagated in vitro. *Proc. Internatl. Symp. "Plant Tissue and Cell Culture Application to Crop Improvement"*, Czechoslovakia 559-560.

Heszky L. E., Jekkel Z., Ali A-H (1990) Effect of cooling rate, cryoprotectant and holding time at different transfer temperatures on the survival of cryopreserved cell suspension culture [*Puccinellia distans* (L.) Parl.] *Plant Cell Tissue Organ Cult* 21: 217–226.

Heywood, V. H. (1990). Botanic gardens and the conservation of plant genetic resources. *Impact of Science Society* 158:121-132.

Hildebrandt A. C., Riker A. J., Duggar B. M. (1946) The influence of the composition of the medium on growth in vitro of excised tobacco and sunflower tissue cultures. *Am J Bot* 33:591–597.

Hirai D., Sakai A. (1999) Cryopreservation of in vitro grown axillary shoot-tip meristems of mint (*Mentha spicata*) by encapsulation-vitrification. *Plant Cell Rep* 19: 150–155.

Hirai D., Shirai K., Shirai S., Sakai A. (1998) Cryopreservation of in vitro-grown meristems of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) by encapsulation–vitrification. *Euphytica* 101: 109–115.

Hirata K., Phunchindawan M., Tukamoto J., Goda S., Miyamoto K. (1996) Cryopreservation of microalgae using encapsulation-dehydration. *CryoLetters* 17: 321–328.

Hu Q, Duan XM, Wu XM, Gong QS (2003) Tissue culture of *Sequoia sempervirens*. *Jiangxi For Sci Technol* 5:10–12.

Hunter S. A., O'Donnell N. (1989) Outline of a system for *in vitro* propagation of *Sequoia sempervirens*. *Combined Proceedings—International Plant Propagators' Society* 38:268–272.

Ill – Whan S. and Schuyler S. K. (1994) Effect of different cytokinins on axillary shoot proliferation and elongation of several genotypes of *Sequoia sempervirens*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30P:131-135.

Ipekci, Z., and Gozukirmizi, N. (2003) Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongate*. *Plant Cell Rep.* 22, 16-24.

IUCN (International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources), 1980. *World Conservation Strategy*. IUCN (in collaboration with WWF and UNEP), Gland, Switzerland.

IUCN, 1994. United Nations List of National Parks and Protected Areas. WCMC, Cambridge and IUCN Commission on National Parks and Protected Areas. Gland, Switzerland.

IUCN, 1995. IUCN Red List Categories. IUCN, Gland, Switzerland.

Jones, L. E., Hildebrandt, A. C., Riker, A. J., and Wu, J. H. (1960) Growth of somatic tobacco cells in microculture. *Am. J. Bot.* 47, 468–475.

Jutro, P. R. 1993. Human influence on ecosystems: dealing with biodiversity. In: McDonnell, M.J. and Pickett, S.T.A (Eds.). *Humans as Components of Ecosystems*. Springer-Verlag, New York, pp. 246-256.

Kameya T. and Widholm J. (1981) Plant – Regeneration from hypocotyl sections of *Glycine* species *plant science letters*, 21: 289-294.

Kartha, K. K. (1981) Meristem culture and cryopreservation methods and applications, in *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture* (Thorpe, T. A., ed.), Academic Press, New York, pp. 181–211.

Kartha K. K. (1986) Production of indexing of disease free plants, In: Withers L. A. And Anderson P. G. (Eds.), *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*, pp. 219-238, London: Butterworths.

Kartha K. K., Leung N. L., Pahl K. (1980) Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. *J Am Soc Hort Sci* 105: 481–484.

Kim, H-H., Yoon, J-W., Park, Y-E., Cho, E-G., Sohn, J-K., Kim, T-S., and Engelmann, F. (2006). Cryopreservation of potato cultivated varieties and wild species: critical factors in droplet vitrification. *CryoLett.* 27: 223–234.

Kim, H-H., Lee, J-K., Hwang, H-S., and Engelmann, F. (2007). Cryopreservation of garlic germplasm collections using the droplet-vitrification technique. *CryoLett.* 28: 471–481.

Koopwitz, H., Kaye, H. (1990). *Plant Extinction. A Global Crisis*. Christopher Helm, London (2nd ed.).

Krishnamurthy K. V. (2003) *Textbook of biodiversity*. Science Publishers.

Lambardi M., Ozudogru E. A., Benelli C. (2008) Cryopreservation of embryogenic cultures. In: Reed B. M. (Ed.) Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer, Verlag.

Lambardi M., Ozudogru E. A., Previati A. (2010) In vitro conservation and cryoreservation of ornamental plants In: Jain S. M., Ochatt J. (Eds.) Protocols for in vitro propagation of ornamental plants. Springer, Berlin (Baskıda).

Lande, R., Barrowclough, G.F. (1987). Effective population size, genetic variation, and their use in population management. In: Soulé, M.J., (Ed.). Viable Populations of Conservation. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp.87-124.

Lang, V., Mantyla, E., Welin, B., Sundberg, B., and Palva, E. T. (1994) Alterations in water status, endogenous abscisic acid content, and expression of rab18 gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **104**, 1341–1349.

LaPasha C. A., Miller C. N. (1981) New taxodiaceous seed cones from the Upper Cretaceous of New Jersey. *Am J Bot* 68, 1374-1382.

Lee S. P., Chen T. H. H., Fuchigami L. H. (1991) Changes in the translatable RNA population during abscisic acid induced freezing tolerance in bromegrass suspensionculture. *Plant Cell Physiol* 32: 45–56.

Leunufna, S. and Keller, E. R. J. (2003). Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.). *Plant Cell Rep.* 21: 1159–1166.

Leunufna, S. and Keller, E. R. J. (2005). Cryopreservation of yams using vitrification modified by including droplet method: effects of cold acclimation and sucrose. *CryoLett.* 26: 93–102.

Little, Elbert L. Jr. (1980). The Audubon Society field guide to North American trees. New York: Alfred A. Knopf.

Loo, S. W. (1945) Cultivation of excised stem tips of asparagus in vitro. *Am. J. Bot.* 32, 13-17.

Loreau, M., Barbault, R., Rawanabe, H., Higashi, M., Alvarez- Buylla, E., Renaud, F. 1995. Dynamics of biodiversity at the community and ecosystem level.

In: UNEP. Global Biodiversity Assessment. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp,245-274.

Lovelock J. E., Bishop M. W. H. (1959) Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* (London) 183: 1394–1395.

Lubrano L. (1992) Micropropagation of Poplars (*Populus* sp.). In: Bajaj, Y.P.S (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 18, High-Tech. Micropropagation 2, pp. 151-179, Berlin: Springer-Verlag.

Luo J, Reed B. M. (1997) Absciscic acid-responsive protein, bovine serum albumin, and proline pretreatments improve recovery of in vitro currant shoot-tip meristems and callus cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 34: 240–250.

Lynch P. T. , Finch R. P. , Davey M. R. And Cocking H. C. (1991) Rice Tissue culture its applications, In: Khush G. S. and Toenniessen G. H. (Eds.) *Rice biotechnology; biotechnology, Agriculture*, no. 6, pp. 135 -156 Wallingford: CAB International.

Malabadi R. B., Nataraja K. (2006) Cryopreservation and plant regeneration via somatic embryogenesis using shoot apical domes of mature *Pinus roxburghii* Sarg. Trees. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42: 152–159.

Mallón, R., Barros, P., Luzardo, A., and González, M. L. (2007) Encapsulation of moss buds: an efficient method for the in vitro conservation and regeneration of the endangered moss *Splachnum ampullaceum*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 88, 41-49.

Marino G., Rosati P., Sagrati F. (1985) Storage of in vitro cultures of *Prunus* rootstocks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 5(1):73-78.

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

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

Matsumoto T., Sakai A., Takahashi C., Yamada K. (1995) Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. *CryoLetters* 16: 189–196.

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

Matsumoto T., Takahashi C., Sakai A., Nako Y. (1998) Cryopreservation of in vitro grown apical meristems of hybrid statice by three different procedures. *Scientia Hort* 76: 105-114.

Meffe, G. K. And Carroll, C. R. (1994). *Principles of Conservation Biology*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass, USA.

Menges M., Murray J. A. H. (2004) Cryopreservation of transformed and wild-type *Arabidopsis* and tobacco cell suspension cultures. *Plant J* 37: 635–644.

Miller C. O., Skoog F., Von Saltza M. H., Strong F. M. (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J Am Chem Soc* 77:1392.

Morel G., Martin C. (1952) Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. *Compt. Rend. Acad. Sci., Paris*, no. 235, pp. 1324-1325.

Muir, W.H., Hildebrandt, A.C., and Riker, A.J. (1954) Plant tissue cultures produced from single isolated plant cells. *Science* 119, 877–878.

Mullis K. B., Faloona F. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. *Methods Enzymol* 155:350-355.

Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15, 473-497.

Murashige T (1977) Plant tissue culture and its biotechnical application. In: *Clonal Crops Through Tissue Culture and its Biotechnological Application* (Barz W, Reinhard E, Zenk MH, (eds). Springer Verlag, New York, 392-403.

Murashige, T. (1978) The impact of plant tissue culture on agriculture, in *Frontiers of Plant Tissue Culture 1978* (Thorpe, T. A., ed.), Intl. Assoc. Plant Tissue Culture, Univ. of Calgary Printing Services, pp. 15–26.

Niino T., Sakai A. (1992) Cryopreservation of alginate-coated in vitro-grown shoot tips of apple, pear and mulberry. *Plant Sci* 87: 199–206.

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

Niino T., Hettiarachchi A., Takahashi J., Samarajeewa P. K. (2000) Cryopreservation of lateral buds of in vitro-grown plants of innala (*Solemostemon rotundifolius*) by vitrification. *CryoLetters* 21: 349–356.

Niklas, K.J., Tiffney, A.H, Knoll, A.H. 1985. Patterns in vascular land plant diversification: analysis at the species level. In: Valentine, J.W. (Ed.). *Phanerozoic Diversity Patterns: Profiles in Macroevolution*. Princeton Uni. Press, Princeton, NJ, pp.97-128.

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

Nishizawa S., Sakai A., Amano Y., Matsuzawa T. (1993) Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Sci* 91: 67–73.

Nissen S. J. and Sutter E. G. (1990) Stability of IAA and IBA in nutrient medium to several tissue culture procedures. *HortScience* 25: 800–802.

Nobécourt, P. (1939) Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *C.R. Seances Soc. Biol. Ses Fil.* 130, 1270–1271.

Norse, E. A. And McManus, R. E. 1980. Ecology and living resources biological diversity. In: *Environmental quality 1980*. Eleventh annual report of the council on environmental quality, Washington DC, pp. 31-80.

Norse, E. A., Rosenbaum, K. L., Wilcove, D. S., Wilcox, B. A., Romme, W. H., Johnston, D. W. and Stout, M. L. (1986). *Conserving Biological Diversity in our National Forests*. The Wilderness Society, Washington DC.

Nunes, E., D. C., Benson, E. E., Oltramari, A. C., Araujo, P. S., Righetto, M., and Viana, M. (2003) In vitro conservation of *Cederla fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. *Biod. Conser.* 12, 837-848.

Ozden – Tokatli Y., Ozudogru E. A., Akcin A. (2005) In vitro response of pistachio nodal explants to silver nitrate. *Scientia Horticulturate* 106:415-426.

Ozden-Tokatli, Y., De Carlo, A., Gumusel, F., Pignattelli, S., and Lambardi, M. (2008) Development of encapsulation techniques for the production and conservation of synthetic seeds in ornamental plants. *Propagation of Ornamental Plants* 8(1), 17-22.

Ozudogru E. A., Ozden – Tokatli Y., Akcin A. (2005). Effect of silver nitrate on multiple shoot formation of Virginia type peanut through shoot tip culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41:1151-156.

Ozudogru E. A., Capuana M., Kaya E., Panis B. and Lambardi M. (2010) Cryopreservation of *Fraxinus excelsior* L. embryogenic callus by one step freezing and slow cooling techniques. (Baskıda)

Padayachee K., Watt M. P., Edwards N., Mycock D. J., P. (2008) Physiological responses of *Eucalyptus* in vitro axillary buds to cryopreparative dessication and osmotic preculture: Effects of abscisic acid. *South African Journal of Botany* 74:639-646.

Pan M. J. and van Staden J. (1998) The use of charcoal in in vitro culture – a review. *Plant Growth Regulation* 26:155-164.

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

Panshin A. J , de Zeuw C , Brown H. P. (1964) Textbook of Wood Technology V. 1. Structure, Identification, Uses and Properties of the Commercial Woods of the United States. Mc Graw Hill, New York.

Paulet F, Engelmann F, Glaszmann JC (1993) Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp.) using encapsulation/dehydration. Plant Cell Rep 12: 525–529.

Peacock, W. J. 1989. Molecular biology and genetic resources In: Brown, A.H.D., Frankel, O.H., Marshall, D.R. And Williams, J.T. (Eds.). The use of plant genetic resources. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 363-376.

Plessis P., Leddet C., Dereuddre J. (1991) Resistance to dehydration and to freezing in liquid nitrogen of alginate coated shoot-tips of grape vine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay). C R Acad Sci Paris 313 Sér III: 373–380.

Plessis P., Leddet C., Collas A., Dereuddre J. (1993) Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv Chardonnay shoot tips by encapsulation-dehydration: Effects of pretreatment, cooling and postculture conditions. CryoLetters 14: 309–320.

Poissonnier M., Monod V., Pâques M., Dereuddre J. (1991) Cryopreservation in liquid nitrogen of *Eucalyptus gunnii* shoot tips grown *in vitro* following encapsulation and dehydration. Ann Rech Sylv AFOCEL1991 1992: 5–23.

Previati, A., Benelli, C., Da Re, F., Ozudogru, A., and Lambardi, M. (2008) Micropropagation and *in vitro* conservation of virus-free rose germplasm. Propagation of Ornamental Plants 8, 93-98.

Primack, R. B. 1992. Tropical community dynamics and conservation biology. Bioscience 42:818-821.

Quatrano R. S. (1968) Freeze-preservation of cultured flax cells utilizing DMSO. Plant Physiol 43: 2057–2061.

Que G. N. (1983) Propagation of *Sequoia sempervirens* by *in vitro* cultured shoots. For Sci Technol 1:4–6.

Raghaven V. (1997) Molecular Embryology of Flowering Plants, Berlin: Springer-Verlag.

Redenbaugh K., Paasch B. D., Nichol J. W., Kossler M. E., Viss P. R., Walker K. A. (1986) Somatic seeds: Encapsulation of asexual plant embryos. *Biotechnology* 4: 797–801.

Redher A. (1958) Sequoia. In: *Manual of Cultivated Trees and Shrubs*. MacMillan Co, New York, 48.

Reed B. M. (1988) Cold acclimation as a method to improve survival of cryopreserved *Rubus* meristems. *CryoLetters* 9: 166–171.

Reed B. M. (1990) Survival of in vitro-grown apical meristems of *Pyrus* following cryopreservation. *HortScience* 25: 111–113.

Reed B. M. (1992) Cryopreservation of *Ribes* apical meristems. *Cryobiology* 29:740.

Reed B.M. (1993) Responses to ABA and cold acclimation are genotype dependent for cryopreserved blackberry and raspberry meristems. *Cryobiology* 30: 179– 184.

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

Reed B. M. and Uchendu E. (2008) Controlled rate cooling In: Reed B. M., *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer.

Reed, B. M., Okut, N., Achino, J. D., Narver, L., and DeNoma, J. (2003) Cold storage and cryopreservation of hops (*Humulus* L.) shoot cultures through application of standard protocols. *CryoLett.* 24, 389-296.

Reed B. M., Schumacher L., Dumet D., Benson E. (2005) Evaluation of a modified encapsulation-dehydration procedure incorporating high sucrose pretreatments for the cryopreservation of *Ribes* germplasm. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 41: 431–436.

Reed B. M., Schumacher L., Wang N., D’Achino J., Barker R. E. (2006) Cryopreservation of bermudagrass germplasm by encapsulation dehydration. *Crop Sci* 46:6–11.

Reeves D. W. , Horton B. D. , Couvillon G. A. (1983) Effect of media and media pH on in vitro propagation of Nemaguard peach rootstock, Scientific Horticulture, no: 21, pp. 353-357.

Reeves D. W. , Horton B. D. , Couvillon G. A. (1985) Effect of gibberellic acid (GA3) on elongation and rooting of St Julian A rootstock in Vitro, Scientific Horticulture, no.26, pp.253-259.

Reinoud P. (1996) Cryopreservation of tobacco suspension cells by vitrification. Doctoral Paper, Rijks University, Leiden

Restool D. F. (1956) The response of isolated stem segments of *Sequoia sempervirens* (Lamb) Endl cultured in vitro to various chemical and other environmental treatments. Ph D, Michigan State Univ, 119 p.

Roberts, E. H. 1975. Problems of long-term storage of seed and pollen for genetic resources conservation. In: Frankel, D. H. and Hawkes, J. G. (Eds.). Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow International Biological Programme 2. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 269-295.

Roberts, E. H. 1989. Seed storage for genetic Conservation. Plants Today 2: 12-17.

Roy D. F. (1966) Silvical characteristics of redwood. USDA For Serv Res Pap, PSW28, 1-20.

Ryynanen L. A. (1998) Effect of abscisic acid, cold hardening and photoperiod on recovery of cryopreserved in vitro shoot tips of silver birch. Cryobiology 36: 32–39.

Sakai A.(1960) Survival of the twig of woody plants. Nature 185: 393–394.

Sakai A., Nishiyama Y. (1978) Cryopreservation of winter vegetative buds of hardy fruit trees in liquid nitrogen. HortScience 13: 225–227.

Sakai, A. and Engelmann, F. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. CryoLett. 28: 151–172.

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

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

Sakai A., Matsumoto T., Hirai D., Niino T. I. (2000) Newly developed encapsulation-dehydration protocol for plant cryopreservation. *CryoLetters* 21: 53–62.

Sakai, A., Hirai, D., and Niino, T. (2008). Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. In: *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. pp. 33–57. Chapt. 3. Reed, B. M. Ed., Springer, New York, USA.

Sant, R., Panis, B., Taylor, M., and Tyagi, A. 2008. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 92: 107–111.

Schäfer-Menuhr, A., Mix-Wagner, G., and Schumacher, H. M. (1997) Cryopreservation of potato cultivars-design of a method for routine application in genebanks. *Acta Hortic.* 447, 447–483.

Scottez C., Chevreau E., Godard N., Arnaud Y., Duron M., Dereuddre J. (1992) Cryopreservation of cold-acclimated shoot tips of pear in vitro cultures after encapsulation-dehydration. *Cryobiology* 29: 691–700.

Shaffer, M. I., 1987. Minimum viable population: Coping with uncertainty. In: Soule, M.J., (Ed.). *Viable Populations of Conservation*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp.59–68.

Shclotterer C., Tautz D. (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res* 20:2211–2215.

Shetty K., Asano Y. (1991) Specific selection of embryogenic cell-lines in *Agrostis alba* L. using the proline analogue thioproline, *Plant science*, no. 79, pp. 259–263.

Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol* 11:118–131.

Solbrig, O. T (Ed.). 1991. *From Genes to Ecosystems: A Research Agenda for Biodiversity*, IUBS, Paris.

Stebbins Jr. G. L. (1948) The chromosomes and relationships of *Metasequoia* and *Sequoia*. *Science* 108, 95-98.

Steponkus, P. L., Dowgert, M. F., and Gordon-Kamm, W. J. (1983) Destabilization of the plasma membrane of isolated plant protoplasts during a freeze-thaw cycle: The influence of cold acclimation. *Cryobiology* **20**, 448–465.

Stokey R. A. (1981) Some comments on the origin and evolution of conifers. *Can J Bot* 59, 1932-1940.

Sugano N., Iwata R. and Nishi A. (1975) Formation of phenolic acid in carrot cells in suspension culture. *Phytochem* 14: 1205–1207.

Sul I-W & Korban S. S. (1994) Effect of different cytokinins on axillary shoot proliferation and elongation of several genotypes of *Sequoia sempervirens*. In *Vitro Cell Dev. Biol.* 30P: 131–135.

Suzuki T., Kaneko M., Harada T. (1997) Increase in freezing resistance of excised shoot tips of *Asparagus officinalis* L. by preculture on sugar-rich media. *Cryobiology* 34: 264–275.

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

Tanino K. K., Chen T. H. H., Fuchigami L. H., Weiser C. J. (1990) Metabolic alterations associated with abscisic acid-induced frost hardiness in bromegrass suspension culture cells. *Pl Cell Physiol* 31: 505–511.

Thinh N. T. (1997) Cryopreservation of germplasm of vegetatively propagated tropical monocots by vitrification. Doctoral Paper, Faculty of Agriculture, Kobe University, Japan.

Thomas, R. (1992). Genetic Diversity. In: Goombridge, B. (Ed.). Global Biodiversity. Status of the Earth's Living Sources. Chapman & Hall, London, pp. 1-6.

Thorpe, T. A. (1990) The current status of plant tissue culture, in *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations* (Bhojwani, S. S., ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 1–33.

Thorpe T. A., Harry I.S., Kumar P. P. (1991) Application of micropropagation to forestry. In: Debergh P. C., Zimmerman R. H. (Eds.) Micropropagation: technology and application. Dordrecht: Kluwer Academic Publications pp 311-336.

Thomashow, M. F. (1998) Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.* **118**, 1–7.

Touchell D. H., Dixon K. W. (1996) Cryopreservation for the conservation of Australian endangered plants. In: Normah MN, Narimah MK, Clyde MM (Eds.) International Workshop on the *In Vitro* Conservation of Plant Genetic Resources, Plant Biotechnology Lab., University Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur, pp 169–180.

Ulrich J. M., Finkle B. J., Moore P. H., Ginoza H. (1979) Effect of a mixture of cryoprotectants in attaining liquid nitrogen survival of callus cultures of a tropical plant. *Cryobiology* 16: 550–556.

UNEP (United Nations Environment Programme), 1992. Convention on Biological Diversity, June 1992. UNEP, Nairobi.

UNEP (United Nations Environment Programme), 1995. Global Biodiversity Assessment. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

Van Pelt, Robert. 2001. Forest Giants of North America. Seattle: University of Washington Press.

Vavilov N. I. 1949-50. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. *Chronica Botanica* 13:1-366.

Virchow, D. 1998. Conservation of Genetic Resources. Springer-Verlag, Berlin.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans 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 Acids Res* 23:4407-4414.

Walker N. (1986) Sequoia sempervirens, réjuvenilisation et culture de méristèmes en cascade. *Ann Rech Sylv AFOCEL*, 1985. 25-47.

Walker N., Dumas E., Franclet A., Bekkaoui F. (1985) Technique de cultures in vitro de méristèmes de Sequoia sempervirens et Pinus pinaster. *Ann Rech Sylv AFOCEL*, 1984. 87-108.

Watson, Frank D. 1993. Taxodiaceae. Flora of North America Editorial Committee (eds.): Flora of North America North of Mexico, Vol. 2. Oxford University Press.

Weatherhead M. A., Burdon J. and Henshaw G. G. (1978) Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. *Z Pflanzenphysiol* 89: 141–147.

Webb D. T., Flinn B. S. and Georgis W. (1988) Micropropagation of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). *Can J For Res* 18: 1570–1580.

White PR (1934) Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol* 9:585–600.

White, P. R. (1939) Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *Am. J. Bot.* 26, 59–64.

Whitters L. A. (1989) In vitro conservation and germplasm utilisation. In: Brown A. H. D. , Frankel O. H. , Marshall D. R. And Williams J. T. (Eds.) The use of genetic resources . Cambridge Uni. Press, Cambridge pp. 309-334.

Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. (1991) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primed primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535.

Wilson, E.O. 1988. The current state of biological diversity. In: Wilson E.O. and Peters, F.M. (Eds.). Biodiversity. National Academy Press, Washington DC, pp. 3-18.

Withers L. A. (1985) Cryopreservation of cultured cells and protoplasts In: Kartha KK (ed.) Cryopreservation of Plant Cells and Organs CRC Press, Boca Raton, FL, pp 243–267.

Withers L. A., King P. J. (1979) Proline: A novel cryoprotectant for the freeze preservation.

WRI, IUCN, UNEP 1992. Global Biodiversity Strategy: Guidelines for Action to Save, Study, and Use Earth's Biotic Wealth Sustainably and Equitably. WRI Publications, Baltimore, MD.

Wu Y., Zhao Y., Engelmann F., Zhou M. (2001) Cryopreservation of apple dormant buds and shoot tips. CryoLetters 22: 277–284.

Yamada T., Sakai A., Matsumura T., Higuchi S. (1991) Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.) by vitrification. Plant Sci 78: 81–87.

Yang S. F. And Hoffman N. E. (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 35:155-189.

Zhao Y., Wu Y., Engelmann F., Zhou M. (2001) Cryopreservation of axillary buds of grape (*Vitis vinifera*) in vitro plantlets. CryoLetters 22: 321–328.

Zhao Y., Wu Y., Engelmann F., Zhou M., Zhang D., Chen S. (1999) Cryopreservation of apple shoot tips by encapsulation-dehydration: effect of preculture, dehydration and freezing procedure on shoot regeneration. CryoLetters 20: 103– 108.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Kahramanmaraş ilinde doğan Emrah Kırdök, ilkokul 4. sınıfa kadar öğrenimini yine Kahramanmaraş ilinde tamamladı. Üniversiteye kadar ise öğrenimini Antalya’da devam ettirdi. Üniversite öğrenimini 2006 yılında İstanbul Üniversitesi Biyoloji bölümünde tamamladı ve aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsünde Yüksek lisans eğitimine başladı. 2009 yılında yine aynı üniversitede “Araştırma Görevlisi” olarak akademik hayata adım attı.

Yrd. Doç. Dr. Elif Aylin Özudoğru denetiminde 2008 yılında “*Sequoia sempervirens* (Sahil Sekoyası)’ in kriyoprezervasyon yolu ile uzun süreli saklanması amacıyla tek aşamalı dondurma yöntemlerinin geliştirilmesi” isimli Yüksek lisans tez çalışmasına başladı. 2009 yılında bu çalışmanın bir kısmını “The 2009 In Vitro Biology Meeting” isimli kongrede sunarak 1200 USD değerinde 2 tane ödül (John S. Song Award, Student Travel Award) kazandı.

Kendisi halen Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsünde Araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

EKLER

EK – 1: “THE SIVB 2009 IN VITRO BIOLOGY MEETING” ADLI KONGREDE SUNULAN BİLDİRİNİN ÖZETİ

Development of Procedures For Medium- and Long-term Storage of Coast Redwood (*Sequoia sempervirens*). EMRAH KIRDOK¹, Yelda Ozden-Tokatli¹, Maurizio Capuana², and Elif Aylin Ozudogru¹. ¹Gebze Institute of Technology, Department of Biology, Istanbul cad., n^o: 101, 41400 Gebze, (Kocaeli), TURKEY and ²IGV/Istituto Genetica Vegetale, CNR, via Madonna del Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino (Florence), ITALY. Email:ekirdok@gyte.edu.tr, elif@gyte.edu.tr

Abstract:

Sequoia sempervirens is a conifer tree, belonging to the genus *Sequoia*. The lumber, valued for light weight and resistance to decay, makes the tree one of the most valuable timber species. However, urbanisation, fires and storms give rise to the loss of this valuable germplasm. Today, biotechnological approaches offer a powerful alternative for safe storage of such genetic resources. Among these, 'slow growth storage' enables the storage of plant germplasm from several months to several years (medium-term storage) by reducing the growth rate of *in vitro* cultures in modified conditions. Cryopreservation, i.e. storage of plant germplasm at ultra-low temperatures (e.g. in liquid nitrogen at -196°C), where the biological reactions in the cells are hampered, makes available the storage of plant material for theoretically unlimited periods of time (long-term storage). Present study investigated the possibility of applying slow growth storage and cryopreservation to *S. sempervirens*. Former was achieved by maintaining encapsulated buds (in 3% Na-alginate solution) and *in vitro* shoot cultures at 4°C, in darkness on four different media compositions (MS + 1mg/l BA, MS 0, QL + 1mg/l BA, QL 0) for 3-15 months, while latter was performed by pre-culturing the buds on sucrose-rich medium (0.12, 0.25 or 0.5 M for 24, 48 or 72 h), osmoprotection of the samples by PVS2 (15-120 min at 0°C) on aluminum foil strips (droplet freezing method) and direct immersion in liquid

nitrogen. After at least 1 h of storage in liquid nitrogen, frozen samples were thawed by incubating them rapidly in 1.2 M sucrose solution and transferred to the recovery medium (QL + 20 gr/l activated charcoal). Outcomings of the study revealed the possibility of conserving *in vitro* shoot cultures at 4°C and in darkness for a minimum of nine months without losing growth potential. As regards cryopreservation, optimizing pre-culture conditions previous to storage in liquid nitrogen and using droplet freezing approach for the induction of osmoprotection led to a satisfactory long-term storage of the buds with high post-thaw recovery rates.

**EK – 2: THE SIVB 2009 IN VITRO BIOLOGY
MEETING” ADLI KONGREDE KAZANILAN ÖDÜ-
LÜ BELGELEYEN YAZI**

M.Sc. Emrah Kirdok

Gebze Yuksek Teknoloji Enstitusu Istanbul Caddesi

no:101 Biyoloji Bolumu

Kocaeli, 41400

TURKEY

Dear Emrah Kirdok:

Congratulations on your selection as the 2009 recipient of the John S. Song Award in the amount of \$600.00 and SIVB Travel Award in the amount of \$600.00. The Student Affairs Committee has selected your abstract #1080640 entitled, "Development of Procedures For Medium- and Long-term Storage of Coast Redwood (*Sequoia sempervirens*)," as the 2009 award winner.

We have planned a special breakfast meeting on Tuesday, June 9, at 7:00 a.m. for the Student Affairs Committee and 2009 Award recipients. You are invited to attend this important meeting and thank the committee members, as well as address any issues pertaining to student participation in the Society for In Vitro Biology.

Your award will be presented during the SIVB Business Meeting on Tuesday, June 9, 2009. In order to receive your certificate, please plan on attending this meeting from 5:00 pm - 5:30 pm. On Saturday, June 6, the Society will present a symposium on "How to Get the Most out of a Scientific Conference." On Sunday, June 7, the Society will host a Keynote Symposium, which will be followed by the Opening Ceremony Reception. Following the reception is a special workshop on how to "Build Your Written/Oral Skills, Advertise Yourself and Find That Perfect Job." This symposium will discuss how a well prepared candidate, with an effective job search

plan, will be successful in securing a position in their chosen field. Additionally, there will be a special networking luncheon session on Monday, June 8 to discuss the information presented at the Saturday and Sunday sessions as well as to determine what other areas of career development are necessary to the young SIVB scientist and could be focused on for the 2010 Student Committee hosted session. Students are encouraged to attend all of these events to interact with the Keynote Speaker, Education Committee, other student attendees, and members of the SIVB Board of Directors.

I have enclosed an Expense Reimbursement Form that must be submitted to the SIVB registration desk or the Business Office after the meeting in order for you to receive maximum reimbursement travel expenses up to the amount granted. Please note that you will receive the award only if you are able to attend the meeting. If the amount of the award is insufficient to allow you to cover your costs for travel and attendance at the meeting, you can use the receipt of this award as leverage to obtain further funding from other sources, including your institution.

The Society for In Vitro Biology (SIVB) is pleased to recognize outstanding science and encourages scientific excellence at all levels. Congratulations again and I look forward to meeting you in Charleston, South Carolina.

Regards,

Marietta Wheaton Ellis

Meeting Secretariat