

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KRİYOPREZERVASYON YÖNTEMLERİNDEN
VİTRİFİKASYON TEKNİKLERİNİN EKONOMİK OLARAK
ÖNEMLİ ÜZÜM (*Vitis vinifera* L.) ÇEŞİTLERİNDE
UYGULANABİLİRLERİNİN İZLENİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATMA KAYHAN

DENİZLİ, KASIM - 2015

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



KR YOPREZERVASYON YÖNTEMLERİNDEN
VİTRİFİKASYON TEKNİKLERİNİN EKONOMİK OLARAK
ÖNEMLİ ÜZÜM (*Vitis vinifera* L.) ÇEŞİTLERİNDE
UYGULANABİLİRLERİNİN İZLENİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATMA KAYHAN

DENİZLİ, KASIM - 2015

KABUL VE ONAY SAYFASI

FATMA KAYHAN tarafından hazırlanan "KRİYOPREZERVASYON YÖNTEMLERİNDEN VİTRİFİKASYON TEKNİĞİNİN EKONOMİK OLARAK ÖNEMLİ ÜZÜM (*Vitis vinifera* L.) ÇEŞİTLERİNDE UYGULANABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 23.11.2015 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Doç. Dr. Fevziye ÇELEBİ TOPRAK
Pamukkale Üniversitesi
Üye
Prof. Dr. Bayram ÇEVİK
Süleyman Demirel Üniversitesi
Üye
Doç. Dr. Ali Ramazan ALAN
Pamukkale Üniversitesi

F. Çelebi
Bayram Çevik
Ali Ramazan Alan

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
23/12/2015 tarih ve ..48/16..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

O. Karabulut

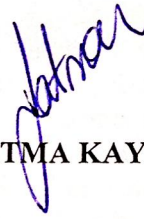
Prof. Dr. Orhan KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**Bu tez al, mas, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Ara tırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından 2012 FBE030 nolu proje ile desteklenmiştir.**

OZET

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.


FATMA KAYHAN

ÖZET

**KR YOPREZERVASYON YÖNTEMLER N DEN V TR F KASYON TEKN N N
EKONOM K OLARAK ÖNEML ÜZÜM (*Vitis vinifera* L.) ÇE TLER NDE
UYGULANAB L RL N N ARA TIRILMASI
YÜKSEK L SANS TEZ
FATMA KAYHAN
PAMUKKALE ÜN VERS TES FEN B L MLER ENST TÜSÜ
B YOLOJ ANAB L M DALI
(TEZ DANI MANI: DOÇ. DR. FEVZ YE ÇELEB TOPRAK)**

DEN ZL , KASIM - 2015

Üzüm (*Vitis vinifera* l.) *Vitaceae* familyas,na ait olan önemli bir meyve türüdür. Genetik kaynaklar,n saklanması, ve korunması, ekonomik ve stratejik aç,dan önemlidir. Kriyoprezervasyon bitkisel genetik kaynaklar,n -196 °C'de s,v, azotta uzun dönem saklanması, için geli tirilmi de erli bir yöntemdir. Geleneksel yollar ile genetik kaynaklar,n saklanması, do adaki bilinmezlikler yüzünden risklidir. *In vitro* teknolojisi sayesinde viroid, virüs, bakteri, fitoplazma, fungus ve nematod gibi hastal,k ve zararlılardan ar,nd,r,lm, temiz materyal üretilebilmektedir. *In vitro* ve dondurarak saklama teknolojileri birle tirilerek de erli *Vitis* genetik kaynaklar, güvenli bir ekilde korunabilir. Bu çal, mada, 12 ticari çe it ve iki anaç materyalleri *in vitro* klonal ço alt,m ve dondurma teknikleri ile uzun süreli koruma uygulanabilirli i aç,s,ndan test edilmi tir. Sürgün uçlar, 30 gr/l sükröz içeren Murashige ve Skoog (MS) besi ortam,na konulmu ve alt kültür olu turularak ço alt,lm, t,r. Test edilen tüm üzüm genotipleri bu uygulama iyi cevap vermi tir ve hepsi sa l,kl, kök ve sürgün üretmi tir. *In vitro* üzüm bitkilerinden kesilmi apikal uç sürgünleri dondurulması, için s,v, azot içinde dald,r,lm, t,r. Kriyoprezervasyon uygulamas,na genotiplerin cevaplar, farklı olmu tur. Be genotipte sürgün olu umu görülmü tür (Merlot %76.0, Alicante Bouschet %50.0, Çal Karas, %10.0, Trakya Ilkeren %7.7 ve 1103 P %22.2). Bu sürgünler geli erek gövde ve kök olu turarak tam bir bitkiye dönü mü tür. Di er dokuz genotipte büyüme ve geli me s,n,r, olmu ve bitki olu umu görülmemi tir. Alt kültür ve kriyoprezervasyondan gelen bitkilere flow sitometri analizleri yapıld, nda kromozom say, anomaliteleri görülmemi tir.

Bu çal, ma ile yerel üzüm çe itlerinde de kriyoprezervasyon yönteminin uygulanabilece i ilk kez gösterilmi tir. Bitki elde edilemeyen çe itlerde farklı yöntemler, farklı besi ortamlar, ve farklı bitki büyüme düzenleyicileri kullanarak kriyoprezervasyon uygulamalar,na devam edilmelidir.

ANAHTAR KEL MELER: Üzüm, *Vitis vinifera*, kriyoprezervasyon, vitrifikasyon

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF APPLICABILITY OF CRYOPRESERVATION METHODS ON ECONOMICALLY IMPORTANT GRAPE (*Vitis vinifera* L.)

KINDS

MSC THESIS

FATMA KAYHAN

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF., FEVZ YE ÇELEB TOPRAK)

DEN ZL , NOVEMBER 2015

Grape (*Vitis vinifera* L.) is an important fruit which belongs to *Vitaceae* family. The protection and preservation of genetic resources are important both economically and strategically. Cryopreservation is valuable method, allows long term storage of plant genetic resources in liquid nitrogen (LN) at -196 °C. The traditional way of germ plasm preservation is very risky due to natural uncertainties. *In vitro* echnologies can help producing healthy propagation materials free from viroids, viruses, bacteria, phytoplasmas, fungi and nematodes. When combined with cryopreservation technologies *in vitro* preservation systems can allow safe protection and propagation of valuable *Vitis* genetic resources. In this study, 12 commercial cultivars and two rootstocks were tested for the applicability of long term preservation by *in vitro* clonal propagation and cryopreservation techniques. Axillary shoot tips collected from newly emerging shoots were placed in Magenta boxes containing 30 g/l sucrose on Murashige ve Skoog (MS) medium and cultured in a growth chamber adjusted to 16 h light / 25 °C and 8 h dark / 17 °C. All grape genotypes tested responded well to this application and produced healthy root and shoots. Apical dome explants excised from *in vitro* grape plants were stored in liquid nitrogen for cryopreservation. Genotypes varied in their responses to cryopreservation treatment. Five genotypes showed shoot of different rate formation. Regenerated shoots continued to grow and produced normal shoots and roots (Merlot %76.0, Alicante Bouschet %50.0, Cal Karasi %10.0, Trakya Ilkeren %7.7 and 1103 P %22.2). Other nine species showed on cultuvar limited growth and development. Flow cytometry analysis of regenerants from continuous subculture and cryopreservation did not show any chromosome number abnormalities.

This study demonstrates for the first time that the vitrification method can be used as a choice of cyropresarvation in some regional grape species successfully. Further studies are needed for the cultuvars that were unable to grow under these experimental conditions; alternative methods including modified media and growth conditions could be investigated.

KEYWORDS: Grape, *Vitis vinifera*, cryopreservation, vitrification.

Ç NDEK LER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
Ç NDEK LER.....	iii
EK L L STES	iv
TABLO L STES	v
SEMBOL L STES	vi
ÖNSÖZ.....	viii
1. G R	1
1.1 Tezin amac,	4
1.2 Literatür Özeti	4
1.2.1 Bitki Genetik Kaynaklar, ve Korunmas,n,n Önemi	4
1.2.2 Bitki Genetik Kaynaklar,n Korunma Yöntemleri	7
1.2.2.1 <i>In vitro</i> koruma	8
1.2.2.2 <i>In vitro</i> Korunma Yöntemleri	10
1.2.2.3 Kriyoprezervasyon Teorisi	11
1.2.2.4 Kriyoprezervasyon teknikleri	22
1.2.2.5 Dondurulmu gen kaynaklar,n,n yeniden kazan,ımas,	26
2. YÖNTEM	27
2.1 Bitki Materyali.....	27
2.2 Bitkisel Materyalin Köklendirilmesi	28
2.3 Bitkisel Materyalin <i>In Vitro</i> Ço alt,ımas,.....	28
2.4 Sürgün Uçlar,na Yüzey sterilizasyonu.....	29
2.5 Sürgün Uçlar,n,n Ço alt,ımas,.....	29
2.6 Kriyojenik Prosedür	31
2.7 Sürgün Uçlar,n,n Büyütülmesi	34
2.8 Sürgün Uçlar,n,n Flow Sitometri ile Analizi	35
3. BULGULAR.....	38
4. TARTI MA	44
5. SONUÇ VE ÖNER LER	50
6. KAYNAKLAR	52
7. ÖZGEÇM	61

EK L L STES

Sayfa

ekil 2.1:	Asmada köklendirme a amalar,í í í í í í í í í í í í í .	28
ekil 2.2:	Doku kültürüne aktar,ld,ktan 20 gün sonra sürgün uçlar,n,n durumuí í í í í í í í í í í í í í í í í í í í í í í	29
ekil 2.3:	Steril kabinde sürgün uçlar,n,n alt kültür olu turularak ço alt,lmas,í í í í í í í í í í í í í í í í í í í í í í .	30
ekil 2.4:	Kriyojenik prosedürün a amalar,í í í í í í í í í í í í í ...	33
ekil 2.5:	Sürgün uçlar,n,n kriyojenik prosedür sonras,nda çözdürülmesi ve rejenerasyon medyas,na al,nmas,í í í í í í í í í í í í í	34
ekil 2.6:	PAÜ B YOM doku kültürü odas,í í í í í í í í í í í í í ...	35
ekil 2.7:	Sürgün uçlar,n,n Flow Sitometri ile analizi.í í í í í í í í ..	36
ekil 3.1:	Trakya lkeren çe idinin kriyo rejenerasyon medyas,na koyulduktan üç hafta sonra sürgün uçlar,n,n geli imi.í í í í ...	38
ekil 3.2:	1103 P anac,nda, rejenerasyon medyas,na koyulduktan üç hafta sonra sürgün uçlar,n,n geli imií í í í í í í í í í í í í í ...	39
ekil 3.3:	Kriyoprezervasyon sonras,nda bitki olu umu gösteren asmalarda sürgün uçlar,n,n geli im a amalar,í í í í í í í í í í í í í ..	40
ekil 3.4:	Flow Sitometri histogram,í í í í í í í í í í í í í í í í í í ...	43

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1:	PAÜ B YOM serasında büyütülmüş 12 ticari çeşidin özellikleri...	27
Tablo 2.2:	PAÜ B YOM serasında büyütülmüş 2 anacık özelliği...	27
Tablo 2.3:	Çal, mada kullanılan MS tabanlı medyaların içerikleri...	31
Tablo 2.4:	1/2 PVS2 ve tam PVS2 çözeltilerinin içerikleri...	32
Tablo 2.5:	Çekirdek izolasyon tamponu (NIB) içeriği (100 ml için)...	35
Tablo 3.1:	Çal, mada kullanılan hatlar ve bu hatlara ait s, v, azota daldırılan (LN+) ve daldırılmayan (LN-) sürgün ucu sayısı, rejenerasyon sonrasında canlılık ve büyüme ile bitki oluşumu sayısı ve oranlar,	41

SEMBOL L STES

mg/L	: Miligram/litre
gr/l	: Gram/litre
M	: Molar
ml	: Mililitre
g	: Gram
cm	: Santimetre
sn	: Saniye
mg/ml	: Miligram/mililitre
mM	: MiliMolar
LN+	: S,v, azota dald,r,lan
LN-	: S,v, azota dald,r,lmayan

KISALTMALAR LİSTESİ

DMSO	: Dimetil Sülfoksit
PEG	: Polietilen Glikol
Tg	: Cam, Geçirgenlik, ...
DSC	: Diferansiyel Tarama Kalorimetresi
PVS	: Bitki Vitrifikasyon Solüsyonu
PVP	: Polivinilpirolidon
PAÜ	: Pamukkale Üniversitesi
BİYOM	: Bitki Genetiği ve Tarımsal Araştırma Merkezi
IBA	: İndol Bütirik Asit
MS	: Murashige ve Skoog
NH₄NO₃	: Amonyum nitrat
CaCl₂.2H₂O	: Kalsiyum klorid dihidrat
MgSO₄.7H₂O	: Magnezyum sülfat hepta hidrat
KNO₃	: Potasyum nitrat
KH₂PO₄	: Potasyum klorür
KI	: Potasyum iyodür
H₃BO₃	: Borik asit
MnSO₄.H₂O	: Mangan sülfat mono hidrat
ZnSO₄.7H₂O	: Çinko sülfat hepta hidrat
Na₂MoO₄.2H₂O	: Disodyum molibdat tetra oksit dihidrat
CuSO₄.5H₂O	: Bakır sülfat penta hidrat
FeSO₄.7H₂O	: Demir sülfat hepta hidrat
CoCl₂.6H₂O	: Kobalt klorid hekza hidrat
Na₂.EDTA	: Di sodyum etilendiamin tetraasetat
BAP	: 6-Benzylaminopurine
pH	: Hidrojenin gücü
YS	: Yükleme solüsyonu
EG	: Etilen Glikol
RM	: Rejenerasyon Medyası,
NIB	: Nuclei isolation buffer (çekirdek izolasyon tamponu)
HEPES	: 2-[4-(2-Hidroksietil)-1-piperazine]ethanesulfonik asit
KCl	: Potasyum klorür
NaCl	: Sodyum klorür
PI	: Propidium iyodür
Pg	: Pikogram

ÖNSÖZ

Genetik kaynakların korunması, ve saklanması; ekonomik ve stratejik açıdan önemlidir. Kriyoprezervasyon genetik kaynakların uzun dönem saklanması,na olanak tanıyan bir yöntemdir. Bu çalışmada ile kriyoprezervasyon tekniklerinin ekonomik olarak önemli üzüm (*Vitis vinifera* L.) çeşitlerinde uygulanabilirliği araştırılmıştır. Uygun kriyoprezervasyon tekniğinin seçimi ile Türkiye’de asma gen kaynaklarının korunması, ve saklanması, yolunda önemli bir adım olacaktır.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde her aşamada katkıları, ve emeğini esirgemeyen sevgili danışman Doç.Dr. Fevziye ÇELEBİ TOPRAK, yine emeği ve katkıları bulunan Doç. Dr. Ali Ramazan ALAN, çalışmanın yürütülmesinde bana yardımcı olan arkadaşları Fatma Nur KAPLAN BİLGEÇ, Okan GÜNDEMİR, Nalan ALAN, Kevser Esra ÖZDEMİR ve Ph.D. Peter BLOWERS, PAÜ BİYOM çalışmaya ekibine, çalışmaya malzemelerinin alınması, için maddi destek veren Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne (BAP), değerli aileme, tezime ve yayımlarıma katkılarından dolayı, sevgili eşi Doç. Dr. Ali Haydar KAYHAN, kendilerinden çaldıkları zaman konusunda göstermiş oldukları anlayış için teşekkürlerimi sunarım.

Kasım 2015

Fatma KAYHAN

1. G R

Magnoliopsida (Dicotyledoneae) s,n,f,n,n Rosidae alt s,n,f,ndaki Rhamnales ordosunun *Vitaceae* (asmagiller) familyas,na ait olan *Vitis vinifera* L. (asma) bitkisinin ülkemizde özellikle Trakya, Bat, ve Güney Anadolu'da kültürü yapılmaktadır (Seçmen 1995). Kültür asması, (*V. vinifera* L.) *Vitaceae* familyas,n,n *Vitis* cinsinde yer alan 32 türün en önemlisidir. Dünyada halen yetiştirilmekte olan üzüm çeşitlerinin %90'ından fazlası, bu türe ait çeşitler ya da melezlerinden oluşmaktadır. Bugün itibarıyla dünyada 10,000'in üzerinde üzüm çeşidi belirlenmiştir (Çoban 2006). Bunun 1,200'ünden fazlası, ülkemizde yetiştirilmektedir (Ergeneo lu 2000). Asma,n ve bağı,k kültürünün anavatanı, olarak kabul edilen ülkemiz son derece uygun ekolojik koşullara sahip olması, nedeniyle çok geniştir bir çeşit ve tip zenginliğine, dolayısıyla, ile büyük bir asma gen potansiyeline sahiptir (Çoban 2006). Arkeolojik buluntulara göre Anadolu, bağı,k kültürünün beşi ve merkezi olarak kabul edilmektedir (Oraman 1972; Fidan 1985)

Dünyada bağı,k birçok ülkede tarih boyunca birinci derece önem taşıyan bir tarım kolu olmuştur. Bu durumun başlıca nedeni ekonomik olarak üzümün sofralık, araplık, kurutulmuş, meyve suyu ve diğer mamul ürünler şeklinde değerlendirilmesine sahip bir ürün olmasıdır. Ayrıca arazi değerlendirilmesi, toprak muhafazası, istihdam ve beslenme açısından da bağı,k, dünyada vazgeçilmez bir tarımsal faaliyet olarak günümüzde de önemini devam ettirmektedir (Bağı,k Raporu 2000).

Türkiye toplam bağ alanı bakımından dünya ülkeleri arasında beşinci ve ya üzüm üretimi bakımından da altıncı sırada bulunmaktadır (FAO 2013). TÜİK 2014 verilerine göre toplam 4,175,356 ton üzüm üretilmiştir.

Türkiye, yıllık üzüm üretim değerleriyle dünyanın önde gelen bağ ülkeleri arasında yer almaktadır. Dünyaca ünlü üzüm çeşitlerinin yetiştirildiği ülkemizde bağlık sektörü bölgesel olarak incelendiğinde; Ege Bölgesinin çekirdeksiz kuru üzüm, Marmara Bölgesinin sofralık ve araplık, Akdeniz Bölgesinin ilk turfanda, Orta Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinin araplık, ,ralık, sofralık ve

çekirdekli kurutmal,k üzüm yeti tiricili i yönünden geli me gösterdi i görülmektedir (Ba c,l,k Raporu 2000). Güney Ege Bölgesi (Ayd,n, Denizli ve Mu la) meyve üretiminde üzüm önemli bir yere sahiptir. 2008 y,l, rakamlar,na göre ülkemizde üretilen sofral,k çekirdeksiz üzümün %21.89ı, arapl,k üzümün %11.73ı, kurutmal,k çekirdekli üzümün %7.12ı, kurutmal,k çekirdeksiz üzümün %5.42ı ve sofral,k çekirdekli üzümün %5.28ı Güney Ege bölgesinde yeti mektedir (TÜ K 2008). 2008 y,l, verilerine göre Çal ilçesinde kurutmal,k çekirdekli üzüm üretimi 10,998 ton olarak gerçekte mi tir. Bu üretim miktar, ile Çal, Güney Ege Bölgesindeki üretimin %48.11ını Türkiye üretiminin ise %3.42ını kar ,lamaktad,r. Çal ilçesini Baklan, Ac,payam, Buldan ve Bekilli ilçeleri izlemektedir (TÜ K 2008). Kurutmal,k çekirdeksiz üzüm üretiminde Buldan 28,675 tonluk üretimi ile bölgede %45.72 paya sahiptir (TÜ K 2008). Bölgede kurutmal,k çekirdeksiz üzüm üretiminde Çal (20,600 ton) ve Çivril (5,310 ton) di er önemli ilçelerdir (TÜ K 2008). Sofral,k çekirdeksiz üzüm üretiminde 31,711 tonluk üretimi ile Buldan ilçesi 2008 y,l,nda bölgede öne ç,km, t,r (TÜ K 2008). Bölgedeki üretimde %30.14, ülke üretiminde ise %6.60ı,k paya sahip olmu tur (TÜ K 2008). Sofral,k çekirdeksiz üzüm üretiminde Buldan ilçesini, Honaz (23,490 ton), Çal (18,464 ton), Çivril (7,713 ton), Denizli (7,177 ton) izlemektedir (TÜ K 2008). arapl,k üzüm üretiminde Çal ilçesi 21,099 ton üretim ile TR32 Bölgesinde %38.25, ülke üretiminde %4.49 paya sahiptir (TÜ K 2008). Çal ilçesini Güney (16,872 ton), Bekilli (12,038 ton), Baklan (3,080 ton) izlemektedir (TÜ K 2008).

Ülkemiz ba c,l, ,n,n geli tirilmesi ve milli ekonomimize olan katkı,s,n,n daha yüksek düzeylere ula t,r,lmas,, öncelikle sahip oldu umuz asma genetik kaynaklar,n,n belirlenmesi, korunmas, ve de erlendirilmesine yönelik olarak yap,lan çal, malar,n yürütülmesi büyük önem ta ,maktad,r (Kara 1990).

Son y,llarda çe itli nedenlerle ülkemiz ba sahalar,nda sürekli bir azalma oldu u gözlenmektedir. Bu durum, henüz tan,mılanmas, bile yap,lmam, üzüm genetik kaynaklar,n,n yok olma tehlikesini gündeme getirmektedir (Ecevit ve Kelen 1999). 2007-2011 y,llar, aras,nda ise üzüm ekilen alan %4.0 oran,nda azalm, t,r (Dünya Ba c,l,k Raporu 2012).

Çe it ve tip bak,m,ndan oldukça zengin bir potansiyele sahip olmas,na kar ,n, günümüzde biyotik ve abiyotik streslere kar , dayan,kl,, verim ve kalitesi yüksek

üzüm çe itlerine olan talepler gün geçtikçe artmaktadır. Bu da ,slahç,lar, yeni çe itler elde etmeye ya da ekonomik önemi yüksek üzüm çe itlerine baz, özellikler kazandırmaya yönelik ,slah çal, malar,na yönelmektedir. Klasik ,slah yöntemlerinde kar ,la ,lan güçlükler, özellikle son yıllarda moleküler genetik metotlar,n,n kullan,ld,g, yeni ,slah yöntemlerinin gelişmesine neden olmuştur. Ancak moleküler genetik metotlar,n,n ,slah çal, malar,nda başarılı bir şekilde uygulanabilmesi, her şeyden önce bu yöntemlerde ,slah materyali olarak kullan,lan bitki parçac,klar,n,n (eksplant) *in vitro* koşullarda tam bitkiye dönüşmelerinin sağlanması, ile mümkün olabilmektedir (Baydar 2000).

*In vitro*da ilk kültüre alınan bitki türlerinden biri olan asmada, bölünmüş sürgün uçları, (Barlass 1978, 1980) ve bu umaras, parçac,klar, yan,nda (Rajasekaran ve Mullins 1981), yaprak sap, ve ayalar,ndan da adventif sürgün organogenezisi yoluyla tam bitki oluşturulması, ile gösterimlerdir (Stamp ve di . 1990).

Genetik kaynaklar ço u insan aktiviteleri yüzünden (şehirleşme, arazilerin tar,ma aç,ılması,, modern tar,ım metotlar,n,n uygulanması,, vs.) çok hızlı bir erozyona maruz kalmaktadırlar. Bu anda uzun vadede tar,ım ve gıda güvenliği açısından en büyük strateji bu genetik kaynakların korunması,, de erlendirilmesi, karakterize edilmesi, canlı, ,n,n uzun yıllar saklanması, ve etkin bir şekilde ,slahç,lar,n kullan,m,na aç,ılması,d,r. Genetik kaynakların saklanması, ve korunması, ekonomik ve stratejik açıdan önemlidir. Bitkisel genetik kaynaklar, botanik bahçeleri, ya da ormanlar,, tarla koleksiyonu şeklinde yerinde *in situ* saklan,ırken (Rao 2004); tohum bankası,, DNA bankaları, şeklinde de doğal ortamlar, d, ,nda *ex situ* olarak saklan,rlar (King ve Roberts 1980; Hong ve di . 1996). Tohum olarak saklanması,na olanak olmayan ya da tohum üretemeyen genetik kaynaklar ise klonal olarak *in vitro* koşullarda saklan,ır (Withers ve Engelmann 1997; Rao 2004). *In vitro* koşullarda genetik kaynakların saklanması,nda iki yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler s,ras, ile kısa ve orta vadede genetik kaynakların saklanması, için yavaş büyüme ve uzun dönem saklamak için kriyoprezervasyondur (Withers ve Engelmann 1997; Rao 2004). Yavaş büyüme yönteminde, bitkisel materyal periyodik olarak alt kültür alınarak, doku kültürü koşullar, alt,nda birkaç yıl tutulabilir (Kaviani 2011). Ancak bu süreçte bitki morfolojisindeki değişimler gecikir ve DNA metilasyonu (Harding 1994) ve somoklonal varyasyon (Kumar 1994) oluşabilir. İnsan hatası, ve

kontaminasyon riski nedeniyle kaynak materyal kaybedilebilir. Kriyoprezervasyon biyolojik materyalin uzun dönem saklanması, için son yirmi beş yılda geliştirilmiş en etkili ve önemli yöntemdir (Kaviani 2011). Kriyoprezervasyon da örnekler -196 °C'de s, v, azotta uzun dönem saklanabilir (Engelmann ve Engels 2002). Doku kültürü laboratuvarlarında kolayca hücre, doku ve organlara uygulanabilir (Kaviani 2011). Geni alana, farklı tür bitkilere uygulanabilmektedir (Engelmann 2004). Eksplantların sonsuza kadar saklanabilme olanağı vardır, alt kültür yapılmasına gerek yoktur (Kaviani 2011). Kriyoprezervasyon uygulanmış bitki materyallerinin kriyotanklar içinde taşınması, daha kolay ve daha pratiktir (Kaviani 2011). Bu nedenle ülkemizde asma genetik kaynaklarının korunması ve saklanması için kriyoprezervasyon tekniklerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

1.1 Tezin amacı,

Genetik kaynakların korunması ve saklanması, ekonomik ve stratejik açıdan önemlidir. Kriyoprezervasyon genetik kaynakların uzun dönem saklanmasına olanak tanıyan bir yöntemdir. Saklanmak istenilen genetik kaynaklar -196 °C'de s, v, azotta saklanır. Ülkemiz asmanın anavatanı olması ve bağcılık tarımının hayli eskiye dayanması, yanında, gerek üretim miktarı ve gerekse çeşit zenginliği bakımından dünyanın sayılı ülkeleri arasında yer almaktadır. Bu nedenle, kriyoprezervasyon yöntemlerinden vitrifikasyon tekniğinin ekonomik olarak önemli olan üzüm çeşitlerinde uygulanabilirliğini araştırılması, tezin ana amacıdır.

1.2 Literatür Özeti

1.2.1 Bitki Genetik Kaynakları ve Korunmasının Önemi

Bitki genetik kaynakları, yerel çeşitler olarak nitelendirilen köy popülasyonları; bunların yabancı akrabaları, artık kullanılmayan eski çeşitler ve kalıtsal özellikleri belirlenmiş hatlardan oluşur. Kesilebilen bitkilerin geliştirilmesi için bu canlılar ile yabancı formların da içine alan canlı materyalidir.

insanlar tarafından, bu kadar, ilk yıllardan bu yana, doğada mevcut bitkisel kaynaklar, tüketim amaçlarına göre kültürel olarak bugün de kullanılmakta olduğu umuz türlerine ait çeşitleri geliştirmişlerdir (Balkaya ve Yanmaz 2001). Bitki genetik kaynakları; ormansızlaştırma, kentleşme, iklimsel değişiklik, pazar ekonomisi, kirlilik, istilacı türlerin yayılması, gibi pek çok nedenle tehlike altındadır.

Tarih bize insanın ürünlerini koruyamadığını, dolayısıyla salgın hastalıkların gıda yetersizliklerle bağlantılı olarak zaman zaman fazla geçmişte kalmadığını göstermektedir. İrlanda'da 1846 ile 1851 arasında yaşanan ve 1.5 milyon insanın patates mildiyösü sonucu açlıktan öldüğü büyük kıtlık buna en iyi örnektir (Davidson 2000).

Ayrıca bitki genetik kaynakları, gıda ve tarım konusunda küresel gıda güvenliğinin temelidir hem stratejik hem de ekonomik olarak önemlidir (Rao 2004). Genetik kaynakların herbirinin ekonomik etkisini hesaplamak oldukça zordur, çünkü tarımsal üretime katkıları ve bunun ekonomiye yansımaları, çoklukla dolaylı ve hesaplaması oldukça karmaşıktır. Buna rağmen bitki genetik kaynaklarının küresel ekonomik değeri için çeşitli hesaplamalar yapılmış ve modern varyetelerin üzerinden yapılan değerlendirmelerde yıllık katkı 13-30 milyar dolar arasında hesaplanmıştır (Dutfield 1999).

Ayrıca oldukça iyi tarımsal istatistiklere sahip Amerika Birleşik Devletleri'nin (ABD) tarımsal verileri kullanılarak, yabancı varyetelerin ekonomik değerleri için bazı hesaplamalar yapılmıştır ve bu hesaplar sadece tarımsal üretimdeki kayıpların bertaraf edilmesinden kaynaklanan ekonomik giridi olarak yansıtılmıştır. Örneğin Etiyopya'dan elde edilen arpada sarı küçüklük hastalığına, bertaraf eden direnç geninin Amerikan ekonomisine ortalama yıllık katkı, yaklaşık 150 milyon dolar, Türkiye'den elde edilen ve bu bağlamda çizgili pas hastalığına direnç sağlayan genetik kaynağın Amerikan ekonomisine yıllık katkı, yaklaşık 50 milyon dolar olarak hesaplanmıştır (Myers 1979).

Bu kadar ciddi ekonomik etkisinin yanında genetik kaynaklar, stratejik kıtlık bir diğer önemli özellik ise tarım sektörünün, dolayısıyla toplumun, beslenme gücünün dinamosu ve gelecek nesillerin de gıda güvenliğinin temelini oluşturmasıdır. Zira her bir tohum çeşidi özgün genetik özelliklere sahip olduğu için

ileride ortaya ç,kabilecek tar,m sorunlar,n,n çözümünde anahtar rol oynayabilme potansiyeline sahiptir (akiro lu 2010).

Örne in 1890'darda Java'da ortaya ç,kan eker kam, , mozaik virüsü çok k,sa sürede tüm dünyaya yay,larak eker kam, ,nda verimi çok dramatik oranda dü ürmü tür. ABD'nin Louisiana eyaletindeki 200,000 tonluk eker kam, , üretimi bu virüs yüzünden 1914 y,l,nda 46,000 tona kadar dü mü tür. Tüm dünyadaki eker üretiminin bel kemi ini çökerten bu virüs ile ba etmek ise biri Java di eri ise Güney Hindistan kökenli virüse dirençli iki genetik kaynak sayesinde mümkün olmu tur. Üstelik toplanan genetik kaynaklar do ru bir ekilde muhafaza edildikleri zaman çok uzun y,llar sahip oldu u de eri kaybetmeyecektir (akiro lu 2010).

Ayr,ca genetik kaynaklar,n mevcut zaman diliminde katkı sa lamamas, de ersiz oldu u anlam,na da gelmez. Tar,msal problem ba gösterene dek de ersiz gibi duran genetik kayna ,n gerçek de eri ancak problemi bertaraf edince anla ,l,r. Buna iyi bir örnek, 1920'di y,llarda ABD'nde bir m,s,r tarlas,nda tesadüf eseri fark edilen, yumu ak opak tipteki (o2) bir mutant m,s,r,n, Connecticut Tar,msal Ara t,r,malar stasyonu'nda mercek alt,na al,nmas, ve bu konu üzerinde çal, lmaya ba lanmas,d,r (Vietmeyer 2000). Bu konu ile ilgili ilk bilimsel raporlar 1960'd, y,llarda Thedor Mertz ve Oliver Nelson taraf,ndan sunulan o2 m,s,r tipini olu turan mutasyonu konu edinmi tir (Crow ve Kermicle 2002). Bu mutasyon nedeniyle o2 tip m,s,rda, normal m,s,r'lara göre lisin ve triptofan aminoasitleri 2-3 kat daha fazla sentezlenmektedir (Sofi ve di . 2009). Opak-2 mutasyonunun, bitkinin insan ya am, için vazgeçilmez olan iki aminoasitten oldukça fazla üretti inin bulunmas, üzerine, çocuk beslenmesinde yayg,n olarak m,s,r kullan,lan bölgelerde yüksek lisin/triptofan içeri ine sahip m,s,r'la beslenen çocuklar,n normal m,s,r'la beslenenlere göre daha h,zl, geli im gösterdi i ve hastal,klara yakalanma oran,n,n azald, , rapor edilmis tir (Akuamoja 2002).

Bu örnekten de anla ,laca , üzere genetik kaynaklar,n ekonomik ve stratejik de erini tam olarak ortaya koymak asl,nda mümkün olmamakla birlikte, genetik kaynaklar,n do ru ekilde korunmas,yla uzun y,llar de erlerini kaybetmeyecekleri de aç,kt,r.

Genetik kaynaklar, n önemine dikkati ilk çeken Sovyet Bilim insan, Nikolai Vavilov'dur. Vavilov genetik kaynaklar, n önemini ve tar,ma katk,s,n, çok net bir ekilde öngördü ü için genetik kaynaklar, toplama ve karakterize etme i lemi için Çarlık Rusyas, n Uygulamal, Botanik Bürosu'nu çok ba ar, l, bir ekilde Sovyetler'ın Uygulamal, Botanik ve Tar,msal Bitki Enstitüsü'ne dönü türerek zaman, n ilk ve en geli mi gen bankas, n, kurmu tur (akiro lu 2010).

1.2.2 Bitki Genetik Kaynaklar, n Korunma Yöntemleri

Genetik kaynak olarak koruma alt,na al,nacak olan yabani ve kültür bitkileri üç ana grupta toplanabilir.

- I. Orthodox tip ad, verilen tohumu sahip bitkiler; dü ük ,s, ve nem içeren ortamlarda uzun süre saklanan bitkiler. 620 °C veya daha dü ük ,s,larda ve %5-7 nem içeren ortamlarda uzun süre saklanabilirler.
- II. Rekalsitran tip ad, verilen tohumu sahip bitkiler; nem miktar, dü tü ü zaman canl,l,klar, azalan dolay,s,yla da depolanamayan ve k,sa ömürlü tohumlara sahip bitkiler.
- III. Heterozigot yap,da olan ve tohumla üretilmeyip vejetatif olarak üretilen bitkiler.

Bitki genetik kaynaklar, n korunmas, ise iki ekilde de erlendirilir (Engelmann 1991).

- I. Do al ya amda koruma (*In situ*): Bitkilerin kendi do al ya am,nda korunmas,d,r. Bu yöntemle bitkilerin kendi do al ortamlar,nda evrimlerinin devam, sa lanabilmektedir (Tan 1998).
- II. Do al ya am d, ,nda koruma (*Ex Situ*): Bitkilerin ya ad,klar, ortam d, ,nda korunmas,d,r. Bu yöntemle pek çok bitki türü do al olarak ya amad,klar, yerlerde korunmaktad,r (Tan 1998).

In situ koruma, do al kaynaklar, n korunmas,nda en önemli yoldur. Bununla birlikte do al kaynaklarda türlerin korunmas,; do al ya da insanlarla bula an hastal,klar ve geli melerle (barajlar, maden arama, turizm, kaçak orman arazisi açma

ve yangınlar) savunması alanlar büyük baskı altında. En değerli koruma işlemleri yenilenme döngüsü yüzlerce yıl olabilen uzun yıllara yayılan doğal kaynaklı nedenler nesli tükenmekte olan türlerde populasyon üstünde genetik baskıya neden olur (Li ve di . 2009).

Ex situ koruma, doğadaki çeşitliliğin korunmasında güvenilir bir yedekleme olarak rol oynar. Doğadaki çeşitlilik özellikle insan egemen ekosistemlerde kaybolma tehlikesi altındadır (Li ve di . 2009). Bitki genetik kaynakların uzun süreli korunması söz konusu olduğunda tohum depolama en uygun yöntemdir (Rao 2004). Bu yöntem tohumun düşük nem içeriğini ve düşük sıcaklıklarda saklanması kapsar (Rao 2004). Ancak bazı türlerin tohum olarak saklanması zordur örneğin vegetatif olarak üretilen çeşitler için bu tür bir saklama uygun değildir (Shikhamany 2006). Bununla birlikte rekalsitrant tip tohumu sahip tropik ve subtropik bitkiler hızla canlılıklarını kaybettikleri için konvensiyonel depolama yöntemleri ile depolanmaları mümkün değildir (Rao 2004). Bu nedenle canlı koleksiyonların korunmasında *in vitro* doku kültürü tekniklerinin kullanılması, biyoteknolojik yöntemler önemli katkılar sağlamaktadır (Rao 2004).

1.2.2.1 *In vitro* koruma

In vitro kültür, yapay kültür medyasında bitki gen kaynaklarının (özellikle sürgün ucu, meristem, somatik embriyo ya da embriyonik kalus) steril koşullar altında büyümesini içeren genetik teknikleri kapsar (Paunescu 2009).

Doku kültürü tekniklerinin bazı avantajları bulunmaktadır (Engelmann 1991). Çok yüksek çoğalma oranı, aseptik sistem (fungus, bakteri, virüs ve zararlı böceklerden arı stok), alan ihtiyacının azalması, genetik erozyonda azalma, maliyetlerinde azalma ve gen kaynaklarının uluslararası düzeyinde kolaylıkla doku kültürü tekniklerinin avantajları arasında bulunmaktadır (Engelmann 1991).

Bununla birlikte materyalin büyük miktarda *in vitro* depolanması çeşitli sorunlara da neden olur (Engelmann 1991). Düzenli alt kültür ihtiyacı, depolama süresindeki artış nedeniyle genetik varyasyon riski, tipin gerçekliğini kaybı ve herbir tür için özel protokollerin gerekmesi bu sorunlar arasında sayılabilir (Paunescu

2009). *In vitro* korumada tesbit edilmi baz, yayg,n protokoller vard,r. Bunlar, kültür ba latma, koruma ve o altma ve uzun dönem saklamad,r (Paunescu 2009).

Kültür ba latma:

Bitki genetik kaynaklar,n,n korunmas,nda bitkisel materyal olarak, sürgün ucu, yaprak, iek paras,, olgunla mam, embriyo, hipokotil ya da kotiledeon parçalar, kullan,l,r. Genellikle geç  daha h,zl, büyüyen dokular ya da erken geli me a amas,ndaki dokular daha etkilidir. Ayn, zamanda ba lang, materyalinin kalitesi saklama prosedürünün ba ar,s,n, belirler. Bunun için de ba lang, materyali normal, do ru tipte verici bitki, sa l,kl, ve hastal,klardan ar,nd,r,lm, olmal,d,r (Paunescu 2009; Fay 1992).

Bitki parçalar,, dokuya ba l, e itli sterilizasyon prosedürlerinden aksenik kültür içinde ba lat,l,r. Yayg,n kural, k,r,lgan doku parçalar, (meristem, olgunla mam, embriyo, kotiledonlar ve hipokotiller) sterilizasyon ajanlar,na tohumdan ya da odunla m, organlardan daha maruz kal,r. Ba ar,l, bir sterilizasyon bitki paras, tamamen dekontamine oldu u ve canl, kald, ,nda gerçekle mi olur (Paunescu 2009).

Koruma:

Sterilizasyondan sonraki a amad,r. Bitki paras, bitki büyüme düzenleyicileri, karbonhidratlar, vitaminler, mineral besleyiciler içeren steril kültür medyas, içine koyulur. Bitki büyüme düzenleyicileri, bitki hücresinin geli msel yola ,n,n belirlenmesinde kritik medya içeri idir. Genellikle tan,nan bitki büyüme düzenleyicileri yedi ana ba l,кта toplan,r (Paunescu 2009).

- oksinler; genellikle hücre büyümesi ve farkl,la mas,
- sitokininler; hücre bölünmesi ile ba lant,l,
- gibberellinler; hücre uzamas,n, te vik ve tohum çimlenmesi
- absisik asit; dormansi ile ilgili olarak hücre büyümesinin engellenmesi
- etilen; ya lanmas, ile ba lant,l,

- brassinosteroidler, hücre uzaması ve bölünmesinin uyarılması,
- jasmonatlar; büyümenin engellenmesi, yanal büyüme etkileri ve yaralara yanıt

Çoğaltma ve koruma:

In vitro gen kaynakları, koleksiyonunun güçlendirilmesinde en temel amaçtır. Sürgün uçları, çoğaltılması ve uyarılmasıdır. Medya içeriği özellikle büyüme düzenleyicileri, mineral tuzlar ve ek faktörler canlı bir doku kültürü elde etmek için büyük önem taşımaktadır.

1.2.2.2 *In vitro* Koruma Yöntemleri

In vitro koruma; yavaş büyüme stratejisi kullanılarak orta dönem (bir kaç aydan bir kaç yıl kadar) saklama ve kriyoprezervasyon kullanılarak uzun dönem (teorik olarak sonsuza kadar) saklama tekniklerini içerir (Paunescu 2009).

1-) *Yavaş büyüme*: Doku kültürü koşullarında, türlere bağlı olarak 1-15 yıl arasında, periyodik olarak alt kültür yapılması ile klonal bitki materyalinin korunmasıdır (Rao 2004).

Klasik yavaş büyüme ve saklama teknikleri ya fiziksel çevre koşulları, ya kültür medyası, ya da her ikisinde de değişiklikler içerir. En başlıca ve en yaygın uygulama tekniği sıcaklık azaltılmasıdır. Yüksek yoğunlukta azaltma ya da kültürü karanlıkta bırakma sıcaklık azaltılması ile kombine edilir. Ayrıca kültür medyasında yapılan değişiklikler de büyümeyi sınırlandırabilir (bunlar mineral yoğunluğunun azaltılması ve saklamanın izin vermediği oranda oksijen eliminasyonu olabilir). Osmotik büyüme inhibitörleri (mannitol) ya da hormonal büyüme inhibitörleri (abscisik asit) büyümeyi azaltmada etkili bir yoldur (Engelmann 1997).

Saklama periyodu sonunda, bir sonraki saklama döngüsüne konmadan önce birkaç saat süre tekrar büyüme uyarılarak optimal kültür koşullarında kültürler genellikle taze medyaya transfer edilir (Engelmann 1997).

2-) *Kriyoprezervasyon*: Biyolojik materyalin çok düşük sıcaklıklarda, genellikle sıvı azotta (-196 °C), gen kaynakları, farklı tiplerinin, masrafları ve güvenli bir şekilde saklanması için tek tekniktir (Engelmann 2004). Bu sıcaklıkta hücre bölünmesi ve metabolik süreçler durur. Bitki materyali de iklilik ya da modifikasyon olmadan teorik olarak sonsuza kadar saklanabilir. Ayrıca kültür ortamında bir bakımla kontaminasyon korunarak çok küçük bir hacimde saklanabilir (Engelmann 2004).

1.2.2.3 Kriyoprezervasyon Teorisi

Suyun biyokimyası:

Su, doğanın doğal çözücüsüdür. Buz ve sıvı haldeki suyun davranışları, büyük oranda bipolar kimyası tarafından belirlenir. Pozitif yük taşıyan hidrojen atomları ile negatif yük taşıyan oksijen atomları, suyun bipolar yapısında rol oynar. Tetrahedon geometrinin farklı bölümleri hem negatif hem de pozitif yüklü kesimlerin her ikisini de taşıyabilir. Suyun oksijen atomlarındaki elektron çifti ve iki kutuplu hidrojen atomları, hidrojen bağlarının oluşmasını sağlar.

Moleküller hidrofilik ya da hidrofobiktir. Zarlarda hidrofobik lipidlerin organizasyonu, hücrenin bölümlere ayrılması, yapısını belirler. Su hidrojen bağları nedeniyle güçlü çekim gücüne sahiptir, elektrikli ortamda kalırsak, kalımlara karşı güçlü bir kapasiteye sahiptir. Bitkilerde bu çekim kuvvetleri bütünlüğünü ve vasküler dokularda suyun hareketini destekleyen biyolojik boru hatları vardır. Su elektriksel olarak nötrdür, nedeniyle, akkan halde çözünmüş maddeleri tutar. Suyun ve çözünmüş maddelerin ilişkisi, hücrede bir sistemin kolligatif özellikleri (çözünmüş parçacık sayısı, oranı) ve çözünmüş maddelerin özel konsantrasyonu tanımlanmaktadır.

Bunun aksine, bir sistemin ozmotik özellikleri (ancak çözünene göre) çözücü geçişine izin veren yarı geçirgen bir zar boyunca tanımlanabilir. Osmotik basınç yarı geçirgen bir zar boyunca çözücü akışını önlemek için çözeltiye uygulanması gereken basınçtır. Bu şekilde moleküller konsantrasyonunun dengelenmesi gerekir. Konsantrasyon dengelendiğinde çözelti izotonik olur. Hücrelerin içine neden olan çözeltiler, hipotoniktir ve hücreden, yarı geçirgen zar gibi daha düşük bir iletkenlik

içeri ine sahiptir. Bitkilerde, hipotonik çözeltiler hücre sel i meye neden olan turgor bas,nc,n, olu turur. Bu ekilde sitoplazma geni lemesi, sert hücre duvar,na kar , plazma zar,n,n itilmesi eklinde gerçekleşir. Hayvan hücrelerinin aksine hücre duvar, sayesinde bitki hücresi patlamaz. Bir bitki hücresi, bir hipertonic çözelti içinde yerle tirildi inde ise vakuol su kaybeder plazma membran duvar, uzakla ,r; bu i lem plazmolizdir.

K,sacas, suyun hücre fonksiyonu için gerekli özel fizyo-kimyasal özellikleri vard,r. Suyun yerle iminin farklı durumlar, kriyobiyojik yönlendirmeler için, dondurarak saklama ve depolama stabilitesinde önemli ve merkezi bir rol oynayarak etkiler (Benson 2008a).

Suyun ve buzun termal özellikleri:

Belirli bir maddenin s,cakl, ,, moleküler hareket veya enerjinin ölçüsü kabul edilir. S,v, su içerisindeki H ba lar,, hücre içi ,s, dalgalanmalar,n, ve s,v, ortamda ya ayan canl, organizmalar,n üzerinde s,cakl, ,n etkisini stabilize eder.

S,v, su dinamikdir, di er moleküllerle kendi arayüzü ya da ortaya ç,kan yüzeylerde H ba lar, sürekli k,r,l,r ve yeniden olu ur. Enerjinin büyük miktar,, e er sistem farklı neme maruz kal,rsa (güçlü bir kurutucu ya da hava kurutma gibi) sistemi etkiler; H ba lar, k,r,l,r ve bireysel moleküller buharla ma yoluyla at,l,r. Enerji uyguland, ,nda; s,v, su buhara dönü ür, moleküller onlar,n enerjilerini al,p bo ald, ,nda yüzey s,cakl, ,n, dü ürür.

Buna kar ,l,k s,cakl,k 0 °Cmin alt,na dü tü ünde su H ba lar,n,n k,r,l,mas,na direnir ve kafes benzeri bir simetride moleküller birbirine kilitlenir. Bu, yap,n,n daha s,k, ekilde ba lant,l, parçalar, ile paketin aç,k yüzeyleri aras,nda olu turulur. Bu sudan daha az yo un olan buz formudur. Bu ekliyle buz sucul organizmalar, donmaya kar , koruyan ve suyun s,v, durumunu bir yorgan gibi yal,tan bir rol oynar.

Buz kristalle mesi:

Kriyoprezervasyon protokolleri geli tirilirken kritik nokta buzun kristalle mesinden kaç,nma veya bunun kontrolüdür. Buz kristallerinin olu maya ba lad, , nokta ayn, zamanda ötohumlamaö olarak adland,r,l,r. Bir sistemin yerel

termal özellikleri, hidrojen ve oksijen molekülleri embriyonik buz kristallerinin ba lat, lmas, n, sa lamak ve yeterli H ba lar, n, olu turmak için enerjik oldu unda meydana gelir. 0 °C'de suyun dondu una inan, l, r, bu nadiren böyledir. Örnek yoklu unda, s, f, r, n alt, nda donmak için süper so uyan su, hidrojen ve oksijen moleküllerinin tekrar bir araya gelmesine izin verir. En uygun dü üklükteki süper so uma s, cakl, , ço u biyolojik sistem için buz kristallerinin homejenize oldu u -40 °C civar, ndad, r. Bu s, cakl, kta su molekülleri termodinamik olarak kristal büyümeye olanak sa layan kritik boyutta buz embriyolar, olu turur. Düzenli bir matrix yarat, l, r ve enerji birle menin gizli , s, s, olarak serbest b, rak, l, r ve buz olu ur, , s, üretilir.

Buz kristallenmesinin önemli sonuçlar, vard, r. S, v, su sistemden uzakla t, r, ld, , nda buza dönü ür. Çözünen madde daha yo un hale gelir bu durum buz olu ma s, cakl, , n, dü ürür. Çözünen moleküller gittikçe konsantre hale gelir ve kalan su moleküllerinin kristal formlarla etkile ime girmesi engellenir. Homojen buz formunun üstündeki s, cakl, klarda suyun donma s, cakl, , giderek bask, lan, r ve ötektikö olarak bilinen noktaya gelir (ötektik nokta: kar, , m, olu turan tüm unsurlar bu s, cakl, kta s, v, la m, ak, c, solusyonla e zamanl, kristalle ir. Böylesi e zamanl, kristalle me noktas, na ötektik nokta denir).

Bu a amada tüm sistem kat, la , r ve tüm mevcut su dondurulmu olur ve ba ka de i iklik olmaz. İlk buz kristalle mesi olay, ndan sonra; buz kristalleri, daha fazla su molekülünün birbiri ile karma , k ekilde dizilip, kat, ld, , a lar olu turan kümeler halinde büyüme kapasitesine sahip olurlar. Buz kristalle mesi, fiziksel parçalanmalar ve mekanik yaralanmalara neden olarak hücrenin ozmotik ve kolligatif bütünlü ünü yap, sal olarak etkiler. Hücresel fonksiyonlar, tehdit eden a , r, miktardaki çözünen madde konsantrasyonu kolligatif hasar, n sonucudur.

Kriyoprezerve bitkilerde, kriyo hasar, n, n dinamikleri, buz kristallerinin ba lamas, için, hücre içi ve hücre d, , içeriklerin farklı, l, klar, taraf, ndan yönetilir. Çok h, zl, dondurma s, cakl, klar, haricinde tercihen buz hücre d, , nda olu ur.

Bu senaryoda hücrenin d, , nda donan parça ile içinde donmayan parça aras, nda aç, kl, k yarat, l, r ve su molekülleri ozmatik dengeyi sa lamak için hücre d, , na göçer. Hücreler sürekli küçülmeye maruz kal, r ve kaybedilen suyun oran,,

hücre boyutunun fonksiyonu olarak belirtilir. Bu durum kat, ve rijit hücre duvar,na sahip olan bitki hücreleri ile kar ,la t,r,ld, ,nda hayvan hücreleri için geçerlidir.

Kontrollü so utma h,z,:

Kontrollü so utma iki zararlı, bile eni optimize etmeyi amaçlamaktadır; koligatif çözüm etkisi ve buz olu umu zararlar,. Bunlar so utma oran,n,n dikkatli kontrolü taraf,ndan yönetilir. Donma parametrelerinin son s,n,r, buz kristallenmesi ve koligatif koruyucular,n uygulanmas,d,r. Bu tip protokollerde hücrenin hayatta kalmas,n, belirleyen temel ilke; so utma oran,d,r (Mazur 2004). So utma oran, çok yava ya da çok h,zl, ise hücreler hayatta kalmaz, kriyo hasar,nda ba ar,n,n anahtar, iki kriyo hasar,n, dengelemektir. Kontrol edildi i zaman, hücrelere kademeli so utma uygulan,r. Hücreler aras, buz ilk formdur, aktar,lan suyun yönü (e ilimi) hücre zar, boyunca ve hücre içinden hücre d, ,na do ru olur. Bu, buz olu turmak için mevcut su miktar,n, azaltan çok önemli bir kriyoprotektif etkidir.

Dü ünüldü ünün aksine hücre içi buz kristalle mesini dolayl, olarak azalt,mas, sonucunda hücre d, , buzun canl,l, , koruyucu bir rolü vard,r. Özellikle kompleks çok hücreli dokular için zararlı, olmas,na ra men hücreler; hücre d, , buz ile ya ayabilirler. Hücreler aras, buz hemen hemen her zaman öldürücüdür. E er so utma çok yava ise, hücrenin çözünenleri koligatif hasara neden olan çok yo un hale gelir, ancak bu hesaplanabilir. ki kriyo hasar,n, dengelemenin anahtar, so utma oranlar,n, optimize etmektir. Koligatif hasar, engellemek için do ru miktarda su uzakla t,r,l,r. Buz olu umu engellenmi çok az miktarda su kal,r ve sitoplazma muhtemelen cams,la ,r (Benson 2008a).

Genel olarak so utma oran,n,n kontrol yöntemi, örneklerin ön kültüre al,nd, , veya iklime al, t,r,ld, , bir dizi manipulasyonlar, içerir ve daha sonra kriyo koruma yap,l,r. Genellikle, dimetil sülfoksit (DMSO) temel penetre olan koligatif kriyo koruyucudur ve eker ya da polietilen glikol (PEG) gibi penetre olmayan ozmatik aç,dan aktif katkı, maddeleri ile kombine edilir. Örnekler belirli so utma oran,na maruz kal,r,lar, ös,çramaö ad, verilen bu süreç, egzotermik reaksiyonun ba lad, ,, hücreler aras, buz kristallerinin olu tu u ba lama a amas,d,r. Bu s,çrama homojen buz kristallerinin olu tu u ara ya da uç aktar,m s,cakl, , olan -35 °C ya da ó 40 °C ve alt,ndaki s,cakl,klara kadar devam eder. Farkl, so utma oranlar,ndaki bir ya da daha

fazla s,çrama oranlar, bir protokole dahil edilebilir. Örnekler bu noktada dald,rabilir ya da uç aktar,m s,cakl, ,nda 35-40 dk. bekletilip takiben s,v, azota dald,r,labilir.

Dolay,s, ile bu tip bir protokol ayn, zamanda iki a amal, so utma ya da dondurma olarak adlad,r,labilir. Yava so utma oranlar, da alkol banyolar, (metanol ya da isopropanol) içeren -20 °C ya da ó 80 °Cdeki ta ,y,c, birimler kullan,larak elde edilebilir. Örne in, bir Mr. Frosty ta ,y,c, birimi içinde bulunan izopropanol, dakikada 1 °Cdik bir so utma oran, sa lar. Bunlar geli tirilen baz, ilk tekniklerdir çünkü bu yöntemler bazen geleneksel olarak adland,r,l,rlar. Bununla birlikte bu durum erken vitrifikasyon teknikleri için geçerli bir terimdir ve bu nedenle bundan kaç,n,lmal,d,r.

Vitrifikasyon: cams, a ama

imdiye kadar kriyoprezervasyon suyun kat, ve s,v, fazlar,na dayanarak de erlendirilmi tir. Kristalizasyon olmadan s,v,lar,n kat,la mas,, vitrifikasyon süreciyle kriyoprezerve bitkiler için de olas,d,r. Sistem olarak amorf olan cams, yap,n,n organize olmaya ihtiyac, vard,r ama bu yap, kat,n,n fiziksel ve mekaniksel özelliklerine sahiptir (Taylor ve di . 2004). Biyolojik sistemlerdeki suyun vitrifikasyonu hücredeki çözücüler konsantre hale dönü tükçe ortaya ç,kan, artm, hücre viskozitesine ba l,d,r. Artan viskozite su moleküllerinin buz olu turmak üzere tekrar bir araya gelmesini engeller. Vitrikiye durumu yar, kararl, bir durumdur bunun anlam,; bu durumun s,v, ya da vitrikiye olmayan buz formunu olu turmak için nispeten kolayca geri dönebilir olmas,d,r. Vitrikiye sistemleri moleküler hareketlilikte de i imlerin oldu u, tekrar ,s,tma ve buz formunu olu turmak amac,yla su moleküllerinin yeniden düzenlenmesine olanak sa layacak enerjinin yeterli oldu u s,rada özellikle karars,zd,r. Vitrifikasyon çe itli yollarla elde edilebilir ama genellikle sonuçta kritik bir viskozite için çözünen konsantrasyonunu artt,rma vard,r. S,cakl, a ba l, cams,l,k için, cams, geçi s,cakl, , (Tg) olarak adland,r,lan a aman,n olu tu u noktad,r, bu noktada moleküler hareket neredeyse sona erer ve s,v, kat, bir cams, haline gelir. Buzsuz kriyoprezervasyon hayvan hücrelerinde (Fahy ve di . 1986) öncü oldu ve Sakai (2004) taraf,ndan bitkilere uyguland,. Bu kriyokoruyucu sistem tamamen hücre içi ve d, ,nda buz olu umunu ortadan kald,r,r. En uygun so utma oran,n, yaklamay, ba arman,n zor oldu u heterojen dokularda vitrifikasyon, kriyokoruyucu kompleks olarak avantajl, bir ekilde kullan,l,r. Bitkisel

materyal, özel büyüme ko ullar, ile önceden haz,rılanm, olabilir. Kriyoprezervasyon öncesinde kriyokoruyucu kimyasallarla önkültüre al,nm, ve s,v, azota dald,r,lmadan önce vitrifikasyon solüsyonu ile koruma alt,na al,nm, olabilir. Alternatif olarak bitki örnekleri s,v, azota dald,r,lmadan önce, eker çözeltisi ile ozmatikkoruyucu olan ve dü ük nem içeri i için kurutulan bir alginat çözeltisi ile tamamen kaplan,r.

Su durumunda de i im ve karars,zl,k:

Diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) kullan,larak yap,lan termal analiz, kriyoprezervasyon protokolü geli tirilmesine yard,mc, olmak için, temel kriyobiyojide kullan,l,r. Is, ak, , ve su durum geçi leri, zaman ve s,cakl, ,n bir fonksiyonu olarak örnekler DSC de izlenir ve örneklerdeki de i iklikler so utma ve ,s,tma esnas,nda saptanabilir. Bu yakla ,m (Benson ve di . 2005) ve yüksek rekalsitrant bitkiler için protokollerin geli tirilmesi, özellikle cams, durumun stabilize edilmesi ve kriyoprotektanlar,n etkinli ini de erlendirmek için kullan,l,r.

Kriyomikroskopisi de kriyoprotektanlar,n varl, ,nda, su durumu ile gerçek zamanl, geçi lerin ara t,r,lmas,nda bir araç,r (Fleck ve di . 2006). Suyun farklı durumlardaki geçi inin davran, , ve sa kal,m üzerine etkisi (göreceli amorf, s,v, ve kat, fazlar,n kararl,l,klar, ve biyolojik dokularda termo-mekanik streslere neden onlar,n potansiyeli aç,s,ndan) Taylor ve arkadaş lar, (2004) taraf,ndan de erlendirildi. Cams,la ma durumunun genellikle daha karars,z oldu u dü ünülmektedir ve karars,z özellikleri genellikle tohum gibi daha büyük bir organ ve dokulara özellikle zararlı olan ve k,r,lma, çatlama olarak görülmektedir.

Cams,la ma durumu yeniden ,s,tma s,ras,nda zarars,z olabilir ancak donukla t,rma ve buz kristal olu umuna neden olabilir. Buz olu tu u zaman saydam camlar opak hale gelebilir, bu durum kryoviallerde gözlenmektedir. Birçok vitrifikasyon sistemi için, örnekler geçi me s,cakl, ,na geldi i zaman buz kristalle mesi olas,l, ,n, önlemek için, tekrar ,s,t,lma h,z, oranlar, belirlenebilir. Tekrar ,s,t,lma çok h,zl, ise stres çatlaklar, ve k,r,klar, olu abilir bu nedenle uygulama dikkatli yap,lmal,d,r. ki a ama gerekli olabilir, ilk a ama stres k,r,klar, olmadan cam,n gev emesine izin veren k,sa ve yava olan a amad,r. kinci a ama ise, bir buz faz,na do ru geçi olmadan camdan s,v,ya h,zl, geçi i garanti almak için takip edilen h,zl, ,s,tma a amas,d,r. Bu a amalar,n deneme yan,lma yöntemi ile en

uygun hale getirilmesi her bir biyolojik sistem ve onun kriyo koruyucu rejimi için gerekli olabilir. Yaygın s, v, -buz-s, v, geçi leri tamamen vitrifiye olmu sistemlere karşı, la t, r, ld, ,nda kontrollü so utma oran, protokolleri farklı, biyolojik sonuçlara sahiptir. Bu durum manuel ya da otomatik olarak, ötohumlamaö olarak adlandırılan buz kristallerinin olu maya ba lad, , an taraf,ndan s, v, dan buza ba lang, ç geçi ini sağlamak için önemlidir. Bu kristale me -40 °Cde spontan olarak ortaya ç, kan kristalle menin sonuçlar, n, ve örne in ölümü ile örne in süper so umas, n, önler. Hücreler aras, buzun ilk olu turuldu u nokt, n kontrolü, donma dehidratasyonu ve koligatif kriyo koruma için anahtar olaylar, n s, ras, n, n kontrolü sonucunda olur. Yeniden , s, tma ayn, zamanda buz stabilitesini etkileyebilir ve bu kullanılan kriyokoruyucu ilave maddelere, so utma oranlar, na ve doku tipine ba l, d, r. Genel olarak, yava so utmay, takip eden h, zl, tekrar , s, tmada hayatta kal, m oran, daha yüksektir (su banyosunda 40 °C ó 45 °Cde). Donmu sistem çok yava olarak tekrar , s, t, l, rsa, çok küçük ve zarars, z buz kristalleri, daha zararlı, kristaller olarak içinde büyüyebilir. Bu buz s, v, geçi leri genle me ve büzülme ekinde potansiyel olarak hasar verebilir, homojen olmayan hücreler, dokular ve organlar aras, nda bu durum olu abilir. Bunlar termal, koligatif ve ozmatik stresin kombinasyonlar, taraf,ndan te vik edilmi olabilir (Taylor ve di . 2004; Benson 2008a).

Kriyo korucular:

İl, man iklime ve so u a uyum sağlamak, bitkiler do al ortamlar, nda donmaya dayanacak ekilde donat, lm, t, r ve onlar, n davran, lar, n, de erlendirme mant, ksal bir ba lang, ç noktas, sa lar.

Do al donmaya tolerans, n biyofiziksel yönleri:

-40 °C biyolojik sistemlerde süper so uman, n gerçekleşti i s, cakl, kt, r, bu s, cakl, kta buz kristalle mesi olmaz ve homojen bir buz yap, s, olu ur. Bu da do al olarak s, f, r, n alt, ndaki s, cakl, klarda donmaya karşı, bitkiler taraf,ndan kullanılan bir kaç, nma stratejisidir. Süper so uma, özellikle bitki örtüsünün daha fazla canlı, kalamad, , da lar, n tepe nokt, nda donmaya toleranslı, bitkiler için önemli bir adaptasyondur. Bu adaptasyon uyuyan dokular, n canlı, l, , n, sa lar. So uk sertle mesi ya da so u a uyum olarak adlandır, lan durumda genellikle donma s, caklar, nda plazmoliz yaralanmalar, n, azaltmak ya da ozmolariteyi artt, rmak için hücreler aras,

çözelti sentezlenir. Yalnızca -15 °C'de donmadan kaçınmaya izin veren bu mekanizmalara Meryman ve Williams (1985) tarafından dikkat çekildi. Daha sonra bu durumun neden ve nasıl olduğu keşfedildi, daha düşük kriyojenik sıcaklıklardaki bitkilerin geri kazanılması ile ilgili yapılan uygulamaların açıklanabilmesi için gerekli olduğu Sakai (1956, 1960) tarafından gösterilmiştir. Hirsh ve arkadaşları, (1985) ise *Populus balsamifera*'nın (Balsam Kava) bir çeşidinde yaptıkları freeze/ fracture elektron mikroskobu çalışmaları ile öncülük etmişlerdir. Onlar soğuk iklim almamış odunsu bitkilerin azota dirençli olduklarını, ilk kez tanımlayarak açıklamışlardır. Onların bulguları hücreler arasındaki cam form hipotezlerini desteklemiştir. Üç farklı cam geçişlerinin altındaki sıcaklıklarda ve doğal olarak oluşturan vitrifikasyonla yüksek seviyede dehidratasyon olmadıkça, sertleşmiş dokuların nispeten sabit kaldıkları, termal analiz kullanılarak tespit edilmiştir (Hirsh 1987).

Yapay kriyo koruma:

Donmaya karşı kuş sperm hücrelerinde gliserolün Polge ve arkadaşları, (1949) tarafından keşfedilen kriyo koruma döneminin başarısı esasen bağımsız olarak neden olan kilometre taşlarıdır. Bu atılgandan sonra, Koligatif teori açısından kriyo koruyucuların etkisi (Lovelock 1953; Meryman ve Williams 1980, 1985) ile ilgili çalışmaların, kriyobiyolojik araştırmalar yapıldı. Lovelock'ın anahtar çalışması; uygulanan hücreler arasındaki tuzun kritik konsantrasyonu artırılması, gliserol uygulaması, başarımlı oldu. Burada ya da kritik tuz konsantrasyonu elde etmek için gerekli donma sıcaklığında, kritik hücre hasarı görülür. Bu durum gliserolün hücreye penetrasyonu ve koligatif bazda herhangi bir sıcaklıkta oluşan buz miktarının azaltılması, bu şekilde yorumlanabilir. Diğer bir deyişle, osmoz nedeniyle kaybedilen su ve hücredeki tuz konsantrasyonundaki azalma antifriz olarak rol oynar. Donmanın olumsuz etkilerinin önlenmesinin ek yararları ile minimum öldürücü hücre hacmine ulaşılmasına karşı, hücre korunur. Bir çözeltinin koligatif özelliği, çözücünün özdeğeri ile; sadece çözünen parçacıkların sayısı ve çözeltideki çözücü oranına bağlıdır.

Koligatif kriyo koruma teorisi iki temel özelliğe sahiptir. Kriyo koruyucular hücreye penetrasyon olabilmelidir yoksa osmotik su kaybına ve yaralanmalara neden olur. Kriyo koruyucuların yararlı olabilmesi için, gerekli olan konsantrasyonlarda hücre için non-toksik olmalıdır.

Penetre kriyo koruyucular hücrenin ozmolaritesine katkı yaparlar. Dondurma işlemi başlatılmadan önce gliserol gibi koligatif katkı maddeleri hücrenin başlangıç ozmolaritesini artırır. Osmotik dengeyi yakalamak için, donmayacak su düzeyi daha azdır ve hücrede oluşan dehidrasyonun uzaması, daha iyi tolere edilir. (Meryman ve Williams 1985). Donma noktasına katkı maddeleri baskılayarak, daha düşük sıcaklıklarda oluşmasını neden olur. Bitki kriyoprezervasyonunda kullanılan yaygın kriyo koruyucular gliserol, DMSO, metanol (bazı etanoller) ve daha küçük moleküler ağırlığa sahip glikollerdir. Soğutma hızının kontrol etmenin amacı, çok az (buz hasarı ile sonuçlanan) ve çok fazla (koligatif hasarı ile sonuçlanan) arasındaki hücre dehidratasyonu optimize etmektir. Koligatif ajanlar, az ve yetersiz dehidrasyonun neden olduğu miktarı azaltır. Eğer gliserol buna örnek verilirse, hücre hasarı sadece yüksek ozmolarite eklenirken ortaya çıkar. Hücreden dışarıya çıkan suya yeterli zaman sağlamak için yeterince yavaş bir soğutma oranı uygulamak gereklidir. Operatöre bağlı olarak hücreler arasında tohumlanması önemlidir ve bir amaçla değil im yaratır. Yavaş soğutma amaçlarının sonunda programda bir ötürme aşaması, azot baskılamadan önce suyun akmasını tamamlanmasına izin verir. Koligatif ajanlar aynı zamanda hücrenin viskozitesini de artırır ve sitoplazmadan suyun akmasını azaltır. Hücre viskozitesi, buz kristallenmesini (Meryman ve Williams 1980, 1985) inhibe edecek şekilde bir seviyeye yükseltilebilir. Bu nedenle, hücrede donma olmamasına rağmen, hücreler hücre içi buz olmadan ve "camsı durumda" korunur. Tamamen buzdan arındırılmamış kriyojenik depolama bitki kriyoprezervasyonu için en yeni yaklaşımdır (Sakai 2004; Benson 2004). Kriyo koruyucu vitrifikasyon stratejilerinin gelişimi için anahtar; buz oluşumunun durdurulması ve kriyojenik sıcaklık etkisinde suyun camsılaşma noktasına kadar hücre viskozitesini arttırmaktır. Hücre viskozitesinin artırılması, iki ana yaklaşım kullanılarak elde edilir: çok yüksek konsantrasyonlarda kriyo koruyucu katkı eklenmesi ve osmotik dehidrasyon ve buharlaştırma yoluyla suyun uzaklaştırılması.

Uygulamada, birçok bitki vitrifikasyon protokolünde her iki yaklaşım da birleştirilmiştir.

Katkı maddelerinin kullanılmayla ilişkili vitrifikasyonda, kriyo koruyucular toksisite, osmotik hasar (penetre olmayan içerikler) ve vitrifikasyonda geriye dönmelere yol açabilir. Dehidrasyon işlemlerinin uygulandığı durumda ise, osmotik

dehidrasyon ve/veya buharla t,rma yoluyla (hava kurutma ya da silika jel gibi kurutucu ajanlarla) suyun uzakla t,r,lmaz, sözkonusudur ve bu durumda da kurutmaya kar , duyarlı,k ek bir sorun olur. Farklı, katkı, maddelerinin bir kar, ,m,n,n (Fahy ve di . 1986) kullan,lmaz, da avantajlı,d,r. Bu, tek bir katkı, maddesinin toksisitesini azalt,r, a ,r, buharla t,rma yoluyla kurutman,n etkilerini s,n,rlend,r,r ve olu an cams, yap,n,n korunmas,na yardım eder. Bu penetre olan ve olmayan kriyo korucular,n kullan,ld, , durumlarda tavsiye edilir (Fahy ve di . 1984). Bitkilere uygulanan ço u vitrifikasyon çözeltisi, penetre olan ya da olmayan kriyo koruyucular,n kar, ,m,n, içerir. So utma oran, koligatif kriyo koruman,n ba ar,s, için kritiktir. Bu ayn, zamanda yeniden ,s,tma ve vitirfikasyon ba ar,r,s,n,n anahtar, olan cams,l, ,n sabitlenmesi için de kritiktir (Fahy 1987). Cams,l, ,n sabitlenmesi, özellikle, tüm sistem içerisinde su potansiyeli ile ilgili olarak, ba lang,çta olu an cams,l, a dayalı, olabilir. Bitkiler söz konusu oldu unda, buharla ma yoluyla kurutmada çok dü ük su içeri inde vitrifiye olan hücrelerde bu durum beklenebilir. Bu süreçte hücre, tekrar ,s,tmada buzun büyümesi ve vitrifikasyonun bozulmas,, kristalle meye kat,lmak için daha az miktarda uygun su moleküne sahip olacaktır,r. Tersine, yeniden ,s,tmada daha az sabit cams, yap,lar olu turabilen penetre olan ya da olmayan kriyo koruyucular,n kombinasyonu kullan,larak vitrifiye edilirler. Dehidrasyonda cams,l, ,n sabitlenmesi için yap,lan kar ,la t,r,mal, termal analiz çal, malar,, kurutulmu aljinat boncuklar, ve bitki vitrifikasyon çözeltisi 2 (Plant Vitrification Solution) (PVS2) için baz, kan,tlar sa lar (Benson ve di . 1996). Aljinat ile yap,lan kapsülleme dehidrasyonu ile vitrifikasyonda, ortam s,caklı, ,nda gerçeikle en pasif yeniden ,s,tma ile cams,la ma sabit olarak sürdürülür. Vitrifikasyon solüsyonunda termal ve ozmotik stabilitenin sa lanmas, için; katkı, maddelerinin, kriyo koruyucular,n uzakla t,r,lmaz,n,n ve h,zl, yeniden ,s,tman,n s,k, bir kontrolü gereklidir (Benson 2008a).

Kriyo korumada yeni ve geriye dönük anlay, lar:

Özellikle korunmas, zor bitkilerin, dondurarak saklanması, için fiziksel ve biyolojik bilginin entegrasyonu önemlidir. Mevcut kriyo koruyucu teorisinin geni letilmesi ve geli tirilmesi için temel ara t,r,malar,n say,s,nda art, söz konusudur. Polioller ve ekerler (özellikle sukroz ve trehaloz) di er dondurarak saklama koruyucular, ile kombinasyon halinde uyguland, ,nda, sulu çözeltilerin

cams, yap,y, olu turucu e ilimini artt,r,rlar (Fuller 2004). ekerler, su ile H ba , olu turmak ve hücre vizkozitesinin yükselmesini sa lamak gibi birçok avantaja sahiptir. Daha sonra Turner ve arkada lar, (2001) kendi hidroksil gruplar,n,n stereokimyasal düzenlemesine ili kin olarak farklı polialkoleri ve ekerleri kar ,la t,rarak, elde edilenlerin dondurarak saklamada etkili oldu una dair bir alternatif bir teori ara t,rd,. Bu çal, mada, gliserolün çok etkili oldu u sonucu elde edilmi tir. Kriyo koruyucular,n zehirlili i üzerine Fahy ve arkada lar,n,n (2004) memeli hücrelerinde yapt,klar, çal, malar ise vitrifikasyon çözeltilerine dayal, bozulmalarda belirleyici rolün hücre içinde kalan su miktar,nda oldu unu göstermi tir. Bu bilgi bitki kriyo biyologlar, için oldukça önemli olmu tur. Bu sonuca göre, uygun so utma oran,n,n yakalanmas, için su-su etkile iminin en aza indirilmesi gerekir. Ayr,ca buz kristalle mesini engellemek için vitrifikasyon çözeltilerinin zehirlilik derecelerini de dikkate almak gerekir. Hücresel bile enler ile kriyokoyucular aras,nda suyun kullan,m,na yönelik olarak gerçekle ecek rekabet hücresel hasar,n belirlenmesinde etkili olacakt,r. Gelecekte kontrollü so utma oranlar, ve vitrifikasyon protokolleri ile ilgili yap,lacak çal, malar bu ekildeki temel ara t,rmlar üzerine geli ecektir.

Bitkilerde kriyo koruma çal, malar,nda bitkilerin kendi özellikleri dikkate al,nmal,d,r. Bu konuda Tao ve Li (1986), hayvan hücreleri ile kar ,la t,r,ld, ,nda bitki hücrelerinde s,kl,kla kullan,lan kriyo koruyucular, ve bunlar,n hücrelere penetere olabilme yeteneklerini s,n,fland,r,m, t,r;

- Hücre duvar,n içine penetre olamayacak yüksek molekül a ,rl,kl, polimerler (PEG₆₀₀₀, PVP (poli[N-vinil-2]pirolidon), polisakaritler, proteinler.
- Yaln,zca hücre duvar,na penetre olabilecek oligosakaritler, manitol amino asit (proline) ve dü ük molekül a ,rl,kl, polimerler PEG₁₀₀₀
- Hücre duvar, ve zar,ndan penetre olabilen DMSO ve gliserol

Tao ve Li (1986), her bir kriyo koruyucu s,n,fland,r,mas,n,n farklı fonksiyonlara sahip oldu unu ve en iyi korumay, sa lamak için, dondurarak saklama koruyucular,n,n, bitkilerde kombinasyon halinde kullan,lmas, gerekti ini önermektedir. Penetre kriyo koruyucular hücre duvar, ile hücre zar, aras,ndaki adezyonu gev eterek geçici plazmolize neden olurlar. Kriyo koruyucular, buz

kristallerinin oluşmasından önce yapıyı, yoğun hale getirir ve buzun büyüme oranını, ve hızını, engeller, hücreler arasında boşluk oluştuğunda mekanik hasara karşı, yapıyı, korur. Bitkilerde camsı yapıların oluşmasını sağlamak içinse iki yaklaşım söz konusudur (Sakai 2004). Bunlar; aljinat kapsülleme ile dehidrasyon ve PVS gibi katkı maddelerinin kullanılmasıdır. Sakai (2004) geliştirdiği PVS2 çözeltisinin iki kriyo koruyucu mekanizmaya sahip olduğunu öne sürerler. Bunlardan birincisi, PVS2 hücre sel suyun yerine geçmesi ve ikincisi de hücrede kalan suyun donma davranışını, dengelemesidir. Volk ve Walters (2006) da PVS2 içine eklenen bileşenlerin (örneğin DMSO) penetrasyonunun, PVS2'nin kriyo korumalarını sağlayan mekanizma olduğu teorisini ortaya koydu. PVS2'nin penetre olan bileşenleri hücredeki suyun yerine geçer ve hücre dehidrasyonu nedeniyle hücrede meydana gelecek ve hücreye zarar verecek hücre büzülmesini engeller (Volk ve Walters 2006). PVS2'nin penetre olmayan bileşenleri ise hücrenin osmotik olarak aktifliğini düzenler. Daha sonra sıcaklığın düşürülmesini takiben su moleküllerinin moleküler hareketi kısıtlanarak buz kristallerinin oluşmasını engellenir.

Kriyo koruyucular giderek artan bir şekilde çeşitli vitrifikasyon yöntemlerinin; koligatif, biyofizik ve moleküler özelliklerini birleştirilerek kriyo koruyucular kullanılırlar. Bu durum kriyoprezerve edilen türlerin çeşitlenmesiyle sonuçlanmıştır. Son yapılan çalışmalar göstermektedir ki; bitki kriyo koruyucularının davranışlarını teorik olarak anlamak, onların rolünün anlaşılması açısından önemlidir. Ayrıca farklı kriyo koruyucular kullanılması, saklanan bitkilerin potansiyeli ve istikrar açısından da önemlidir.

1.2.2.4 Kriyoprezervasyon teknikleri

Ortodoks tohumlar ya da uyku halindeki tomurcuklar gibi bazı materyaller, doğal dehidratasyon süreci gösterirler ve herhangi bir ön işleme gerek olmadan kriyoprezerve olabilir (Engelmann 2004). Kriyoprezervasyonda kullanılan çoğu deneysel sistem yüksek miktarda hücre sel serbest su içerir ve çoğu donmaya karşı dayanıklı olmadıkça, donmanın yarattığı hasara karşı, duyarlıdır (Engelmann 2004). Bu nedenle hücrelerin, hücre içindeki suyun kristalleşmesinden kaynaklanan hasara karşı, korunması için yapay dehidratasyon uygulanması gerekir

(Mazur 1984). Bu nedenle bitkilerde klasik ve yeni kriyoprezervasyon teknikleri olmak üzere farklı, fiziksel yöntemler kullanılır.

Klasik kriyoprezervasyon teknikleri:

Klasik kriyoprezervasyon teknikleri; tanımlanmış, bir ön-dondurma sıcaklığına kadar yavaş soğutulduktan sonra, hızlı bir şekilde sıvı azota daldırılma şeklinde uygulanır. Yavaş soğutma sırasında sıcaklığına düşürülmesi ile hücreler ve dış ortam arasında süper soğuk olur ve bu durumu ortamdaki buz oluşumları izler (Mazur 1984). Hücre zarı fiziksel bir bariyer rolü oynar ve hücre içi buz oluşumu önlenir ve hücreler donmaz, ancak aşırı soğutulmuş kalır. Aşırı soğutulmuş hücrelerde dondurulmuş bölmenin hızlı buharlaşmasıyla fazla olur ve hücrelerde oluşan buzdaki suyun kaybı ile hücreler dengeye ulaşır. Uygun koşullar altında, hücreden su uzaklaştırıldıktan sonra çoğu hücre içi ya da tüm hücre içi dondurulabilir ve bu sayede zararlı hücre içi buz oluşumunu önlenerek örnekler sıvı azota daldırılabilir (Engelmann 2004).

Klasik dondurma işlemleri aşağıdaki adımları içermektedir:

- örneklerin ön büyütmesi,
- kriyo koruma,
- yavaş soğutma (dakikada 0.5-2.0 °C) Belirli bir ön-dondurma sıcaklığına kadar yaklaşık 40 °C'ye kadar.
- örnekleri sıvı azota hızlı daldırılma
- depolama,
- hızlı çözülmesi,
- yeniden canlandırılma şeklindedir.

Klasik teknikler genellikle karmaşık ve pahalı programlanabilir dondurucuların kullanılması gerektirir (Kantha ve Engelmann 1994; Engelmann 1997)

Yeni kriyoprezervasyon teknikleri:

Vitrifikasyona dayalı yöntemlerdir. Hücre dondurulmadan önce örnekler, donmaya karşı koruyucu ortama koyulur ve / veya havada kurumaya maruz bırakılır ve daha sonra dehidrasyon gerçekleştirilir. Bunu hızlı soğutma izler. Bunun bir

sonucu olarak, hücre içi buz oluşumunu etkileyen tüm engelleyici faktörlerden kaçınılmalıdır.

Vitrifikasyona dayalı yöntemler klasik dondurma teknikleri karşılığında pratik avantajlar sunar. Örneğin, çok hızlı dondurma. Çok hızlı dondurma, donmanın uyarılması, dehidrasyon koşulları, altında her birinin eşit olduğu, çeşitli hücre tiplerini içeren kompleks organ yapıları, (sürgün ucu ve embriyo gibi) için daha uygundur. Sistemde buz oluşumunu engelleyerek, klasik kriyoprezervasyon tekniklerine göre ilerlevsel olarak (kontrollü dondurucu kullanımı, gerektirmeyi için) daha az karmaşıktır. Vitrifikasyona dayalı yöntemler geniş uygulanabilirliği nedeniyle daha büyük bir potansiyele sahiptir ve farklı hücre tipleri için yalnızca küçük değişiklikler gerekir (Engelmann 1997). Tüm bu yeni protokollere ortak bir özelliği sağlamak için önemli bir adım klasik protokollerde olduğu gibi dehidrasyon aşaması, dehidratasyon, dondurma aşaması, olmasıdır.

Yeni kriyoprezervasyon tekniklerinde hayatta kalmanın sağlanabilmesi için ortak ve önemli bir amaç klasik protokollerde olduğu gibi dondurma aşaması, dehidratasyon aşamasıdır (Engelmann 2004).

Vitrifikasyona dayalı yedi farklı yöntem belirlenmiştir.

- Kapsülleme ve dehidrasyon
- Vitrifikasyon (Camsızlaştırma)
- Kapsülleme ve vitrifikasyon
- Dehidrasyon
- Ön büyütme
- Ön büyütme ve dehidrasyon
- Damlacık (Droplet) dondurma

Kapsülleme ve dehidrasyon; kapsülleme-dehidrasyon işlemi yapay tohum üretimi için geliştirilen teknolojiye dayanmaktadır. Örnekler aljinat taneleri içinde kapsülendir, bir ile yedi gün arasında sükröz ile zenginleştirilmiş, s, v, medya içinde ön büyütme yapılır, laminar hava akımı, kabininde hava ile ya da silika jel ile su içeriğinin yaklaşık %20'sini kaybedene kadar kurutulur ve hızlı dondurulur (Dereuddre ve diğeri . 1991). Hayatta kalma oranı, yüksektir, kallus oluşumu olmadan

kriyoprezervasyona u ram, örneklerin büyümesi h,zl, ve direktir. Bu teknik ,l,man ve tropikal kökenli çok say,da türün tepe noktas,na ayn, zamanda çe itli türlerin somatik embriyolar,na ve hücre süspansiyonlar,na uygulanm, t,r (Engelmann 1997, 2000).

Vitrifikasyon; bu uygulama çe itli say,da türün sürgün uçlar,, hücre süspansiyonlar,, embriyonik dokular,, somatik embriyolar, için geli tirilmi tir (Sakai ve di . 2000, 2002). Örnekler, kriyo koruyucu madde ile zenginle tirilmi ortamda önkültüre al,n,r,lar. 2 M gliserol ve 0.4 M sükroz içeren yükleme solüsyonuna (Matsumoto ve di . 1994) tabi tutulurlar. Daha sonra yakla ,k 7.8 Mø,k gliserol tabanlı, PVS2 (Sakai ve di . 1990) ile haz,r,lanan çok yo un bir vitrifikasyon çözeltisi ile dehidre edilirler. Sonras,nda örnekler h,zla dondurulur, çözdürülür ve yeniden kazan,l,r.

Kapsülleme ve Vitrifikasyon; aljinat taneleri içinde kapsüllenen örnekler vitrifikasyonla dondurma i lemine tabi tutulur. Kapsülleme ve dehidrasyon yöntemi ile vitrifikasyon yönteminin bir kombinasyonudur (Engelmann 2004).

Dehidrasyon; bu yöntem özellikle tohumdan ç,kar,lan embriyonik akses ve zigotik embriyolarda uygulan,r. Ara türlere ve rekalsitran tip tohuma çok say,da türün embriyolar,na uygulanm, t,r (Engelmann 1997, 2000). Örne in dehidrasyonu sonras,nda s,v, azot içine h,zla dald,r,ld, , basit bir yöntemdir. Kurutma genellikle laminar hava ak,m, kabininde steril s,k, t,r,lm, hava ya da bir silika jel kullan,larak gerçeikle tirilir (Engelmann 2004).

Ön Büyütme; örneklerin kriyo korucular varl, ,nda kültüre edilmesi ve s,v, azota dald,r,larak, h,zla dondurulmas, ile olu ur. Bu yöntem özellikle Musa bitkisi için geli tirilmi tir (Panis ve di . 2002).

Ön Büyütme ve Dehidrasyon; örnekler kriyo koruyucular,n varl, ,nda yeti tirilir ve laminar hava ak,m, kabininde ya da silika jel kullan,larak kurutulur ve h,zla dondurulur. Bu yöntem özellikle ku konmaz,n sap bölümleri ba ta olmak üzere, palmiye ya , poli embriyonik kültürleri ve hindistan cevizi zigotik embriyolar, için uygulanm, t,r (Assy-Bah ve Engelmann 1992; Dumet ve di . 1993; Uragami ve di . 1990).

Damlac,k (Droplet) Dondurma; patates (Scha'fer Menuhr 1996), ku konmaz (Mix-Wagner ve di . 2000) ve elma (Zhao ve di . 1999) sürgün uçlar,na uygulanm, bir yöntemdir. Sürgün uçlar, s,v, kriyo korucu medya ile ön i leme tabi tutulur, daha sonra kriyo koruyuculu damlac,klar halinde bir alüminyum folya üzerine al,n,rlar ve dondurulurlar. Dondurma i leminde elmalar yava , patatesler h,zl, dondurulur.

1.2.2.5 Dondurulmu gen kaynaklar,n,n yeniden kazan,lmas,

S,v, azotta uzun süre depolanan ya da kriyo tüplerde ta ,nan örneklerin yeniden kazan,lmas, için çözdürülmesi ve uygun besi ortamlar,nda yeti tirilmesi gerekir. H,zl, bir ekilde çözdürme tekrar kristalle meyi önlemek için önemlidir (Plessis ve di . 1991, 1993). Birçok türde sürgün uçlar, kriyoprezervasyon sonras,nda kallus olu umu gerçekte meden geri kazan,l,r. Klasik yöntemlerin aksine yeni kriyoprezervasyon tekniklerinde hücre bütünlü ü daha iyi korunmu olur (Engelmann 1997). Organize büyümeyi artt,rmak için çözdürme sonras, kültür ko ullar,, uygun büyüme ortam,n,n eçimi (bitki büyüme düzenleyicileri ve medyan,n tuz içeri i) önemlidir (Withers ve di . 1988). Bu ekilde hayatta kalma oran,n,n %40tan fazla oldu u görülmü tür (Reed 2001).

2. YÖNTEM

2.1 Bitki Materyali

12 adet ticari çeşit ve iki anaç olarak çubuk halinde T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Manisa Bölgesel Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden elde edilmiştir. Çubuk halinde Pamukkale Üniversitesi Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (PAÜ B YOM) getirilen bitkiler merkezin serasında köklendirilmiştir. Köklendirilen materyal *in vitro* da steril bitki üretimi için sürgün ucu donörü olarak kullanılmıştır (Tablo 2.1 ve Tablo 2.2).

Tablo 2.1: PAÜ B YOM serasında büyütülmüş 12 ticari çeşidin özellikleri

sim	Tane rengi	Çekirdek özelliği	Çeşit özelliği
Merlot	Siyah	Çekirdekli	araplık
Çal Karas,	Siyah	Çekirdekli	araplık
Cabernet Sauvignon	Siyah	Çekirdekli	araplık
Syrah	Siyah	Çekirdekli	araplık
Ali Cante Bouschet	Siyah	Çekirdekli	araplık
Bornova Misketi	Beyaz	Çekirdekli	araplık
Sultani Çekirdeksiz	Beyaz	Çekirdeksiz	Sofralık
Trakya İkeren	Siyah	Çekirdekli	Sofralık
Superior Seedless	Beyaz	Çekirdeksiz	Sofralık
Yalova ncisi	Beyaz	Çekirdekli	Sofralık
Crimson Seedless	Kırmızı,	Çekirdeksiz	Sofralık
Red Globe	Kırmızı,	Çekirdekli	Sofralık

Tablo 2.2: PAÜ B YOM serasında büyütülmüş 2 anaçın özellikleri

ANAÇLAR	DRENÇLİLİK DURUMU		
	Floksera	Nematod	Kuraklık
1103 P	Dirençli	Dirençli	Duyarlı,
5 BB	Dirençli	Duyarlı,	Kısmen Dirençli

2.2 Bitkisel Materyalin Köklendirilmesi

Çubuk halindeki bitki materyaller 40 saniye boyunca 1 mg/L IBA çözeltisine daldırılır, (ekil 2.1A) ve köklenmeleri için kum dolu tenekelere dikilir (ekil 2.1B). Köklenen bitkisel materyal (ekil 2.1C) 12 litrelik saksılara aktarılır, tam kontrollü PAÜ B YOM serasında büyüme bırakılır (ekil 2.1D).



ekil 2.1: Asmada köklendirme amaçları. A) Köklendirme amacıyla asma çubukları, 1 mg/L IBA çözeltisine daldırılır, B-C) Köklendirilmiş asma çubukları, D) PAÜ B YOM serasında yetiştirilen asma bitkileri

2.3 Bitkisel Materyalin *In Vitro* Çoğaltılması,

PAÜ B YOM serasında büyütülen ve yaklaşık olarak bir yıl, sonra gelen bitkisel materyalden Mart ayının ikinci yarısından Nisan ayının ilk yarısına, boyunca sürgün

uçlar, elde edilmiş tir. Elde edilen sürgün uçlar, yüzey sterilizasyonundan sonra doku kültürü ortamında çoğaltılmış, t.r.

2.4 Sürgün Uçlarına Yüzey sterilizasyonu

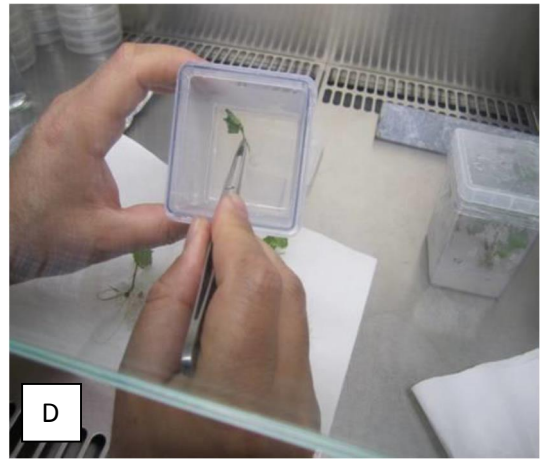
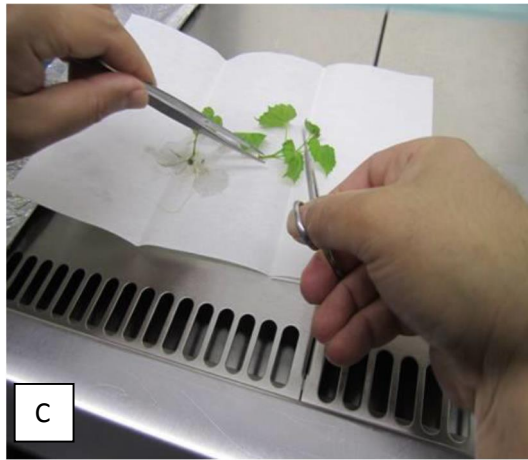
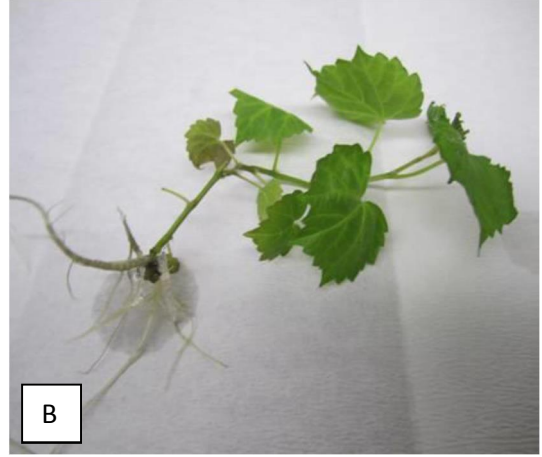
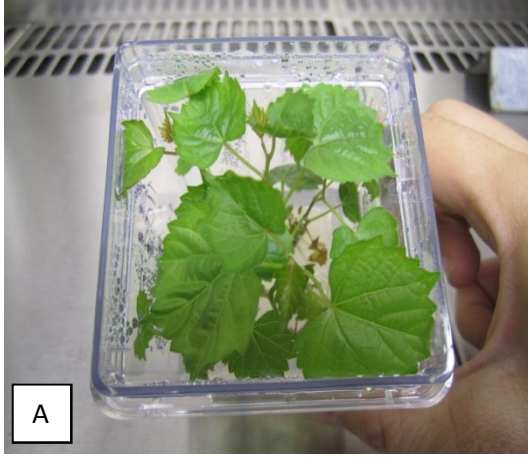
Toplanan sürgün uçlar, %70'lik etanol bulunan kavanozda 40 saniye ve daha sonra sterilizasyon solüsyonu (%20'lik kloraks + %0.1 Tween-20) içinde 15-20 dakika tutulmu tur. Daha sonra sterilizasyon solüsyonu içerisinde bulunan uç sürgünler steril kabine alınarak steril distile sudan üç defeye geçirilir ve steril kurutma kâğıtları üzerine alınmış, t.r. Sürgün uçlar, yüzey sterilizasyonundan sonra MS (Murashige ve Skoog 1962) medyasına konularak büyütülmü tür.

2.5 Sürgün Uçlarının Çoğaltılması,

Sürgün uçlar, 30 gr/l süzkroz içeren MS (Tablo 2.3) medyası, koyulmuş Magenta kutularına aktarılmış, (ekil 2.2) ve her üç ayda bir alt kültür olu turularak çoğaltılmış, t.r (ekil 2.3). Çoğaltılan sürgün uçlar, daha sonra yaklaşık 1 mm uzunluğunda kesilip, 1/2 MS ve 0.3 M süzkroz içeren kat besin ortamında (Matsumoto ve Sakai 2003) üç gün tutulduktan sonra iki aşamalı vitrifikasyon uygulamasına tabi tutulmu tur (Tablo 2.3).



ekil 2.2: Doku kültürüne aktarıldıktan 20 gün sonra sürgün uçlarının durumu



ekil 2.3: Steril kabinde sürgün uçları, nod alt kültür olarak çoğaltılması.

- A) Doku kültüründe büyüyen steril bitki. B) Bitkinin steril kağıt üzerine alınması.
C) Bitkinin nod bölgelerinden kesilerek parçalara ayrılması. D) Kesilen parçaların MS içeren Magenta kaplara aktarılması.

Kullanılan MS tabanlı besin ortamları, içerikleri Tablo 2.3'te verilmiştir. Makromineraler ve mikromineraler ve vitaminler daha önceden ilgili prosedüre göre stok solüsyonu olarak hazırlanmıştır. Besi ortamı sterilizasyon işlemi ise 121 °C'de otoklavda 20 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. Besi ortamlarına katı olarak %7 agar eklenmiştir.

Tablo 2.3: Çal, mada kullan,lan MS tabanlı, medyalar,n içerikleri

MS makromineraler (mg l ⁻¹)	MS ^a	MS ^b	YS ^c	MS ^d	RM ^e
NH ₄ NO ₃	1,650	825	1,650	1,650	825
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	220	440	440	220
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	185	370	370	185
KNO ₃	1,900	950	1,900	1,900	950
KH ₂ PO ₄	170	85	170	170	85
MS Mikromineraler (mg l⁻¹)					
KI	0.83	0.415	0.83	0.83	0.415
H ₃ BO ₃	6.2	3.1	6.2	6.2	3.1
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9	8.45	16.9	16.9	8.45
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	4.3	8.6	8.6	4.3
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.125	0.25	0.25	0.125
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.0125	0.025	0.025	0.0125
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	13.9	27.8	27.8	13.9
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.0125	0.025	0.025	0.0125
Na ₂ .EDTA	37.3	18.65	37.3	37.3	18.65
Vitaminler (mg l⁻¹)					
Thiamine (B1)	0.1	0.05	0.1	0.1	0.05
Nicotinicacid (B3)	0.5	0.25	0.5	0.5	0.25
Pyrodoxine (B6)	0.5	0.25	0.5	0.5	0.25
Glycine	2.0	1.0	2.0	2.0	1.0
Myo-inositol	100	50	100	100	50
sucrose (g l ⁻¹)	30	102.69	136.92	410	30
Agar (g l ⁻¹)	7	7	0	0	10
Glycerol	0	0	184.18	0	0
BAP	0	0	0	0	1

^a Murashige ve Skoog (1962)

^b 1/2 MS ve 0.3 M sükröz içeren katı besi ortamı (Matsumoto ve Sakai 2003)

^c MS, 2 M gliserol ve 0.4 M sükröz içeren sıvı yükleme solüsyonu (Nishizawa ve diğ. 1992)

^d MS, 1.2 M sükröz içeren sıvı besin ortamı (Matsumoto ve Sakai, 2003)

^e 1/2 MS, 1 ml/l BAP, %3 sükröz ve %2 agar içeren katı rejenerasyon medyası (Matsumoto ve Sakai 2003)

2.6 Kriyojenik Prosedür

Ço alt,lan sürgün uçlar,ndan yakla ,k 1 mm uzunlu unda kesilip ç,kar,lm,
1/2 MS ve 0.3 M sükröz içeren kat, besin ortam,nda (Matsumoto ve Sakai 2003)

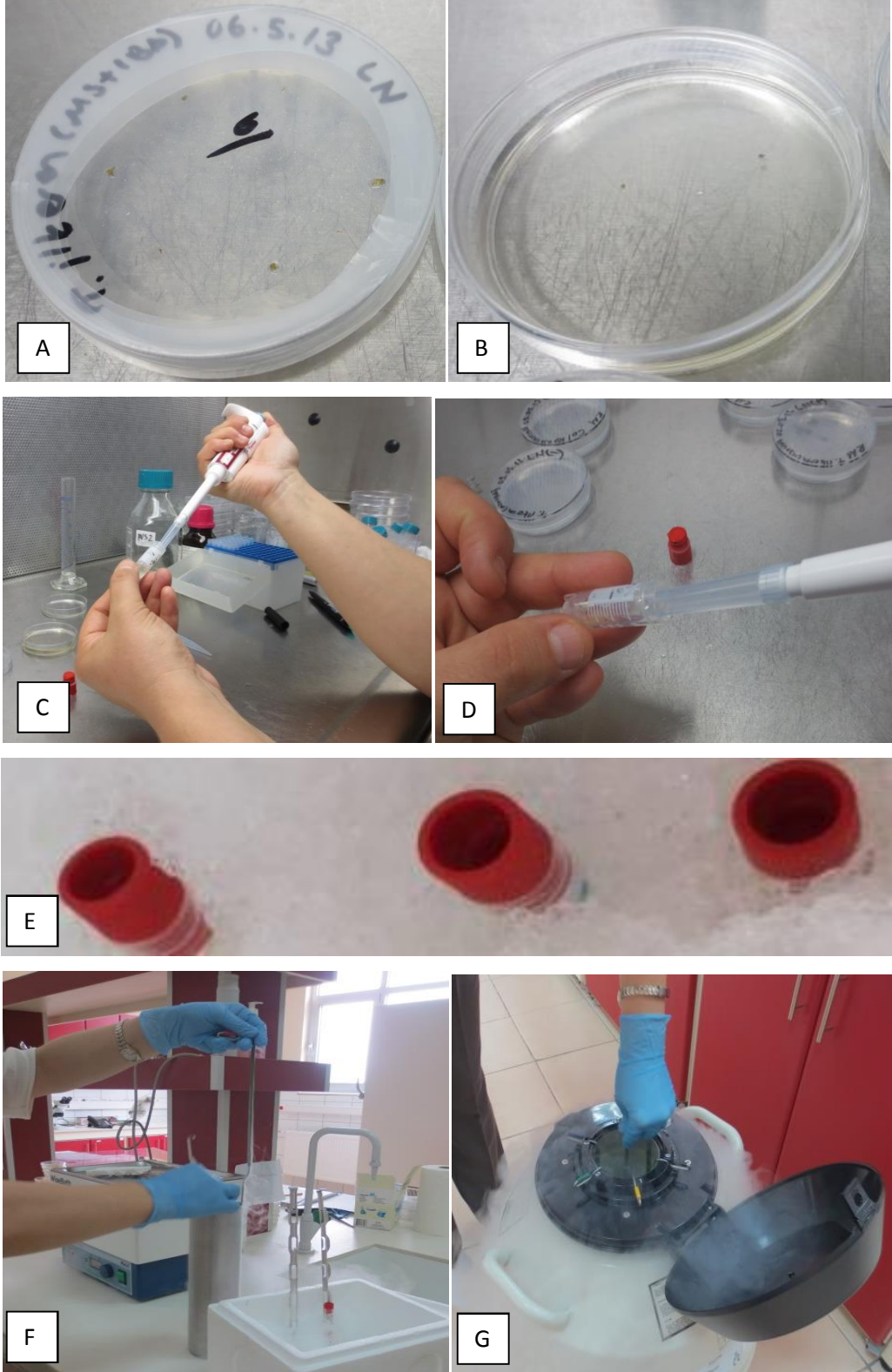
(Tablo 2.3) 25 °C'de üç gün boyunca tutulmuş olan sürgün uçlar, (ekil 2.4A) bu ortamdan alınarak yükleme solüsyonu (YS) (Nishizawa ve di . 1992) (Tablo 2.3) çözeltisine alınmış, t,r (ekil 2.4B). Yükleme solüsyonu 2 M gliserol ve 0.4 M sükröz içeren MS içeren s,v, besin ortam,d,r. Kültür edilen sürgün uçlar, 25 °C'de 20 dakika boyunca yükleme çözeltisinde tutulmuş tur. Yükleme çözeltisinden sonra örnekler çok yoğun olan PVS2 (Plant Vitrifikasyon Solüsyonu 2) (Sakai ve di . 1990) (Tablo 2.4) çözeltisine aktarılmış, t,r. ki amaç, vitrifikasyon uygulamasında örnekler önce 1/2 PVS2 çözeltisinde 0 °C'de 30 dakika (ekil 2.4C), daha sonra tam PVS2 çözeltisinde 0 °C'de 50 dakika (ekil 2.4D, 2.4E) bekletilmiştir. Son olarak 0.1 ml PVS2 içeren kriyo tüplere (ekil 2.4F) aktarılacak 120 dakika s,v, azota (ekil 2.G) daldırılmış, t,r.

Tablo 2.4: 1/2 PVS2 ve tam PVS2 çözeltilerinin içerikleri

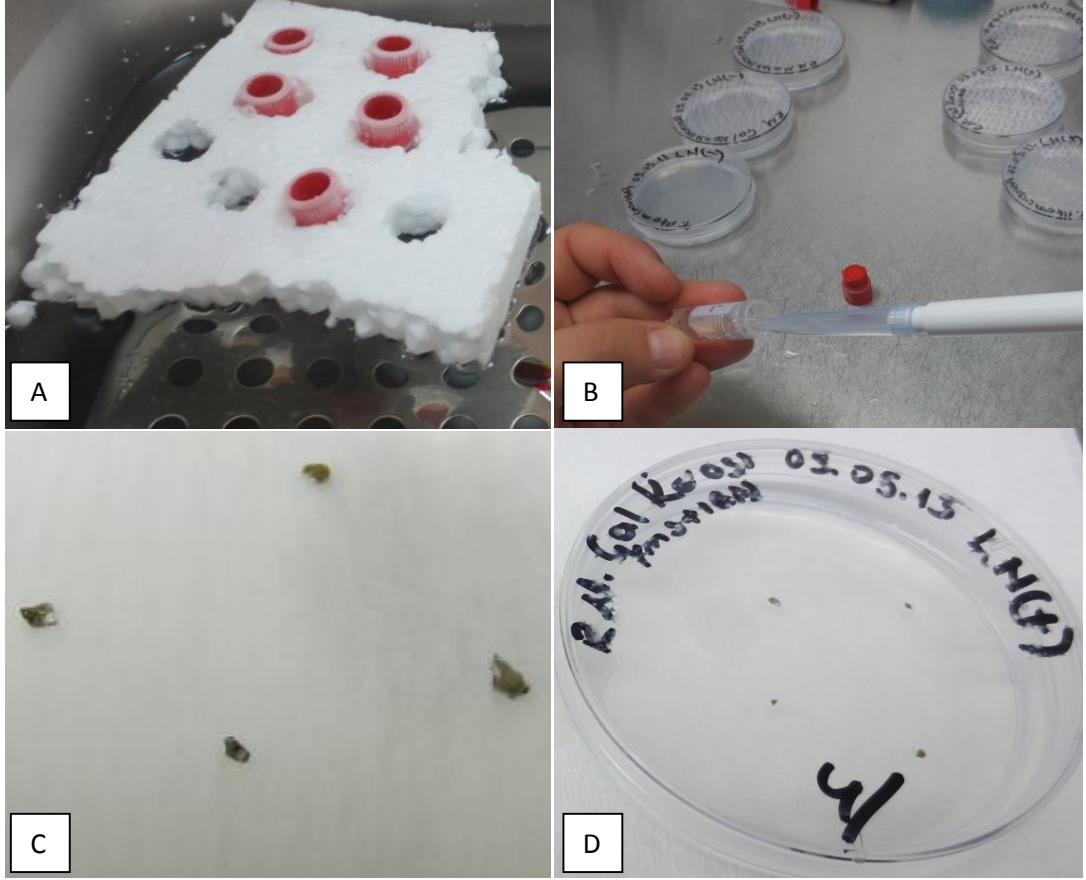
Vitrifikasyon Çözeltileri (1000 ml)		
	1/2 PVS2 (ml)	PVS2 (ml)
Glycerol	150	300
EtylenGlykol	75	150
MS (0.4 M sucrose)	200	400

Tablo 2.4'te verilen PVS2 çözeltileri hazırlanırken gliserol, etilen glikol (EG) ve pH'si, 5.8 olarak ayarlanmış, 0.4 M sükröz içeriği ile hazırlanan MS hep birlikte otoklavlanmış, t,r. Daha sonra otoklavlanmış, besin içeriğine kullanılabilecek, zaman 1/2 PVS2 çözeltisine 150 ml, tam PVS2 çözeltisine 75 ml dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmiştir.

S,v, azota daldırılarak hızla dondurulan örnekler daha sonra 40 °C'de bir dakika su banyosunda tutularak çözündürülmüştür (ekil 2.5A). Çözündürme işlemi sonrasında kriyo tüplerden PVS2 çözeltisi uzaklaştırılmış, t,r. Uzaklaştırılan PVS2 çözeltisi yerine 1.2 M sükröz içeren s,v, MS besi ortam, (Matsumoto ve Sakai 2003) (Tablo 2.3) eklenmiş ve örnekler 25 °C'de 20 dakika bekletilmiştir (ekil 2.5B). Sonrasında sürgün uçlar, steril kağıtların üzerine alınmış, (ekil 2.5C) ve steril kağıtların üzerinden de kat, rejenerasyon medyas, (RM) (Tablo 2.3) içeren petrilere aktarılmış, t,r (ekil 2.5D). Aktarımdan bir gün sonra sürgün uçlar, taze yapılmış, aynı rejenerasyon medyas, içeren petrilere yeniden aktarılmış, t,r.



ekil 2.4: Kriyojenik prosedürün a amalar,. A) 1mm uzunlu undaki sürgün uçlar,n,n 25 °Cde üç gün bekletilmesi. B) Sürgün uçlar,n,n s,v, yükleme solüsyonunda bekletilmesi C) Sürgün uçlar,n,n ½ PVS2 çözeltisine aktar,lmas,. D) Sürgün uçlar,n,n tam PVS2 çözeltisine aktar,lmas,. E) Sürgün uçlar,n,n PVS2 çözeltisinde 0 °Cde bekletilmesi. F) PVS2 içeren kriyo tüplerin s,v, azot tank,na dald,r,lmak için çubuklara yerle tirilmesi. G) Kriyo tüplerin s,v, azot tank,na dald,r,lmas,.



ekil 2.5: Sürgün uçlar,n,n kriyojenik prosedür sonras,nda çözdürülmesi ve rejenerasyon medyas,na alınması. A) 40 °C'dik su banyosunda çözdürme i leminin uygulanması. B) kriyo tüplerdeki PVS2 çözeltisinin 1.2 M sükröz içeren s,v, MS besi ortam, ile de i tirilmesi. C) Sürgün uçlar,n,n steril ka ıt üzerine alınması, D) Sürgün uçlar,n,n rejenerasyon medyas,na alınması.

2.7 Sürgün Uçlar,n,n Büyütülmesi

Regensyon medyas,na aktarılan sürgün uçlar, büyümeleri için PAÜ B YOM da bulunan doku kültürü odası,na alınmışlardır (ekil 2.6). Burada 16 saat aydınlık / 25 °C ve 8 saat karanlık / 17 °C'ye ayarlanmış, büyütme kabinlerinde gelişmeleri izlenmiştir.



ekil 2.6: PAÜ B YOM doku kültürü odası,

2.8 Sürgün Uçlar, n, n Flow Sitometri ile Analizi

Gelişimleri izlenerek büyümeye devam eden ve uygun amaçlara gelen bitkilerden ve kallus formunda gelişim gösterenlerden 50 g alınarak, ve çekirdekleri izole edilerek DNA miktarları, ve ploidi seviyeleri flow sitometri (Beckman Coulter Cell Lab Quanta SC Flow cytometer) ile ölçülmüştür. Bu yöntemin bu amaçla kullanılması, rejenere olan kallus ve bitkilerde büyük ölçekli kromozomal anomali olup olmadığının test edilmesidir.

Tablo 2.5: Çekirdek izolasyon tamponu (NIB) içeriği (100 ml için)

Kimyasal	Kimyasal miktar,	Final içerik miktar, ^a
HEPES	360 mg	15 mM
Na ₂ EDTA	37.22 mg	1 mM
KCl	597 mg	80 mM
NaCl	116.2 mg	20 mM
Triton X-100	200 mikrol	%0.2 (v/v)
Sükroz	10.3 g	300 mM
Spermin	17.4 mg	0.5 mM
PVP-40	1 g	1%

^a pH 7.5'e ayarlanır ve -20 °C'de saklanır.

Flow sitometri ile yapılacak ölçümlerde kullanılmak üzere petri kabının içerisine ölçümleri yapılacak asma bitkisinin ve kontrol olarak kullanılan *Hordeum vulgare* L. (10.1 pg; Arumuganathan ve Earle 1991) bitkisinin taze sürgünlerinden yaklaşık 50 g (6-8 cm kadar) alınarak üzerilerine 1.5 ml nuclei isolation buffer (NIB) (çekirdek izolasyon tamponu) eklenmiştir. Analiz için kullanılan NIB buffer içerikleri Tablo 2.5'te verilmiştir.



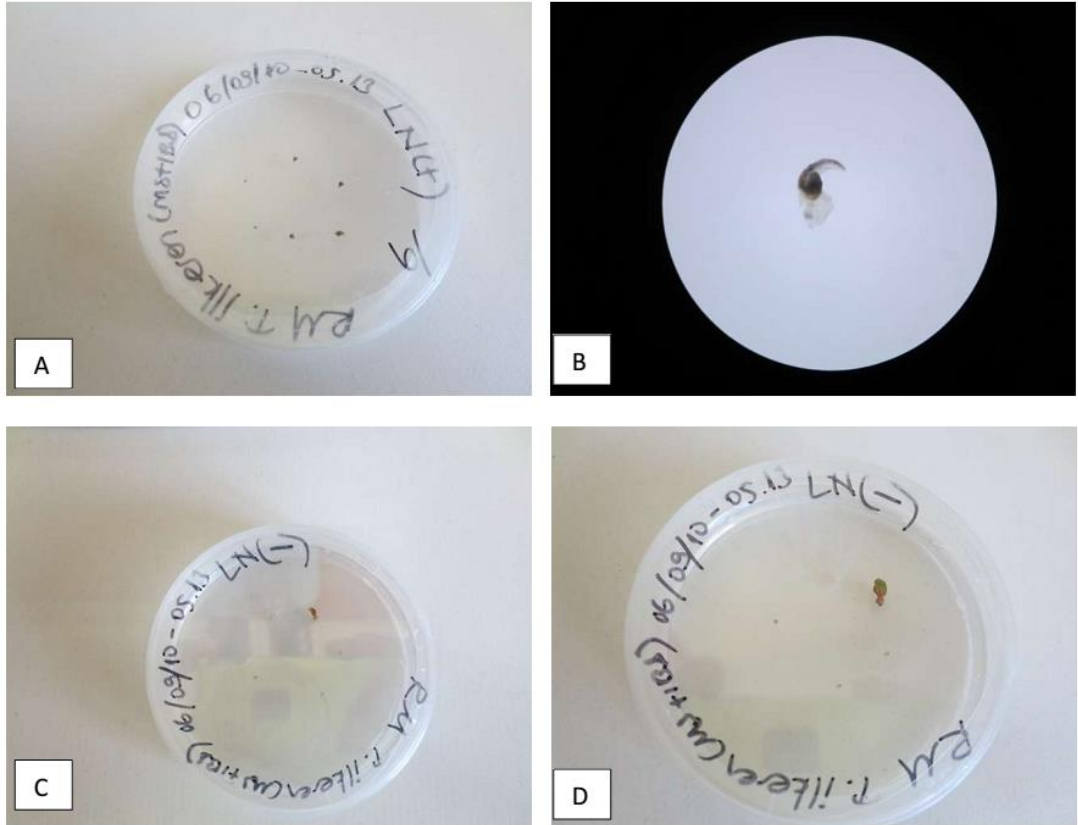
ekil 2.7: Sürgün uçlarının Flow Sitometri ile analizi. A) NIB içindeki dokuların jiletlerle kırılması, ve örnek elde edilmesi. B) örneklerin filtreden geçirilmesi. C) örneklerin eppendorf tüpüne aktarılması. D-E) örneklerin Flow Sitometri ile ölçülmesi.

NIB içinde bulunan dokular jilet yardımı ile çok ince kesilerek (ekil 2.7A) homojenize edildikten sonra 37 mikron porlara sahip naylon filtreden geçirilerek (ekil 2.7B) 2 ml'lik eppendorf tüplerine alınarak (ekil 2.7C). Daha sonra eppendorf tüpündeki özütler 10,000 rpm'de 5 sn santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işleminden sonra eppendorf tüpünün kaidesinde yapışık olan DNA numunelerinin üzerinde kalan tüm süzünme dökümü ve tüplere 500 µl NIB eklenerek tüpler vortekslenmiştir. Vorteksleme işleminden sonra tüplere çekirdeklerin boyanması için 10 µl propidium iodide (PI) stok (1 mg/ml) eklenerek vorteksleme tekrar edilmiştir. Tüm bu işlemlerden sonra örnekler buz kutularına yerleştirilerek analiz zamanına kadar bekletilmiştir. Analizden önce yeniden vortekslenen örnekler örnek kaplarına konmuş ve DNA miktarları, 10/15,000 (çekirdek/numune) akış hızında, içerisinde flow sitometre (ekil 2.7D ve 2.7E) ile ölçülmüştür.

3. BULGULAR

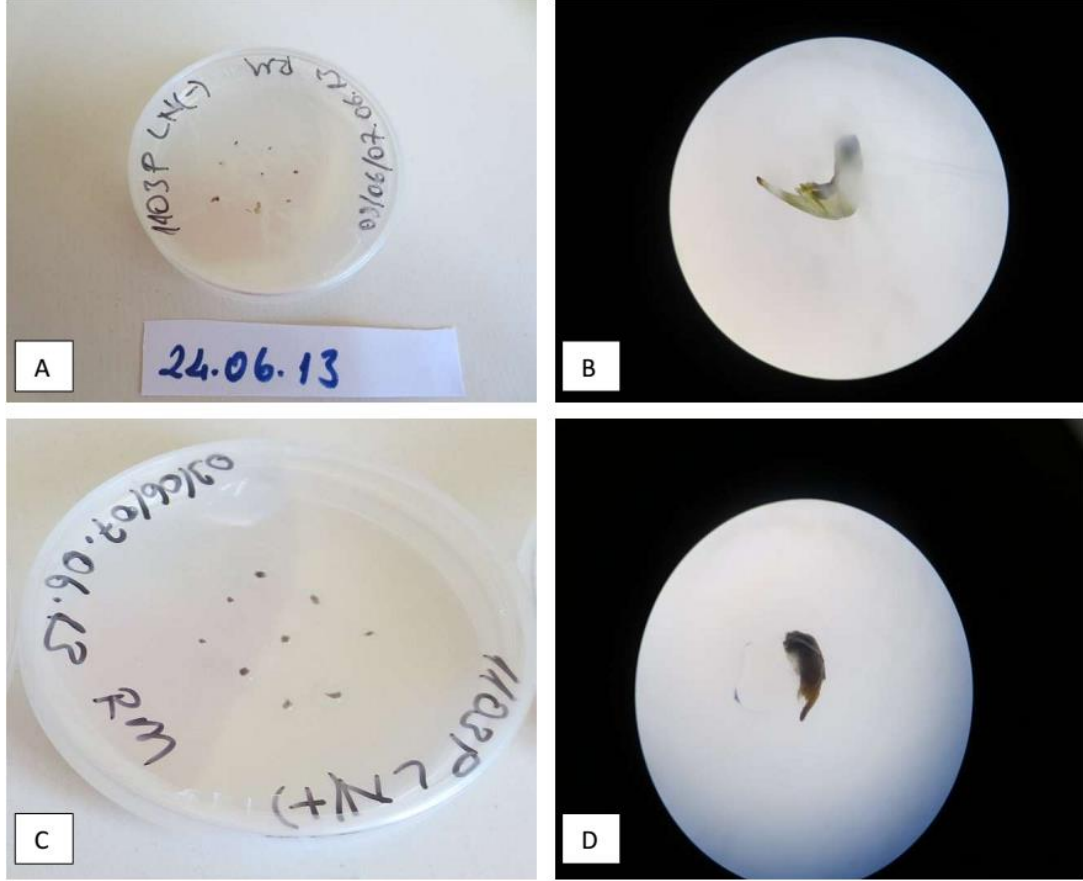
Bu çal, mada kullan,lan 14 farkl, genotipten be tanesinde sürgün formunda geli me gözlenmi tir. Çal, mada kullan,lan 14 farkl, genotipten 12 tanesi ticari çe it, iki tanesi anaç,t,r. Geli me gösteren sürgün uçlar, 1/2 MS içeren besi ortam,na aktar,lm, , hiçbir bitki büyüme düzenleyicisi eklenmeden köklenmeye b,rak,lm, t,r. Kallus formunda geli im gösterenlerden bitki elde edilememi tir. Di er çe itlerde büyüme ve geli me olmu fakat sürgüne dönü me olmam, t,r.

Trakya lkeren çe idinde kriyoprezervasyon i lemi ile s,v, azota dald,r,lan (LN+) ve dald,r,lmayan (LN-) örneklerde üç hafta sonra gözlemlenen geli im durumlar, ekil 3.1øde gösterilmi tir.



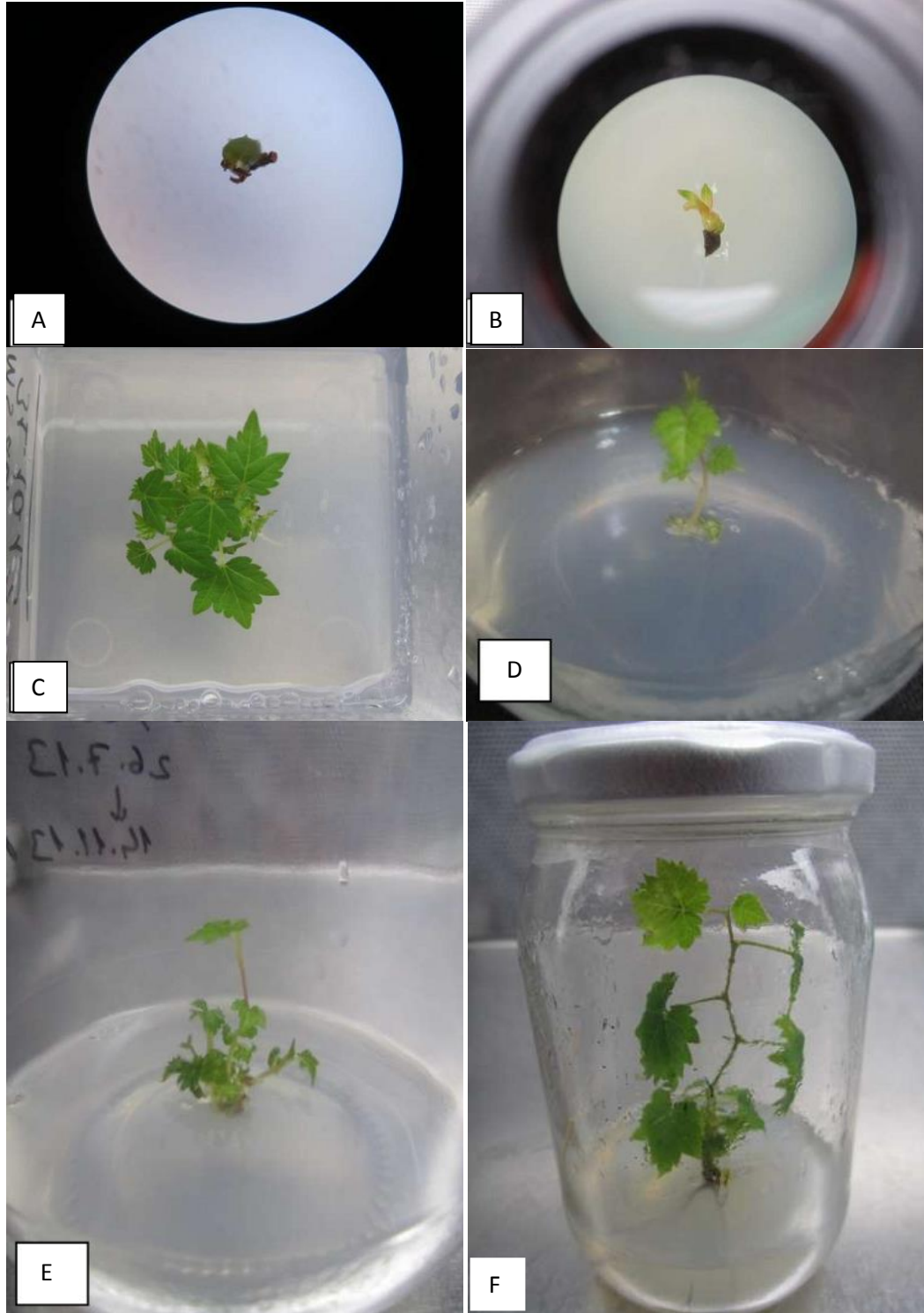
ekil 3.1: Trakya lkeren çe idinin kriyo regenerasyon medyas,na koyulduktan üç hafta sonra sürgün uçlar,n,n geli imi. A ve B: S,v, azota dald,r,lm, (LN+), C ve D: S,v, azota dald,r,lmam, t,r (LN-).

1103 P anac,nda kriyoprezervasyon i lemi ile s,v, azota dald,r,lan (LN+) ve dald,r,lmayan (LN-) örneklerde 3 hafta sonra gözlemlenen geli im durumlar, ekil 3.2øde gösterilmi tir.



ekil 3.2: 1103 P anac,nda, rejenerasyon medyas,na koyulduktan üç hafta sonra sürgün uçlar,n,n geli imi. A ve B: S,v, azota dald,r,lmam, (LN-), C ve D: S,v, azota dald,r,lm, t,r (LN+).

Bu çal, mada kullan,lan ve bitki olu umu elde edilen asma çe itleri ve anac,nda farklı haftalardaki baz, geli im süreçleri ekil 3.3øte gösterilmi tir. Kullan,lan genotiplerden toplam 231 adet sürgün ucu s,v, azota dald,r,lm, (LN+), 128 adet sürgün ucu ise kontrol amaçlı, s,v, azota dald,r,lmam, t,r (LN-) (Tablo 3.1). Bu çal, mada uygulan iki a amal, vitrifikasyon prokolünün uygulanmas, sonras,nda bitkiciklerdeki geli me durumu Tablo 3.1øde gösterilmi tir.



ekil 3.3: Kriyoprezervasyon sonrasında bitki olumu gösteren asmalarda sürgün uçları gelişim aşamaları. A) Merlot çeşidi (dört hafta sonra) B) Trakya İkeren çeşidi (sekiz hafta sonra) C) Alicante Bouschet çeşidi (12 hafta sonra) D) 1103 P anac, (14 hafta sonra) E) Merlot çeşidi (16 hafta sonra) F) 1103 P anac, (22 hafta sonra)

Tablo 3.1: Çal, mada kullan,lan hatlar ve bu hatlara ait s,v, azota dald,r,lan (LN+) ve dald,r,lmayan (LN-) sürgün ucu say,s,, rejenerasyon sonras,nda canl,l,k ve büyüme ile bitki olu umu say,s, ve oranlar,

HATLAR	Sürgün ucu say,s,		Canl,l,k ve büyüme				Bitki olu umu			
			LN (-)		LN (+)		LN (-)		LN (+)	
	LN (-)	LN (+)	Adet	%	Adet	%	Adet	%	Adet	%
Merlot	10	25	6	60.0	22	88.0	5	50.0	19	76.0
Trakya lkeren	8	26	6	75.0	24	92.3	3	37.5	2	7.7
Çal Karas,	12	20	7	58.3	18	90.0	2	16.7	2	10.0
Cabernet Sauvignon	7	10	5	71.4	6	60.0	0	0.0	0	0.0
Sultani Çekirdeksizi	14	26	9	64.3	22	84.6	0	0.0	0	0.0
Alicante Bouschet	5	6	3	60.0	4	66.7	2	40.0	3	50.0
Bornova Misketi	10	13	6	60.0	9	69.2	0	0.0	0	0.0
Superior Seedless	5	9	2	40.0	4	44.4	0	0.0	0	0.0
Syrah	3	6	1	33.3	3	50.0	0	0.0	0	0.0
Yalova ncisi	14	13	9	64.3	10	76.9	0	0.0	0	0.0
Crimson Seedless	14	14	11	78.6	12	85.7	0	0.0	0	0.0
Red Globe	8	21	5	62.5	17	81.0	0	0.0	0	0.0
5 BB	6	22	3	50.0	14	63.6	0	0.0	0	0.0
1103 P	12	18	9	75.0	18	100.0	2	16.7	4	22.2

Kontrol amaçl, kullan,lan Merlot çe idinde 25 sürgün ucu s,v, azota dald,r,lm, (LN+), 22 adet sürgün ucunda büyüme ve geli im olmu bunlardan 19 adet (%76.0) sürgün ucunda ise bitki olu umu gözlenmi tir (Tablo 3.1). Merlot çe idinde 10 adet sürgün ucu s,v, azota dald,r,lmam, (LN-), alt, adet sürgün ucunda büyüme ve geli im olmu bunlardan be adet (%50.0) sürgün ucundan ise bitki olu umu gözlenmi tir (Tablo 3.1).

Yerli çe itlerden Trakya lkeren ve Çal Karas,nda da bitki olu umu gözlenmi tir.

Trakya lkerenøden 26 adet sürgün ucu s,v, azota dald,r,lm, (LN+), 24 adet sürgün ucunda büyüme ve geli me gözlenmi , bunlardan iki adet (%7.7) sürgün ucunda bitki geli imi olmu tur (Tablo 3.1). Trakya lkeren çe idinin kontrol grubunda (LN-) ise sekiz adet sürgün ucu s,v, azota dald,r,lmam, , bunlardan alt, tanesinde büyüme ve geli me olmu , üç adet (%37.5) sürgün ucu ise bitkiye dönü mü tür.

Çal Karas, çe idinde ise 20 adet sürgün ucu s,v, azota dald,r,lm, (LN+), 18 adet sürgün ucunda büyüme ve gelişme gözlenmi , iki adet (%10.0) sürgün ucu bitkiye dönüşümü tür (Tablo 3.1). Kontrol grubunda (LN-) ise 12 adet sürgün ucu s,v, azota dald,r,lmam, , yedi tanesinde büyüme gelişme gözlenmi , iki adet (%16.7) sürgün ucu bitkiye dönüşümü tür.

Alicante Bouschet, bitki elde edilen diğer bir çe ittir. Alt, adet sürgün ucu s,v, azota dald,r,lm, (LN+), dört adet sürgün ucunda büyüme ve gelişme gözlenmi , üç adet (%50.0) sürgün ucundan bitki elde edilmiştir (Tablo 3.1). Alicante Bouschet kontrol grubunda (LN-) ise be adet sürgün ucu s,v, azota dald,r,lmam, , üç adet sürgün ucunda büyüme ve gelişme olmu , iki adet (%40.0) sürgün ucundan bitki elde edilmiştir.

1103 P anaç bir çe ittir. Çal, mada kullan,lan iki anaçtan biri olarak bitki elde edilen çe ittir. 1103 P çe idinde 18 adet sürgün ucu s,v, azota dald,r,lm, (LN+), tümünde büyüme gelişme gözlenmi , ancak dört adet (%22.2) sürgün ucu bitki olu turmu tur (Tablo 3.1). Kontrol grubunda (LN-) ise 12 adet sürgün ucu s,v, azota dald,r,lmam, , dokuz sürgün ucunda büyüme ve gelişme gözlenmi , ancak iki adet (%16.7) sürgün ucundan bitki elde edilmiştir.

Bu çal, ma sonucunda bitki elde edilen genotipler Merlot (%76.0), Alicante Bouschet (%50.0), Çal karas, (%10.0), Trakya lkeren (%7.7) ve 1103 P (% 22.2) dir. Gelişme gösteren sürgün uçlar,ndan flow sitometri analizi ile çekirdek DNA miktar, analizi yap,lm, t,r. Yap,lan analizlerde kromozom anomalisine rastlanmam, t,r.

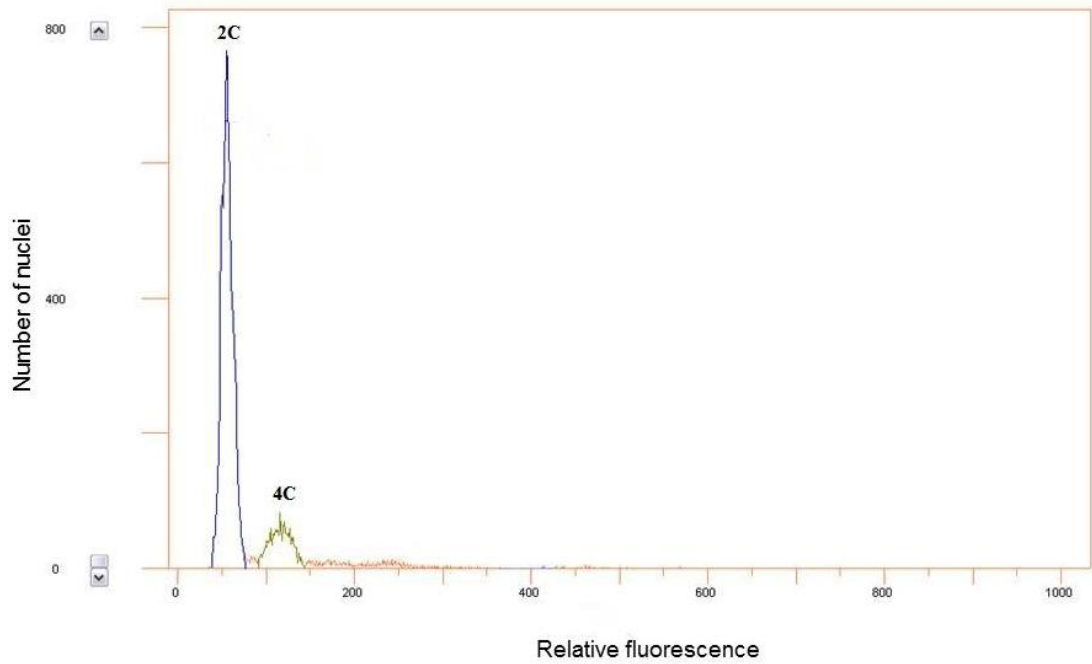
Çal, ma s,ras,nda kullan,lan be yerel üzüm çe idinden iki tanesinde (Trakya lkeren ve Çal Karas,) bitki elde edilmi , di er üç çe itte (Sultani Çekirdeksiz, Bornova Misketi, Yalova ncisi) büyüme gelişme elde edilse de bitkiye dönüşüm gerçekleşmemiştir.

Bu çal, ma kullan,lan biri anaç (5 BB) olan alt, farklı, (Cabernet Sauvignon, Superior Seedless, Syrah, Crimson Seedless, Red Globe) genotipte de hem s,v, azota dald,r,lan (LN+), hem de s,v, azota dald,r,lmayan (LN-) kontrol gruplar,ndan tümünde, farklı, yüzdelik dilimlerde (Tablo 3.1) sürgün uçlar,nda büyüme ve gelişme

gözenmi ancak bitki elde edilememi tir. Bunlar,n olası nedenleri tart, ma bölümünde irdelenmi tir.

Üzüm diploid bir bitkidir. Somatik hücrelerinin çekirde indeki DNA miktar, bir pikogramd,r. Flow sitometre analizi sonucunda elde edilen histogram incelendi inde 2C seviyesi hücre bölünmesinin G1 faz,na kar ,l,k gelmektedir (ekil 3.4). 4C seviyesinde hücre S faz,ndad,r ve DNA sentezi gerçekte mi tir.

Yap,lan analiz sonucunda ise hem sürgün formunda hem de kallus formunda geli im gösteren sürgün uçlar,nda kromozomal anomaliye rastlanmam, t,r. Kallus formunda geli imin ise kromozomal bir anomaliden kaynaklanmad, , görülmü tür. Bitki olu umu gerçekte en çe itler ve anaç yakla ,k iki y,l boyunca alt kültür al,narak ço alt,lm, ve takip edilmi tir. Bitkiler oldukça sa l,kl, durumdad,r.



ekil 3.4: Flow Sitometri histogram,

4. TARTI MA

Bugüne kadar kriyoprezervasyon yöntemi pek çok bitkiye uygulanmış, t,r (Kaviani 2011). S,v, azotta koruma olarak tanımlanan kriyoprezervasyon, uzun vadede vejetatif olarak üretilen bitkilerin korunması için en iyi seçenektir. Kriyoprezervasyon yönteminde en önemli amaç; s,v, azota daldırma ile leminin yol açacağı hüresel hasarların önüne geçmek için uygulanan ön işlemler amaçlarıdır. Bu ön işlemler hücreden yeteri kadar suyun uygun biçimde uzaklaştırılmasıdır.

Bu çalışmada seçilen yöntem iki amaçla, vitrifikasyon yöntemidir. Vitrifikasyon temel ve en yaygın uygulanan bitki dondurarak saklama yöntemlerinden biridir. Çoğu vitrifikasyon protokolünde bitki vitrifikasyon solüsyonu 2 (PVS2) uygulanır (Sakai ve diğ. 1990) (Tablo 2.3). Çok yoğun olan PVS2 çözeltisi sürgün uçları ve kullanılan eksplantları koruyarak s,v, azota daldırıldıklarında hasar görmelerini engelleyecek şekilde sabit bir cam, bir yapı olarak onları korur. Aynı zamanda PVS2 çözeltisinden önce ön kültüre uygulanan yükleme çözeltisinin de kriyoprezervasyonun başarısına olumlu etkisi olduğunu ve tropik bitkilerde defalarca kanıtlanmıştır (Matsumoto ve diğ. 1994; Thin ve diğ. 1999, 2000; Lambardi ve diğ. 2000; Pennycook ve Towill 2000; Turner ve diğ. 2000). Yükleme çözeltisi ile ozmotik olarak dehidrasyona uğrayan hücreler, arka arkaya uygulanan PVS2 ile hem dehidrasyona uğramaya devam eder hem de cam, lik özelliği kazanırlar. Burada gerçek koyucuyu mekanizmanın ne olduğu tam olarak bilinmese de dehidrasyonun neden olduğu mekanik stres de azaltılmaktadır (Tao ve diğ. 1983; Jitsuyama ve diğ. 1997). PVS2 nin uygulama süresi de hem uygulanan materyalin büyüklüğüne hem de türe özgü olarak değişmektedir (Niino ve diğ. 1992a).

Bu çalışmada sürgün uçları, ön kültür uygulamasından sonra 25 °C'de 20 dakika boyunca yükleme çözeltisinde (Tablo 2.3) bekletildikten sonra, önce 1/2 PVS2 çözeltisinde 0 °C'de 30 dakika daha sonra tam PVS2 çözeltisinde 0 °C'de 50 dakika bekletilip 0.1 ml PVS2 içeren kriyo tüplere aktarılarak s,v, azota daldırılmalarıdır. Bundan sonraki amaçlar çözündürme ve rejenerasyon amaçlarıdır. Kriyoprezervasyonun başarısında seçilen yöntem kadar bu amaçlarda çok önemlidir.

Zira *Vitis vinifera* ile yapılan önceki çal, malarda Plessis ve arkadaş lar, (1991, 1993) yava çözdürme (oda sıcaklığı, 15 dk.) ile hızlı çözdürmeyi (40 °C'de üç dk.) karşılaştırdıklarında sürgün uçlarında hayatta kalma oranının hızlı çözdürmede daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Matsumoto ve Sakai (2003) tarafından yapılan çal, mada ise hızlı çözdürme işlemi 40 °C'de bir dakika içinde gerçekleştirilmiştir. Bu çal, mada sıcaklığı, azotta 120 dakika bekletilen sürgün uçları, sıcaklığı, azottan çıkarıldıktan sonra 40 °C'de bir dakika su banyosunda tutularak hızlı çözdürülmüştür.

Bu çal, mada T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Manisa Bölgesel Araştırma Merkezinden elde edilen çubuk halindeki yedi yabancı, be Türkçe idi ve iki anaç olmak üzere 14 farklı asma genotipi Pamukkale Üniversitesi Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (PAÜ B YOM) serasında yetiştirilmiştir. Bu bitkilerden alınan sürgün uçları, *in vitro* koşullarda çoğaltılmış ve alt kültür uygulamaları yapılmıştır. Çal, mada, iki aşamalı vitrifikasyon yöntemi kullanılarak 14 farklı genotipe kriyoprezervasyonun uygulanabilirliği araştırılmıştır. Ayrıca gelişme gösteren sürgün uçlarından flow sitometri analizi ile çekirdek DNA miktarı analizi yapılmıştır. Yapılan analizlerde kromozom anomalisine rastlanmamıştır. Bu çal, mada sırasında Matsumoto ve Sakai (2003) tarafından asma sürgün uçlarına uygulanan iki aşamalı vitrifikasyon yöntemi izlenmiştir.

Çal, mada elde edilen bulgular değerlendirildiğinde kontrol amaçlı kullanılan Merlot çeşidinde Matsumoto ve Sakai (2003) %86.7'dik geri kazanım oranı, yakalarken bu çal, mada %76.0'dik bitki oluşumu oranı elde edilmiştir. Bu açıdan bakıldığında çal, mada elde edilen bu sonuç protokolün doğru uygulandığını ve Merlot çeşidi için bu yöntemin kullanılabilmesini göstermiştir.

Matsumoto ve Sakai (2003) yaptıkları çal, mada Cabernet Sauvignon çeşidinde %85.0'dik bir geri kazanım oranı elde etmişlerdir. Tez çal, mada da Cabernet Sauvignon çeşidi kullanılmış, sıcaklığı, azota daldırılan (LN+) sürgün uçlarında %60.0 sıcaklığı, azota daldırılmayan (LN-) sürgün uçlarında %71.4 oranında (Tablo 3.1) büyüme ve gelişme yakalanmış ancak bitki elde edilememiştir. Protokolün doğru uygulanması, olmasınra men bitki elde edilememi olması bitkisel materyalin

ço alt,ımas, s,ras,nda yeterince sürgün ucu elde edilememi olmas, olarak dü ünülmektedir.

İlk kez Türk çe itlerinde böyle bir çal, man,n yapı,p ba ar,l, sonuç elde edilmi olmas, yerel çe itler aç,s,ndan de erlendirildi inde çal, man,n amac, aç,s,ndan oldukça ba ar,l,d,r. Çal Karas,ında elde edilen %10.0duk ve Trakya İkeren,de elde edilen %7.7dik bitki olumu kriyoprezervasyon yönteminin yerel çe itlerde de kullan,labilece ini göstermi tir. Burada elde edilen ba ar,l, sonuç bu çal, man,n amac, aç,s,ndan oldukça önemlidir. Bu yöntemle yerel asma genetik kaynaklar,m,z teorik olarak sonsuza kadar saklanabilir. Elbette bitki olumu oran, ileride yap,lacak çal, malarla artt,r,labilir. Ancak unutulmamal,d,r ki yüzde bir seviyesinde bile saklanacak genetik kaynak, doku kültürü ortam,nda ço alt,labilir. Bununla birlikte yerel çe itlerdeki genotipik farklılıklar göz önüne alınarak kriyoprezervasyon a mas,ndaki besi ortamlar, kar ,la t,rnal, olarak çal, ,labilir, bitki büyüme düzenleyicileri farklı oranlarda kullan,larak yine kar ,la t,rnal, çal, malarla farklı rejenerasyon ortamlar,nda bitki olumu ve geli imi izlenebilir. Bunlar,n sonucunda bitki olumu oran, artt,r,labilir.

Merlot çe idinden sonra en yüksek bitki olumu oran,na sahip olan çe it, %50.0 bitki elde etme oran, ile Alicante Bouschet çe ididir. Alt, adet sürgün ucu s,v, azota dald,r,lm, (LN+), dört adet sürgün ucunda büyüme ve geli me gözlenmi , üç adet sürgün ucundan bitki elde edilmi tir. Çal, mada kullan,lan ve yerel olmayan 7 ticari çe itten ikisinde yüksek oranda bitki elde edilirken di er çe itlerde bitki elde edilememi tir.

Matsumoto ve Sakai (2003) yapt,klar, çal, mada anaç olarak 5 BB, 5 C ve 1202 çe itlerini kullanm, lar ve 5 BB,de %30.0, 5 C,de %63.3 ve 1202,de %75.0 oran,nda geri kazan,m elde etmi leridir. Bu çal, mada kullan,lan anaç çe itleri 5 BB ve 1103 P,dir. 1103 P anac,nda elde edilen bitkicik oran, %22.2,dir (Tablo 3.1). Bunun için s,v, azota dald,r,lan sürgün ucu say,s, 18,dir (Tablo 3.1). 5 BB için s,v, azota dald,r,lan sürgün ucu say,s, 22,dir ancak elde edilen bitki olumu s,f,r,d,r.

Bu çal, mada kullan,lan di er dokuz farklı genotipte hem s,v, azota dald,r,lan (LN+), hem de s,v, azota dald,r,lmayan (LN-) kontrol gruplar,n,n tümünde, farklı yüzdelik dilimlerde (Tablo 3.1) sürgün uçlar,nda büyüme ve geli me gözlenmi

ancak bitki elde edilmiştir. Bu sonuçlar yapılmış diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında ise uygulanan kriyoprezervasyon yöntemlerinde ve kriyoprezervasyon uygulanan bitki bölümlerinde farklılıklar dikkat çekmektedir.

Wang ve arkadaşları (2002) yaptıkları, embriyonik hücre süspansiyonuna kapsülleme ve dehidrasyon uygulamaları, çalınan Red Globe çeşidi için farklı besin ortamları kullanmaları ve %52.0 ile %32.0 arasında geri kazanım elde etmişlerdir. Tez çalışmaları da Red Globe çeşidi kullanılmayan S, v, azota daldırılan sürgün ucu sayısı, 21, büyüme gelişme oranı, %80.9 (Tablo 3.1), bitki eldesi şeklindedir. Bu koşullarda Red Globe çeşidi için uygun yöntemin embriyonik hücre süspansiyonu olduğu ya da kullanılacak besin ortamının farklı olması gerektiği sonucu çıkarılabilir.

Wang ve arkadaşları (2000) yaptıkları diğer bir çalışmada ise sürgün uçlarına kapsülleme ve dehidrasyon yöntemini LN33 hibriti (Courderc 1613_ sultana) ve Superior cv. (*Vitis vinifera* L.) çeşidine uygulamaları. Bu çalışmada dehidrasyon yönteminde silika jel ve hava kurutmanın geri kazanıma etkisi ile regenerasyon medyasına eklenen farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin ve çözündürme ilminin hızı ya da yava olması bitki gelişimine etkisi karşılaştırılmıştır. Çalışmalarına göre; yapılmış çalışmalar da ortak olan Superior çeşidinde yedi saat süren hava kurutma ile geri kazanım %60.5, en iyi çözündürmenin 40 °C'de üç dakika ve regenerasyon medyasına 1 mg/l BA ve 0.05 mg/l NAA eklendiğinde geri kazanım %40.2 olduğu belirtilmiştir. Bizim uygulamamız iki amaçla, vitrifikasyon yönteminde Superior Seedless çeşidinde dokuz adet sürgün ucu S, v, azota (LN+) daldırılmış, dört adet (Tablo 3.1) sürgün ucunda büyüme ve gelişme gözlenmiştir ancak bitki elde edilememiştir. Yapılan iki çalışmada karşılaştırıldığında Wang ve arkadaşları (2000) ne kadar sürgün ucunu S, v, azota daldırıldıkları bilinmemekle birlikte, Superior çeşidinde sürgün uçlarına kriyoprezervasyon uygulandığında geri kazanım mümkün olduğu görülmektedir. Bu çalışmada kullanılan kriyoprezervasyon yöntemi farklıdır ve belki de Superior çeşidi için uygun kriyoprezervasyon yöntemi kapsülleme ve dehidrasyon yöntemidir. Vitrifikasyon yöntemi ise daha fazla sürgün ucu S, v, azota koyularak ya da çözündürme ve regenerasyon medya içerikleri de iştirilerek yeniden uygulanabilir.

Çalınan ve bitki elde edilemeyen Syrah ve Crimson Seedless çeşitleridir. Syrah çeşidinde *in vitro* sürgün ucu üretiminde yeterli sürgün ucu elde

edilememi tir. Syrah çe idinde s,v, azota dald,r,lan (LN+) sürgün ucu adedi alt,d,r, üç adet (Tablo 3.1) sürgün ucunda büyüme ve geli me yakalanm, ancak bitki elde edilememi tir. Syrah çe idinde s,v, azota dald,r,lmayan (LN-) sürgün ucu say,s, üçtür, bir adet (Tablo 3.1) sürgün ucunda büyüme ve geli me olmu , ancak bitki elde edilmemi tir. Syrah çe idinde daha fazla sürgün ucu üretimi ve farklı, rejenerasyon medyalar, ile denemeler yapı,p, iki a amal, vitrifikasyon yöntemi yeniden denenebilir.

Crimson Seedless çe idinde ise s,v, azota dald,r,lan (LN+) ve dald,r,lmayan (LN-) sürgün ucu say,s, 14tür (Tablo 3.1). S,v, azota dald,r,lan sürgün uçlar,ndan yakalanan büyüme ve geli me oran, %85.7, s,v, sürgün ucu hem s,v, azota dald,r,lmayan sürgün uçlar,ndan elde edilen büyüme ve geli me oran, %78.6 (Tablo 3.1) olarak bulunmu ancak her iki grupta da bitki elde edilememi tir. Burada yeterli sürgün ucu bulunmas,na ra men bitki elde edilememi tir. Bu durumda bu çe it için farklı, bir kriyoprezervasyon yöntemi denemesi yapı,labilir.

Bu çal, mada bitki elde edilemeyen yerel çe itler, Sultani Çekirdeksiz, Bornova Misketi ve Yalova ncisidir. Sultan, Çekirdeksiz çe idinde 26 adet sürgün ucu s,v, azota dald,r,lm, (LN+), 22 adet sürgün ucunda % 84.6 oran,nda büyüme ve geli me yakalanm, , bitki elde edilememi tir (Tablo 3.1). Bornova Misketi,nde 13 adet sürgün ucu s,v, azota dald,r,lm, (LN+), dokuz adet sürgün ucunda % 69.2 (Tablo 3.1) oran,nda büyüme ve geli me olmu , bitki elde edilmemi tir. Yalova ncisi çe idinde 13 adet sürgün ucu s,v, azota dald,r,lm, (LN+), 10 adet (Tablo 3.1) sürgün ucunda % 76.9 oran,nda büyüme geli me olmu , bitki elde edilememi tir.

Bu yerel çe itlerde s,v, azot uygulamas,nda sürgün ucu büyüme ve geli imi oranlar, oldukça yüksek olmas,na ra men bitki elde edilmemi tir. Bu durumda bitki elde etmek için farklı, besi ortamlar, ve büyüme ve geli meyi destekleyecek farklı, bitki büyüme düzenleyicileri kullanarak çal, malar yapı,labilir.

Üzüm çe itlerinde sürgün ucu elde etmek için kullan,lacak materyalden *in vitro* sürgün ucu ço alt,lm, için en verimli dönemin Mart ay,n,n ikinci yar,s, ile Nisan ay,n,n ilk yar,s, oldu u görülmü tür. leride yapı,lacak çal, malarda bitkisel materyalin bu dönemde toplanmas, daha verimli sonuçlar verecektir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yayınlanmış, al, malar kriyoprezervasyon yönteminin uygulanmas, s,ras,nda elde edilen sonuçlar,n, seçilen bitkinin genotipine, yönteme ve yöntemin uyguland, , bitki bölümüne ba l, olarak de i ti ini göstermektedir.

Vitrifikasyon yöntemi günümüzde oldukça standart bir yöntem olmas,na ra men daha fazla al, ma yap,larak desteklenmelidir. Kriyoprezervasyonun tüm avantajlar,ndan yararlanmak ve gen bankalar,n,n düzenlenmesini sa lamak için bu al, malar yap,lmal,d,r. Optimize edilmesi gereken iki önemli faktör vard,r birisi dehidrasyona kar , dokular,n haz,rl,k a mas,, di eri ise örneklerin uygulanan vitirfikasyon czeltisinde bekletilme sresidir (Venkata Subbaiah 2015).

Bu al, ma Trkiyedeki baz, *Vitis* e itlerine ve anaçlar,na kriyoprezervasyon tekni inin uygulanabilirli i konusunda bir ara t,rma niteli inindedir. Bu nedenle baz, *Vitis* e itlerinde olumlu sonuçlar vermi olan iki a amal, vitrifikasyon tekni i uygulanm, ve bulgular payla ,lm, t,r.

Bu al, mada 14 farkl, genotip kullan,lm, t,r, bu genotiplerin 12 tanesi ticari, iki tanesi anat,r. kisi yerel olan be genotipde bitki elde edilmi tir. Geli me gösteren sürgün uçlar, 1/2 MS içeren besi ortam,na aktar,lm, , bitkilerin büyüme ve geli mesi hiçbir bitki büyüme düzenleyicisi eklenmeden gözlenmi tir. Di er e itlerde büyüme ve geli me olmu fakat sürgüne dn me olmam, t,r. Geli me gösteren sürgün uçlar,ndan flow sitometri analizi ile ekirdek DNA miktar, analizi yap,lm, t,r. Yap,lan analizlerde kromozom anomolisine rastlanmam, t,r.

al, mada en yüksek bitki oran,n,n elde edildi i ticari e it Merlot, en yüksek bitki oran,n,n elde edildi i yerel e it ise al Karas,d,r. 9 farkl, genotipte ise sürgün uçlar,nda e itli oranlarda büyüme ve geli me gerçekle mi ancak bitki elde edilememi tir. Bu durum, seçilen yöntemin bitki için uygun olup olmad, ,na ba l, oldu u gibi, yöntemde kullan,lan bitki bölümü için de uygun olup olmad, ,na ba l,d,r. Ayn, zamanda yerel e itlerin genotipik farkl,l, , da sonuçlar a,s,ndan göz önünde bulundurulmas, gereken di er önemli nedendir. Yerel e itlerin bu anlamda

farklı, olabileceği düüncesiyle, rejenerasyon medyasında farklı düzenlemelerle bitki elde edilebilir.

Yerel çe itlerde daha yüksek bitki elde etme oranlarına sahip olmak için farklı kriyoprezervasyon yöntemleri yerel çe itlerin sayısında arttırılarak denenmelidir. Yapılacak çalışmaların çe itlendirilmesi asma genetik kaynakların korunması, saklanması, açışından önemli olacaktır.

6. KAYNAKLAR

Akuamoa-Boateng, A., "Quality Protein Maize: Infant Feeding Trials in Ghana", Ghana Health Service, Ashanti, Ghana, 1-45, (2002).

Aramuganathan, K., Earle, E. D., "Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry", *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9, 229-241, (1991).

Assy-Bah, B., Engelmann, F., "Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets", *CryoLetters*, 13, 117-126, (1992).

Ba c, l, k Raporu, Manisa Ba c, l, k Ara t, rma Enstitüsü, Tekirda Ba c, l, k Ara t, rma Enstitüsü, Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Ankara, (2000).

Balkaya, A., Yanmaz, R., "Bitki genetik kaynaklar, n, n muhafaza imkanlar, ve tohum gen bankalar, n, n çal, ma sistemleri", *Ekoloji-Çevre Dergisi*, 25-30, (2001).

Barlass, M., Skene, K. G. M., "In vitro propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices", *Vitis*, 17, 335-340, (1978).

Barlass, M., Skene, K. G. M., "Studies on the fragmented shoot apex of grapevine I. The regeneration capacity of leaf primordial fragments in vitro", *J. Exp. Bot.*, 31, 483-488, (1980).

Baydar, G. N., "Asmada (*Vitis* spp.) yapraklardan adventif sürgün oluşumu üzerine bir araştırma", *Türk J. Biol.*, TÜB TAK, 24, 645-656, (2000).

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

Benson, E. E., "Cryoconserving algal and plant diversity: Historical perspectives and future challenges", (eds: Fuller, B., Lane, N., Benson, E.E.), *Life in the Frozen State*, CRC Press, London, 299-328, (2004).

Benson, E. E., Johnston, J., Muthusamy, J., Harding, K., "Physical and engineering perspectives of *in vitro* plant cryopreservation", (eds: Dutta Gupta, S., Ibaraki, Y.), *Plant Tissue Culture Engineering*, Springer, the Netherlands, 441-473, (2005).

Benson, E. E., "Cryopreservation theory", (ed: Reed, B.M.), *Plant cryopreservation: a practical guide*, Springer, New York, 15632, (2008a).

Crow, J. F., Kermicle, J., "Oliver Nelson and Quality Protein Maize", *Genetics*, 160, 8196821, (2002).

Çoban, H. Küey, E., "Manisa'da (Yuntda) yeti tirilen üzüm çe itlerinin ampelografik özelliklerinin belirlenmesi üzerine ara tırmalar", *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 43(2), 41-52, (2006).

Da , S. S., Aykaç, V. T., Gündüz, A., Kantarc., M., i man, N., "Türkiye'de Tarım laçlar, Endüstrisi ve Gelece iö", *Türkiye Ziraat Mühendisli i V. Teknik Kongresi*, (2cilt) 933, (2000).

Dereuddre, J., Hassen, M., Blandin, S., Kaminski, M., "Resistance of alginatecoated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen: 2. thermal analysis", *CryoLetters*, 12, 1356 148, (1991).

Dumet, D., Engelmann, F., Chabrilange, N., Duval, Y., "Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step", *Plant Cell Rep*, 12, 3526355, (1993).

Dutfield, G., "Intellectual property rights, trade and biodiversity: the case of seeds and plant varieties", *Intersessional Meeting on the Operations of the Convention*, Montreal, Canada, 5-8, (1999).

Ecevit, F., Kelen, M., "İsparta (Atabey)'de yeti tirilen üzüm çe itlerinin ampelografik özelliklerinin belirlenmesi üzerine bir ara tırma", *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, 23, 511-518, (1999).

Engelmann, F., "In vitro conservation of tropical plant germplasm- a review", *Kluwer Academic Publisher*, 57, 227-243, (1991).

Engelmann, F., "In vitro conservation methods", (eds: Ford-Lloyd, B.V., Newbury, H.J., Callow, J.A.), *Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and use*, Wallingford: CABI, UK, 119-162, (1997).

Engelmann, F., Takagi, H., "Cryopreservation of tropical plant germplasm ó current research progress and applications", Tsukuba: JIRCAS, Rome: IPGRI, (2000).

Engelmann, F., Engels, J. M. M., "Technology and strategies for ex situ conservation", (eds: V.R. Rao, A.H.D. Brown, M.T. Jackson), *Managing plant genetic diversity*, CAB International, Wallingford, Rome, 89-104, (2002).

Engelmann, F., "Plant cryopreservation: Progress and prospects", *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 40, 427-433, (2004).

Ergeneolu, F., Tangolar, S., *Ba c, l, k çin Pratik Bilgiler*. TÜB TAK, Türkiye Tarımsal Ara tırma Projesi Yayınlar., S 1, Adana. 2000.

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

Fahy, G. M., Takahashi, T., Meryman, H. T., "Practical aspects of ice-free cryopreservation", (eds: Smit-Sibinga, T.H., Das, P.C.), *Aspects of Ice-Free Cryopreservation*, Martinus-Nijhoff, Boston, Massachusetts, 1116122, (1986).

Fahy, G. M., "Biological effect of vitrification and devitrification", (eds: Pegg, D. E., Karow, A. M.), *The Biophysics of Organ Preservation*, Plenum Press, New York, 2676293, (1987).

Fahy, G. M., Wowk, B., Wu, J., Paynter, S., "Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity", *Cryobiology*, 48, 22635, (2004).

Fay, M. F., "Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods", *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 28, 164, (1992).

FAO, 2013., "Faostat database", (2013).

Fidan, Y., "Özel Ba c, l, kö", *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınlar*, Ankara, Yayın No: 930, 401, (1985).

Fleck, R. A., Pickup, R. W., Day, J. G., Benson, E. E., "Characterisation of cryoinjury in *Euglena gracilis* using flow-cytometry and cryomicroscopy", *Cryobiology*, 52, 261-268, (2006).

Fuller, B. J., "Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state", *CryoLetters*, 25, 375-388, (2004).

Harding, K., "The methylation status of DNA derived from potato plants recovered from slow growth", *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 37, 31-38, (1994).

Hirsh, A. G., Robert, J. W., Meryman, H. T., "A novel method of natural cryoprotection: Intracellular glass formation in deeply frozen *Populus*", *Plant Physiol*, 79, 41656, (1985).

Hirsh, A. G., "Vitrification in plants as a natural form of cryoprotection", *Cryobiology*, 24, 214-228, (1987).

Hong, T. D., Linington, S., Ellis, R. H., "Seed storage behavior: a compendium", *Handbooks for genebanks*, 4, Rome: IPGRI, 101, (1996).

Jitsuyama, Y., Suzuki, T., Harada, T., Fujikawa, S., "Ultrastructural study on mechanism of increased freezing tolerance due to extracellular glucose in cabbage cells", *Cryo-Lett*, 18, 33644, (1997).

Kara, Z., "Tokat Yöresinde Yeti tirilen Üzüm Çe itlerinin Ampelografik Özelliklerinin Belirlenmesi Üzerinde Ara t,rmalarö, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dal.,* Ankara, 318, (1990).

Kartha, K. K., Engelmann, F., "Cryopreservation and germplasm storageö, (eds: Vasil, I. K., Thorpe, T. A.), *Plant cell and tissue culture*. Dordrecht: Kluwer, 1956230, (1994).

Kaviani, B., "Conservation of plant genetic resorces by cryopreservationö, *Australian Journal Of Crop*, 5(6), 778-800, (2011).

King, M.W., Roberts, E. H., "Maintenance of recalcitrant seeds in storageö, (eds: Chin, H.F., Roberts, E.H.), *Recalcitrant crop seeds*, Tropical Press SDN, BDH, Kuala Lumpur, 53-89, (1980).

Kumar, A., "Somaclonal variation in potatoö, (eds: J.E. Bradshaw and G.R. MacKay), *Potato genetics, CAB International*, Wallingford, UK, 197-212, (1994).

Lambardi, M., Fabbri, A., Caccavale, A., "Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of *in vitro* grown shoot tipsö, *Plant Cell Rep*, 19, 2136218, (2000).

Li, D. Z., Pritchard H. W., "The science and economics of ex situ plant conservationö, *Trends in plant sicience*, 614-621, (2009).

Lovelock, J. E., "The mechanism of the cryoprotective effect of glycerol against haemolysis by freezing and thawingö, *Biochem Biophys Acta*, 11, 286 36, (1953).

Matsumoto, T., Sakai, A., Yamada, K., "Cryopreservation of in vitro grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regenerationö, *Plant Cell Rep*, 13, 4426446, (1994).

Matsumoto, T., Sakai, A., "Cryopreservation of axillary shoot tips of *in vitro*-grown grape (*Vitis*) by a two-step vitrification protocolö, *Euphytica*, 131, 299-304, (2003).

- Mazur, P., "Freezing of living cells: mechanisms and applications", *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 247, 1256-142, (1984).
- Mazur, P., "Principles of cryobiology", (eds: Fuller, B., Lane, N., Benson, E.E.), *Life in the Frozen State*, CRC Press, London, 366, (2004).
- Meryman, H.T., Williams, R.J., "Mechanisms of freezing injury and natural tolerance and the principles of artificial cryoprotection", (eds: Withers, L.A., Williams, J.T.), *Crop Genetic Resources, The Conservation of Difficult Material. International Union of Biological Sciences, International Board for Plant Genetic Resources, International Genetic Federation, Series B42*, Brie-Comte-Robert Printers, Paris, France, 5638, (1980).
- Meryman, H.T., Williams, R.J., "Basic principles of freezing injury to plant cells: Natural tolerance and approaches to cryopreservation", (ed: Kartha, K.K.), *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 146-147, (1985).
- Mix-Wagner, G., Conner, A. J., Cross, R. J., "Survival and recovery of asparagus shoot tips after cryopreservation using the droplet method", *NZ J. Crop Hort. Sci.*, 28, 283-287, (2000).
- Murashige, T., Skoog, F., "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures", *Plant Physiol.*, 15, 473-497, (1962).
- Myers, N. *The sinking ark: a new look at the problem of disappearing species*, Oxford, (1979).
- Niino, T., Sakai, A., Yakuwa, H., Nojiri, K., "Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification", *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 28, 261-266, (1992^a)
- Nishizawa, S., Sakai, A., Amano, Y., Matsuzawa, T., "Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L. Osb.) embryogenic cells and subsequent plant regeneration by a simple freezing method", *CryoLetters*, 13, 379-388, (1992).
- Oraman, M. N., "Balk Tekni i II", *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, Ankara, Yayın No: 470, 402, (1972).
- Panis, B., Strosse, H., Van den Henda, S., Swennen, R., "Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristem cultures", *CryoLetters*, 23, 375-384, (2002).
- Paunescu, A., "Biotechnology for Endangered Plant Conservation: A Critical Overview", *Romanian Biotechnological Letters*, 14(1), 4095-4103, (2009).

- Pennycooke, J. C. Towill, L. E., "Cryopreservation of shoot tips *in vitro* plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification", *Plant Cell Rep*, 19, 733-737, (2000).
- Plessis, P., Leddet, C., Dereuddre, J., "Resistance to dehydration and to freezing in liquid nitrogen of alginate coated shoot tips of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay)", *C. R. Acad. Sci. Paris. Serie III*, 313, 373-380, (1991).
- Plessis, P., Leddet, C., Collas, A., Dereuddre, J., "Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay shoot tips by encapsulation-dehydration: effect of pretreatment, cooling and postculture conditions", *CryoLetters*, 14, 309-320, (1993).
- Polge, C., Smith, A. U., Parkes, A. S., "Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures", *Nature*, 164, 666, (1949).
- Rajasekaran, K., Mullins, M. G., "Organogenesis in internode explants of grapevines", *Vitis*, 20, 218-227, (1981).
- Rao, N. K., "Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology", *African J Biotech*, 3(2), 136-145, (2004).
- Reed, B. M., "Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants", *CryoLetters*, 22, 97-104, (2001).
- Sakai, A., "Survival of plant tissue at super-low temperatures", *Low Temp Sci Ser B*, 14, 17-23, (1956).
- Sakai, A., "Survival of a twig of woody plants at -196°C ", *Nature*, 185, 393-394, (1960).
- Sakai, A., Kobayashi, S., Oiyama, I., "Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification", *Plant Cell Rep*, 9, 306-33, (1990).
- Sakai, A., Matsumoto, T., Hirai, D., Niino, T., "Newly developed encapsulation-dehydration protocol for plant cryopreservation", *CryoLetters* 21, 53-62, (2000).
- Sakai, A., Matsumoto, T., Hirai, D., Charoensub, R., "Survival of tropical apices cooled to -196°C by vitrification", (eds: Li, P. H., Palva, E. T.), *Plant cold hardiness, gene regulation and genetic engineering*, New York: Kluwer Academic, Plenum Publishers, 109-119, (2002).
- Sakai, A., "Plant cryopreservation", (eds: Fuller, B., Lane, N., Benson, E. E.), *Life in the Frozen State*, CRC Press, London, New York, 329-345, (2004).

Schafer-Menuhr, A., "Refinement of cryopreservation techniques for potato", *International Plant Resources Institute*, Final Report for the period 1, Rome: IPGRI, (1996).

Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., Lelebici, E., *Tohumlu Bitkiler Sistematik Ders Kitabı*, 116, İzmir: Ege Üniv. Fen Fak., 396, (1995).

Shikhamany, S.D., "Horticultural Genetic Resources: Role of *ex situ* conservation", *ICAR short course on in vitro conservation and cryopreservation new options to conserve horticultural genetic resources*, Bangalore, India, 6-15, (2006).

Sofi, P. A., Wani S. A., Rather, A. G., Wani, S. H., "Review article: Quality protein maize (QPM): Genetic manipulation for the nutritional fortification of maize", *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 1(6), 244-253, (2009).

Stamp, J. A., Colby, S. M., Meredith, C. P., "Direct shoot organogenesis and plant regeneration from leaves of grape (*Vitis* ssp.)", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 22, 127-133, (1990).

Statistical report on world vitiviniculture, "International Organization of Vine and Wine", (2012).

Şakiroğlu, M., "Bitki Genetik Kaynakları, Uluslararası Paylaşım Sorunu", *Seta Analiz*, (2010).

Tan, A., "Türkiye'de Bitkisel Çeşitlilik ve Bitki Genetik Kaynakları", *Anadolu J. of AARI*, 2, 50-64, (1992).

Tan, A., "Current Status of Plant Genetic Resources Conservation in Turkey", (eds: Zencirci, N., Kaya, Z., Anikster, Y. ve Adams, W.T), *The Proceedings of Int. Symposium on Situ Conservation of Plant Genetic Diversity*, 5-16, (1998).

Taylor, M. J., Song, Y. C., Brockbank, K. G. M., "Vitrification in tissue preservation: New developments", (eds: Fuller, B., Lane, N., Benson, E.E.), *Life in the Frozen State*, CRC Press, London, New York, 6036644, (2004).

Tao, D., Li, P. H., Carter, J. V., "Role of cell wall in freezing tolerance of cultured potato cells and their protoplasts", *Physiol Plant*, 58, 5276532, (1983).

Tao, D., Li, P. H., "Classification of plant cryoprotectants", *J. Theor. Biol.*, 123, 3056310, (1986).

Turner, S. R., Touchell, D. H., Dixon, K., Tan, B., "Cryopreservation of *Anigozanthos viridis* spp. *viridis* and related taxa from the south west of western Australia", *Aust. J. Botany.*, 48, 739-744, (2000).

Turner, S., Senaratna, T., Touchell, D., Bunn, E., Dixon, K., Tan, B., "Stereochemical arrangement of hydroxyl groups in sugar and polyalcohol molecules as an important factor in effective cryopreservation", *Plant Sci.*, 160, 489-497, (2001).

Thin, N. N., Takagi, H., Yashima, S., "Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of banana (*Musa* spp.) by vitrification method", *CryoLetters*, 20, 163-174, (1999).

Thin, N. N., Takagi, H., Sakai, A., "Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of some vegetatively propagated tropical monocots by vitrification". (Eds: Engelmann, F., Takagi, H.), *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*, JIRCAS, Tsukuba, Japan. 227-232, (2000).

TÜ K, 2008. "Türlerine Göre Üzüm Üretiminde Bölgenin Türkiye Üretimi Payı", (2008).

TÜ K, 2014. "Bitkisel Üretim İstatistikleri", (2014).

Uragami, A., Sakai, A., Magai, M., "Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*", *Plant Cell Rep*, 9, 328-331, (1990).

Venkata Subbaiah, K., Manjula, R., Lenin kumar, Y., Jaya Lakshmi, M., "Cryopreservation: an advanced technology for plant germplasm conservation", (Eds: Viswanath, B. Indravathi, G.), *New Horizons in Biotechnology*, Paramount Publishing House, India, 280-285, (2015).

Vietmeyer, N. D., "A drama in three long acts: the story behind the story of the development of quality-protein maize", *Diversity*, 16, 29-32, (2000).

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

Wang, Q. C., Tanne, E., Arav, A., Gafny, R., "Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of grapevine by encapsulation/dehydration", *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 63, 41-46, (2000).

Wang, Q., Gafny, R., Sahar, N., Sela, I., Mawassi, M., Tanne, E., Perl, A., "Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell

suspensions by encapsulation-dehydration and subsequent plant regeneration, *Pla. Sci*, 162, 551-558, (2002).

Withers, L. A., Benson, E. E., Martin, M., "Cooling rate/culture medium interactions in the survival and structural stability of cryopreserved shoot-tips of *Brassica napus*", *CryoLetters*, 9, 114-119, (1988).

Withers, L. A., Engelmann, F., "In vitro conservation of plant genetic resources", (ed: A. Altman), *Biotechnology in agriculture*, NY, 57-88, (1997).

Zhao, Y., Wu, Y., Engelmann, F., Zhou, M., Chen, S., "Cryopreservation of apple in vitro shoot tips by the droplet freezing method", *CryoLetters*, 20, 109-112, (1999).

7. ÖZGEÇM

Ad, Soyad, : Fatma KAYHAN

Do um Yeri ve Tarihi : Eski ehir, 06.12.1975

Lisans Üniversite : Ege Üniversitesi

Elektronik posta : fckayhan@gmail.com

İletişim Adresi :

Yayın Listesi :

- Celebi Toprak, F., Kayhan, F., *İn vitro* propagation and preservation of important grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) and rootstocks, Eurobiotech 2012 Agriculture Symposium Kayseri, *Turkey Journal of Biotechnology*, 161, 46, (2012).
- Celebi Toprak, F., Kayhan, F., Alan, A.R., *İn vitro* propagation and cryopreservation of important grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) and rootstocks, *ISSMET 2014/2 International symposium of secondary metabolites: chemistry, biology and biotechnology*, Russian State Agrarian University of Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, 19-23 May 2014. (Sözlü sunum)
- Celebi Toprak, F., Kayhan, F. ve Alan, A.R., *İTürkiye'de ticari önemi yüksek baz, üzüm (Vitis) çeşitleri ve anaçlarında kriyoprezervasyon tekniğinin uygulanması, I. Ulusal Bitki Fizyolojisi Sempozyumu*, 1-4 Eylül 2015. (Poster olarak sunuldu)