

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2016-YL-010**

**ENKAPSULASYON İŞLEMİ YOLUYLA BAZI
KARAYOSUNU TÜRLERİNİN
DİASPORLARININ SAKLANMASI**

Özge MUSLU

**Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Adnan ERDAĞ**

AYDIN-2016

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN**

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Özge Muslu tarafından hazırlanan ENKAPSULASYON İŞLEMİ YOLUYLA BAZI KARAYOSUNU TÜRLEİNİN DİASPORLARININ SAKLANMASI başlıklı tez,/...../2016 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :			
Üye :			
Üye :			

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla(tarih) tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Aydın ÜNAY

Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

....../....../2016

Özge MUSLU

ÖZET

ENKAPSULASYON İŞLEMİ YOLUYLA BAZI KARAYOSUNU TÜRLERİNİN DİASPORLARININ SAKLANMASI

Özge MUSLU

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adnan ERDAĞ

2016, 57 sayfa

Enkapsülasyon yöntemi çoğalma etkinliğine sahip bitkisel yapıların alginat ile kaplanarak bir tür yapay tohum/ diaspor elde edilmesi işlemidir. Bu çalışma da çeşitli biryofit türlerine ait vejetatif kısımlar veya sporlar %4'lük sodyum alginat ile kaplanmış ve CaCl_2 çözeltisinde sertleştirildikten sonra farklı koşullar altında çimlenmeleri gözlenmiştir. Denemelerde, *Conocephalum conicum* (tallus parçaları), *Marchantia polymorpha* (gemma), *Sphagnum centrale*, *Sphagnum capillifolium*, *Bryum dichotomum* (gametofit parçaları), *Timmiella barbuloidea*, *Ptreygoneurum ovatum*, *Encalypta vulgaris*, *Bryum capillare*, *Orthotrichum pumilum*, *Hypnum cupressiforme* (spor) türleri kullanılmış olup, bu türlere ait enkapsüle materyal distile su, nemli toprak, meşe talaşı ortamlarında kurutma, dondurma ve oda sıcaklığı koşullarında (nem korunarak) test edilmiştir (dondurma ve kurutma uygulamaları sadece *Bryum capillare* ve *Hypnum cupressiforme* türlerinde uygulanmıştır). Denemeler sonunda kullanılan iki ciğerotu türü olan *Conocephalum conicum*, *Marchantia polymorpha* ve çalışılan kara yosunu türlerinden üçü *Bryum capillare*, *Hypnum cupressiforme*, *Timmiella barbuloidea* yüksek çimlenme başarıları göstermiştir. Araştırmanın tüm basamakları minimum teknik ekipman kullanımına özen gösterilerek gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem ile başarılı sonuç alınan türlerin çok düşük teknik alt yapı kullanılarak ve çok düşük harcamayla çoğaltılabileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Biryofit, *Ex situ* Koruma, Enkapsülasyon, Propagül, Alginat, CaCl_2

ABSTRACT

PRESERVATION OF DIASPORES OF SOME MOSS SPECIES VIA ENCAPSULATION

Özge Muslu

M. Sc. Thesis, Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. Adnan ERDAĞ

2016, 57 pages

Encapsulation is a method to obtain synthetic seeds/diaspores by coating plant propagules with alginate compound. In this study, spores or vegetative parts of some bryophyte species has been coated by sodium alginate and then hardened in CaCl_2 solution to observe germination capacity of the coated bryophyte propagules under different conditions. In experiments, *Conocephalum conicum* (thallus fragments), *Marchantia polymorpha* (gemmae), *Sphagnum centrale*, *Sphagnum capillifolium*, *Bryum dichotomum* (gametophyte fragments), *Timmiella barbuloidea*, *Ptreygoneurum ovatum*, *Encalypta vulgaris*, *Bryum capillare*, *Orthotrichum pumilum*, *Hypnum cupressiforme* (spores) were the materials. Propagules of these species were tested for germination in environments such as humid soil, distilled water and oak sawdust. Desiccation and freezing applications were used for *Bryum capillare* and *Hypnum cupressiforme*, remaining species were kept at room temperature conditions by preserving humidity of environment. Two liverworts (*Conocephalum conicum*, *Marchantia polymorpha*) and three moss species (*Bryum capillare*, *Hypnum cupressiforme* and *Timmiella barbuloidea*) showed a high germination response. In all steps of the research, using of sophisticated technics and equipments were avoided. It is seen that the method may serve as a useful tool to obtain viable propagules by using non sophisticated equipments and then minimum expense.

Key Words: Bryophyta, Ex situ Conservation, Encapsulation, Propagules, Alginate, CaCl_2

ÖNSÖZ

Çalışmalarım süresince destek ve ilgilerini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Adnan ERDAĞ'a, yorum ve yönlendirmeleri ile çalışmamı kolaylaştıran Sayın Doç. Dr. Bengi ERDAĞ'a, yüksek lisans süresince desteklerini daima hissettiğim Sayın Doç. Dr. Mesut Kırmacı, Doç. Dr. Ali Özmen ve Doç. Dr. Hatice Özenoğlu Kiremit'e, laboratuvar süreçlerinde daima yardımcı olan Dr. Yelda Emek, Dr. M. Evrim Demir ve Arş. Gör. Rukiye Yavaşer'e teşekkürü borç bilirim. Ayrıca her türlü olanağını kullanmama izin veren Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne içten teşekkürlerimi sunarım.

Özge MUSLU

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	7
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1. Materyal	13
3.1.1. Conocephalum conicum	13
3.1.2. Marchantia polymorpha	14
3.1.3. Sphagnum centrale	14
3.1.4. Sphagnum capillifolium	15
3.1.5. Timmiella barbuloïdes	16
3.1.6. Pterygoneurum ovatum	16
3.1.7. Encalypta vulgaris	17
3.1.8. Bryum dichotomum	18
3.1.9. Bryum capillare	18
3.1.10. Orthotrichum pumilum.....	19
3.1.11. Hypnum cupressiforme	20
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Bitkilerin Toplanması ve İzolasyonu	20

3.2.2. Enkapsülasyon Uygulaması ve Enkapsülasyon Sonrası Deneme Ortamları	21
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	26
4.1. Conocephalum conicum	26
4.2. Marchantia polymorpha.....	28
4.3. Sphagnum capillifolium ve S. centrale	30
4.4. Bryum dichotomum.....	31
4.5. Timmiella barbuloidea.....	31
4.6. Pterygoneurum ovatum	33
4.7. Encalypta vulgaris	34
4.8. Orthotrichum pumilum	35
4.9. Bryum capillare	36
4.10. Hypnum cupressiforme	44
5.SONUÇ	49
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	57

SİMGELER DİZİNİ

CaCl_2	Kalsiyum Klorür
Ca^{+2}	Kalsiyum iyonu
Dk	Dakika
g	Gram
H_2O	Su
mg	Miligram
ml	Mililitre
M	Molar
mM	Milimol
MS besi ortamı	Muroshige and Skoog besi ortamı
Na^{+}	Sodyum iyonu
$^{\circ}\text{C}$	Derece celsius

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. <i>C. conicum</i> (Foto: Mesut KIRMACI).....	13
Şekil 3.2. <i>M. polymorpha</i> (Foto: Adnan ERDAĞ)	14
Şekil 3.3 <i>S. centrale</i> (Foto: Mesut KIRMACI)	15
Şekil 3.4. <i>S. capillifolium</i> (Foto: Mesut KIRMACI)	15
Şekil 3.5. <i>T. barbuloides</i> (Foto: Mesut KIRMACI)	16
Şekil 3.6. <i>P. ovatum</i> (Foto: Adnan ERDAĞ).....	17
Şekil 3.7. <i>E. vulgaris</i> (Foto: Adnan ERDAĞ).....	17
Şekil 3.8. <i>B. dichotomum</i> (Foto: Adnan ERDAĞ).....	18
Şekil 3.9. <i>B. capillare</i> (Foto: Adnan ERDAĞ)	19
Şekil 3.10. <i>O. pumilum</i> (Foto: Adnan ERDAĞ).....	19
Şekil 3.11. <i>H. cupressiforme</i> (Foto: Adnan ERDAĞ).....	20
Şekil 3.12. Enkapsülasyon işlemi genel şeması	22
Şekil 4.1. <i>C. conicum</i> , Sürgün gelişiminin devamı (17.gün).....	26
Şekil 4.2. <i>C. conicum</i> , gelişen sürgünler (1. ay).....	27
Şekil 4.3. <i>C. conicum</i> , gelişen sürgünler (3. ay).....	27
Şekil 4.4. <i>C. conicum</i> , 5. ay olgunlaşma sürecine doğru birey (oklar rizoidleri göstermektedir.)	28
Şekil 4.5.a. <i>M. polymorpha</i> , <i>gemma</i> ların <i>kalsiyum alginat</i> ile kaplanmış hali b. <i>gemma</i> larda 2 ay sonraki gelişme durumu	29
Şekil 4.6. <i>M. polymorpha</i> , 3.ay itibarıyla gelişme durumu	29
Şekil 4.7. <i>S. centrale</i> , enkapsüle gametofit parçaları	30
Şekil 4.8. <i>S. capillifolium</i> , enkapsüle gametofit parçaları	31
Şekil 4.9. <i>T. barbuloides</i> , a. Şişmiş ve şişmemiş sporlar a. germ tübü oluşumu ...	32
Şekil 4.10. <i>T. barbuloides</i> , protonemal ipliklerin oluşumu	32
Şekil 4.11. <i>P. ovatum</i> , 1 ay sonra toprakta	34

Şekil 4.12. <i>E. vulgaris</i> , 2 ay sonra toprakta	35
Şekil 4.13. <i>O. pumilum</i> , alginat ile kaplanmış boncukların görünümü	36
Şekil 4.14. <i>B. capillare</i> kalsiyum alginat ile kaplanmış sporlar	37
Şekil 4.15. <i>B. capillare</i> , şişme ve çimlenme (2.ay)	37
Şekil 4.16. <i>B. capillare</i> protonemal gelişim ve dışa büyüyen kaulonemal iplikler, 4. ay	38
Şekil 4.17. <i>B. capillare</i> , ileri protonemal gelişim 5.ay	38
Şekil 4.18. 6. ayda protonemal ve kaulonemal iplikler	39
Şekil. 4.19. Kurutulma işlemi sonunda kalsiyum alginat kaplamanın durumu	39
Şekil 4.20. <i>B. capillare</i> , kurutma sonrası nemlendirme ve sporlar	40
Şekil 4.21. Nemlendirmeden 1 ay sonraki şişme durumu	40
Şekil 4.22. 2.Ay sonunda sporların çimlenmeye başlaması (oklar çimlenen sporların bazılarını göstermektedir.)	41
Şekil 4.23. 3. ay sonunda çimlenme sürecinde gelişme durumu	41
Şekil 4.24. Dondurma sonrası yeniden nemlendirme ve boncukların durumu (Spor yığınları merkezin sol kısmında görülmektedir)	42
Şekil 4.25. 1. ay itibarıyla protonemal ana ipliğin oluşumu	43
Şekil 4.26. Kaulonemal evrenin erken safhası	43
Şekil 4.27. Enkapsüle edilmiş sporlar (oklar boncuk içinde dağınık halde bulunan sporların bazılarını belirtmektedir.)	44
Şekil 4.28. <i>H. cupressiforme</i> , 2 ay sonraki protonemal gelişim	45
Şekil 4.29.a. <i>H. cupressiforme</i> , ileri derecede protonemal gelişim, b. Dış yüzeye gelişim gösteren protonemal iplikler, 4.ay	46
Şekil 4.30. <i>H. cupressiforme</i> , dışarı uzanan protonemal iplikler, 5.ay	47
Şekil 4.31. <i>H. cupressiforme</i> , kaulonemal gelişim detay 6.ay	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan biryofit türleri, kullanılan propagül ve deneme ortamları	24
---	----



1. GİRİŞ

Doğal ortamların endüstrileşme ve buna paralel gelişen şehirleşme olgusuyla beraber artan nüfusun taleplerinin karşılanabilmesi amacıyla yoğun biçimde istismarı sonucu, birçok canlı türünün yaşam alanları daralmış, yayılış özellikleri değişmiştir. Artan nüfusun doğal türler üzerindeki değiştirici etkisi mekan– yayılış değişikliğiyle sınırlı kalmamakta, ekonomik veya başka alanda değer sahibi olanların aşırı tüketimiyle yok olma olgusunu da gündeme getirmektedir. Doğal yaşam ve onun unsurlarının karşılaştığı her sorun dolaysız olarak insan kültürünün ve varlığının sorunudur ve bu sorunlar giderilmedikçe insan varlığının en azından bu haliyle sürdürülebilmesine olanak yoktur. Ortada duran bu katı gerçekliğin bilincinde olarak, bilim insanları sanayi devriminden bu yana her türlü aşırılık terimini dahi gölgede bırakacak denli tükettiğimiz doğal yaşamı hiç olmazsa bu haliyle korumak amacıyla çeşitli yöntem ve yaklaşım biçimleri geliştirmeye çalışmaktadırlar. Güçlü bir şekilde vurgulamak gerekir ki, doğal yaşamı korumak, onun unsurlarının (türlerin) taşıdığı biyolojik bilgiyi canlı tutabilmek, aslında insanoğlunun kendi var oluş çabasından öte bir şey değildir. Hatırlatmak gerekirse, günümüz ekolojik sorunlarının gezegenimizi getirdiği nokta 6. büyük yok oluş olarak tanımlanmaktadır ve insanoğlu da kısmen veya tamamen bu büyük yok oluşun bir parçası olacaktır.

Biyolojik varlıkların ya da daha net bir tanımla türlerin korunması temelde iki ana yöntemle gerçekleştirilir: 1. *In situ* koruma, 2. *Ex situ* koruma (Edward ve ark, 2004) İlk koruma yöntemi, türlerin bulundukları ortamda korunmaları girişimidir ve türün yaşadığı ortamın tüm komponentlerinin de doğal haliyle korunmasını gerektirir. İkinci temel yaklaşım da ise, tür kendi doğal ortamı dışında yetiştirilerek çoğaltılır ve korunma işlemi yerine getirilmeye çalışılır. Bu yöntem bazen türün doğal yaşam alanının yok olması veya doğal koşullarda üreme - çoğalma başarısının düşmesi (yabancı türlerle rekabet, kirlilik, habitat degradasyonu vb. faktörler) durumunda zorunlu olarak kullanılır veya doğal ortamlarda popülasyon büyüklüğü azalmış ise popülasyonu genişletmek üzere başvurulur. Bunun dışında nedenler de sayılabilir ki, bunlardan ilki türün ekonomik özellikleri nedeniyle doğal ortamında aşırı tüketilmesidir. Söz konusu tüketimin yaygınlaşması ve talebin artışı bu türe olan ihtiyacı daha da artırırken bu doğal kaynağın sınırları aşılmış olur ve yapay olarak bu kaynağın sürdürülebilir hale getirilmesi gerekir. Bu amaçla bahse konu tür, doğal ortamı dışındaki

alanlarda da üretilerek hem duyulan ihtiyacın karşılanması hem de doğal varlığın korunmasına çalışılır.

Ex situ koruma yöntemlerinde bitkiler için geleneksel tarım yöntemleri de kullanılır. Ancak bazı durumlarda bu yöntemin tür özelliklerinin bir sonucu olarak kullanılmasına olanak yoktur ya da az miktarda anaç ile neredeyse sınırsız miktarda nesil alınmak istenir. Böylesi durumlarda biyoteknolojik alternatiflere başvurulur. Biyoteknolojik alternatifler arasında en bilineni bitki doku kültürü teknikleridir. Doku kültüründe bir anaçtan alınan hücre veya hücreler-dokular steril ortamlarda geliştirilerek, çok sayıda yeni bitkicik elde edilir ve bu bitkiciklerin bazıları anaç olarak seçilerek gelecek nesillerin logaritmik olarak çoğaltılması sağlanır. Ancak kullanılan anaç sayısı bir sonraki neslin genetik çeşitliliğinin kaynağı olduğundan ve kural olarak hiçbir zaman doğadaki kadar geniş bir havuz anaç olarak kullanılamayacağından bu yöntemin de sıkıntıya düştüğü genetik sorunları vardır.

Günümüzde, ileride doku kültürü, geleneksel tarım yöntemleri ve özel bitki yetiştirme teknikleri vb. yollarla yetiştirilmek üzere bir türün çoğaltılabilir kısımlarının (doku parçası, spor, diaspor vb.) biyolojik olarak neredeyse tamamen inaktif halde saklanması yoluna gidilmektedir. Bunun temel nedenlerinden biri aktif halde kültür ortamlarında materyalin canlı tutulmasının gerektirdiği yoğun emek ve yüksek maliyettir. İnaktif saklamaya alınan büyük miktarlarda genetik materyal (fidicik, spor vb.) görece çok daha düşük maliyetle ve daha zengin ana kaynak yaratarak depolama yoluyla saklanabilmektedir. Aşırı düşük sıcaklıklarda saklama (kriyopreservasyon) bu amaçla kullanılmakta olup, bu konuda İngiltere Kraliyet Botanik Bahçesi gibi gelişmiş araştırma merkezlerinde uygulama ve araştırmalar sürmektedir (Rowntree ve Ramsay 2009). Bahsedilen tarzda genetik materyalin saklanabilmesi için kullanılan bitki parçasının dış etkenlerden kısmen yalıtılması ve canlılığını kaybetmemesi için yer kaplamayan, fakat makul bir paketleme işlevini sağlayacak ve biyolojik olarak uyumlu bir materyalle sarılması gerekir. “Enkapsülasyon” adı verilen bu işlem, en yalın tanımıyla bitki diasporunun uygun bir kaplama materyali ile kaplanması yöntemidir. Somatik embriyoların kapsüllenerek sentetik tohum elde edilebileceği ve doğal tohum gibi kullanılabilmesi ilk kez Murashige (1977) tarafından önerilmiş olup, Kitto ve Janick (1982)’in çalışmaları sonucu enkapsülasyon başarı ile uygulanmıştır. Bu yöntemle kaplanan çoğaltılabilir bitki parçası ya hemen çoğaltma için kullanılabilir

ki bu durumda bir tür “yapay tohum / spor / gemma” olarak iş görür veya saklamaya alınır ve ileride kullanılacak “germ plazm” olarak depolanır.

Enkapsülasyon, kullanılacak olan bitki diasporunun canlılığını yitirmeden uzun bir süre boyunca saklanabilmesine, korunabilmesine ve kullanılan bu bitki kısmından tam bir bitki elde edilebilmesine olanak sağlamaktadır. Redenbaugh ve ark. (1986), yaptıkları çalışmada kullanılan sodyum alginat çözeltisinin iyon değişim reaksiyonları sonucu kalsiyum tuzları ile birleşip sertleşerek kalsiyum alginat jeli haline dönüştüğünü ortaya koymuştur. Genel olarak agar, agaroz, alginat, karboksimetilselüloz, karragen, etilselüloz, gelrit, guar gum, nitro selüloz, polyakrilamid, sodyum pektat ve polyox kullanılmaktadır (Datta ve ark. 2001, Saiprasad 2001). Kaplama materyalinin kullanılacak bitki eksplantı için toksik etki göstermemesi, dış etkilere karşı koruyucu olması fakat çimlenmeyi ve bitki gelişimini engellemeyecek özellikte olması gerektiği görülmüştür (Kitto ve Janick 1985b, Kim ve Janick 1989). Yapılan çalışmalarda su tutma kapasitesi, kolay elde edilebilirliği, hızlı jelleşme ve boncuk dayanıklılığı gibi avantajları nedeniyle çoğunlukla alginat kullanılmaktadır.

Karayosunları spor canlılığının uzun süre devam etmesi, gemma gibi vegetatif çoğalma olanağı sağlayan yapılar üretebilmeleri ve yüksek regenerasyon yetenekleri nedeniyle enkapsüle edilmiş kısımlarından etkin bir biçimde çoğaltılabilme imkanı vermektedirler. Yüksek bitkilerde kopan – koparılan doku kısımlarının doğal koşullar altında yeni bir birey oluşturmaları oldukça zor olmasına rağmen, fragmentasyon adı verilen bu süreç karayosunlarının rutin çoğalma olanaklarından biri olmaktadır; hatta birçok karayosunu vejetatif yolla çoğaldığından, çoğalma süreçleri arasında fragmentasyon önemli bir yer tutmaktadır. Bu özellikleri dikkate alınarak karayosunlarının enkapsüle edilip dondurarak saklanması konusunda verimli bir çalışma alanı ortaya çıkmıştır. İlk kez Longton (1981) tarafından dondurulmayı takiben bir karayosunu türünün canlılığının devamı gözlemlendikten sonra bu alandaki güncel çalışmalar için bilimsel temel ortaya konulmuştur. Aslında doğal koşullar altında da bu olayın gerçekleşebileceğini öngörmek olasıdır. Sözcülimi, tundra zonunda vejetasyonun likenlerle birlikte temel komponentlerinden birini oluşturan karayosunları kış ayları boyunca -70 °C ‘ e değin inebilen sıcaklıklara maruz kalmakta ve çok kısa olan büyüme dönemi içinde tekrar canlılığını geri kazanmakta ve de büyümesini sürdürmektedir(Longton 1988).Ancak daha önceden de bilinen bir şey olmasına rağmen dondurarak saklama tekniğinin uygulanması için enkapsülasyon gibi hem

izole edebilen hem de normal koşullara döndüğünde içindeki canlı materyalin gelişmesine olanak veren koruyucu paketçiklerin geliştirilmesi gerekmiştir.

Doğada tehdit altında olan türlerin korunmasında etkin bir biçimde kullanılmaya başlayan bu yöntem aynı zamanda bir takım ticari olanakları da barındırmaktadır. Günümüz Dünyası daralan ve ulaşılması herkes için kolay olmayan doğal ortamların minyatürlerini botanik bahçeleri gibi kurumlar aracılığıyla şehirlielerin ayağına getirmekte ve hizmet sunmaktadır. Yeterince gelişmiş her botanik bahçesinde karayosunu kısmı bulunmakta olup, bu uygulama iklimsel olarak uygun bölgelerde özel konutların bahçelerine kadar uzanmaktadır. Bu gün internet ortamında “moss garden” anahtar sözcüğü kullanılarak çok sayıda “özel yosun bahçelerine “ ulaşmak olasıdır. Karayosunlarının böyle bahçelerde yetiştirilmesine ilişkin özel reçeteler veya uygulama biçimleri de gösterilmektedir (örnek olarak bkz.:www.mossandstonegardens.com). Bunun dışında geleneksel Japon sanatlarının bazılarının (bonkei, saikei) modern şehir evlerinde bir kase ya da kap içinde karayosunları ve diğer bitkilerle düzenlenmiş manzara sepetleri kullanımı da yaygınlaşma eğilimindedir. Bir başka uygulama alanı ise “green roof” veya “green wall” isimleriyle yaygınlaşan bitki bezeli duvar ya da çatılardır ki, bu uygulamanın sadece çiçekli bitkilerle yapılmış olanlarına büyük şehirlerimizde (İstanbul, Denizli vd.) rastlanmaya başlanmıştır. Her ne kadar biraz daha zor ve iklimsel uygunluk gerektirse de karayosunu temelli uygulamalar diğerlerinden çok daha cazip ve ihtişamlıdır. Son yıllarda belediyelerimizin çeşitli iç ve dış mekanlardaki doğal peyzaj unsurlarının kullanımı konusundaki artan eğilimi bize bu amaçla kullanılabilecek çoğaltma alternatifleri geliştirme yükümlülüğünü vermektedir. Ülkemizde böyle bir uygulama örneği henüz görülmemekle birlikte giderek renklenen günlük yaşama çok uzak olmayan bir tarihte gireceğini düşünmek de mantıksız değildir. Elbette, bir karayosunu bahçesi veya karayosunu duvarı (moss wall) yapmak için doğadan alınan karayosunu örtüsünü parçalayıp uygun koşullar altındaki substratla buluşturursanız bir süre sonra bir yosun bahçesinin veya duvarının gelişimini izleyebilirsiniz. Buradaki kritik nokta uygun mekana uygun yosun türlerinin istenilen miktarda ve kompozisyonda yerleştirilmesinin uzmanlık gerektiren (en azından tür tanılanması açısından) bir uğraş olmasıdır. Yaşanan pratikler göstermiştir ki, böyle durumlarda talep edilen doğal kaynağın (karayosunu örtüsünün) doğadan sökülümünün uzmanlığı ve doğaya karşı hassasiyeti az olan veya hiç olmayan, kazanç amaçlı şahıs veya kurumlarca yapılmasının geri dönüşü neredeyse imkansız bir takım ekolojik sorunlar

oluşturmasıdır. 2006 yılında Erdağ ve Kırmacı tarafından gerçekleştirilen ve Türkiye’de karayosunu hasatı üzerine hazırlanan bir TÜBİTAK raporu çalışmaları esnasında kendilerine ruhsatla karayosunu toplama izni verilmiş köylülerin gerekmediği kadar çok miktarda karayosunu örtüsünü kazıyıp, depoladıkları gözlemlenmiştir. Yine bu köylülerin toplama yaptıkları türlerin büyük kısmının aslında talep eden şirketin çeşitli süs eşyaları yapımı için arzuladıkları türler olmayışı da doğal ortamın hiç gerekmediği halde tahribatına örnek oluşturmaktadır. Durum bu halde iken, ileride oluşacak peyzaj amaçlı karayosunu hasatı taleplerinin sürdürülebilir biçimde devamının sağlanması için;

- Oluşturulacak yosun örtüsünde kullanılacak türleri ayırt edebilen,
- Bu türlere ait diasporları kısıtlı miktarda doğal hasat ürünü anaç bitki kullanarak çoğaltabilen,
- Son kullanıcıya istediği miktar ve kompozisyonda karayosunu diasporu temin edebilen bir kurumsallaşmanın oluşturulması adına tüm bu süreçlerin,

ilk basamağı olan diasporların elde edilmesinin basit, düşük maliyetli ve biyolojik olarak etkin biçimde sağlanmasının yollarının geliştirilmesi gerekmektedir.

Üst düzey sterilizasyon kullanılarak yapılan işlemler ve bu yollarla elde edilen yapay tohum ya da germ plazm, bir türün korunmasında ve saklanmasında maliyet hesaplarının çoğu zaman yapılmadığı ya da görece daha az dikkate alındığı süreçlerdir. Zira burada önemli olan kritik derece tehdit altında olan bir canlı türünün elden gelen tüm olanaklarla yaşatılmaya çalışılmasıdır. Ancak, ticari olan bir uygulamada, maliyet (burada hem doğal ortama maliyet hem de finansal maliyet düşünülmelidir) sürecin en belirleyici noktasıdır. Öyleyse, düşük maliyetli ve kolay uygulanabilen, doğal ortama giderilebilir bir etki yapan çoğaltma yönteminin temellerin atılmasında yarar vardır. Talep edilecek ürün kolayca çoğaltılabilmeli, uzun süre düşük masraflı koşullar altında saklanabilmeli ve tüketiciye istediği/gerekli miktarlarda sunulabilmesiyle beraber kolayca tüketici tarafından uygulanabilmelidir.

Biryofit türlerinin korunmasında etkin bir biçimde kullanılmaya başlayan enkapsülasyon işleminin yukarıda belirtilen ihtiyaçlara yönelik olarak değerlendirilmesinin pratik sonuçlarını görebilmek amacıyla tezimizin konusu enkapsülasyon işlemi kullanılarak bazı karayosunlarının diasporlarının saklanması

olarak düşünölmüş ve araştırma sürecinde en düşük düzeyde laboratuvar imkanları ve ekipman kullanılarak, çok basit sterilizasyon işlemleri dışında sofistike ve pahalı aygıtlardan bağımsız süreçlerde bir kısım karayosunu türünün kalsiyum alginat ile enkapsüle edilmiş çeşitli kısımlarının enkapsülasyon sonrası maruz bırakıldıkları zorlu koşullardan sonraki rejenerasyon durumları incelenmiş ve olası engellerin belirlenmesine çalışılmıştır. Ancak çalışmanın özü itibariyle, uzun yıllara yayılacak uygulama ve gözlem serilerini gerektirmesi ve bir yüksek lisans öğreniminin yasal sınırlara sahip oluşu nedenleriyle, bitki türlerinin bahse konu işlemler serisinin ardından verdiği rejenerasyon tepkisini gözlemek sınır olarak belirlenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Çalışma konumuzla doğrudan ya da tür koruma çalışmaları açısından dolaylı ilişkileri olana yakın dönemde gerçekleştirilen bazı araştırmalar aşağıda sunulmuştur:

Murashige (1977) bahçecilik ve bitki gelişimi üzerine bitki hücre ve organ kültürü uygulamalarının etkilerini gözlemlenildiği çalışmasında ilk kez somatik embriyoların enkapsülasyonunu ele alınıp, bu yöntem ile elde edilen enkapsüle embriyonun doğal bir tohum gibi kullanılabileceğinden söz edilmiştir.

Kitto ve Janick (1982) Aseksüel embriyolarda yapay tohumelde edilebilmesi için kaplama materyali olarak Polyox kullanılmıştır. İlk kez bu çalışmada enkapsülasyon yöntemi uygulandığı görülmüştür.

Kitto ve Janick (1985a) havuç somatik embriyolarını %2,5 polyoksietilen (polyox) ile ilk kez başarılı bir şekilde enkapsüle etmişlerdir. Bu çalışmanın devamı olarak gerçekleştirilen başka bir çalışmada (1985b), stresin artırıldığı çimlenme ortamında çimlenme durumları gözlenmiştir. Başarılı bir şekilde kaplanan havuç embriyolarında kurutma işlemi sonrası çimlenme oranı düşük olmakla birlikte, enkapsülasyon işlemi ile kaplanan embriyoların hayatta kalma gücünün arttığı, kaplama materyalinin embriyo canlılığı üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Redenbaugh ve ark. (1988) hidrate edilerek ve kurutulmak üzere 2 ye ayrılan yapay tohum yöntemlerinden hidrate edilerek yani suyunu koruyarak elde edilen yapay tohum yöntemini kullanmışlardır. Suyunu koruyan yapay tohumlar; somatik embriyoların kalsiyum alginat gibi hidrojel ile ayrı ayrı enkapsüle edilmesi ile elde edilmiştir. Embriyolar sodyum alginat çözeltisi içerisine karıştırılmış ve kalsiyum klorür çözeltisi içerisine damlatılarak içerisinde somatik embriyoları barındıran kalsiyum alginat kapsülleri oluşturulmuştur. Yapılan çalışmada sodyum alginat çözeltisi ile kalsiyum tuzları, iyon değişim reaksiyonları sonucu yer değiştirerek kalsiyum alginat jeli haline dönüştüğü ortaya konulmuştur.

Longton (1988) soğuk iklimlerin hakim olduğu karasal habitatlarda yayılış gösteren karayosunu ve likenler üzerine hazırladığı kitabında bu habitatlar üzerinde yayılış gösteren türlerin geliştirdiği adaptasyonlar, yaşam formları ve stratejileri anlatılmaktadır.

Kim ve Janick (1989) tarafından yapılan çalışmada kurutulmuş kereviz somatik embriyolarının polyox ile enkapsüle edilmiş ve ABA hormonu ile muamele edilmiştir. Polyox enkapsülasyonu sonucu sağlanan nem artışının somatik embriyolardaki hayatta kalma oranını artırdığı gözlenmiştir.

Redenbaugh ve ark (1991) yapay tohumların potansiyelini göz önünde bulundurarak bu tohumların gelişimi üzerine bir çalışma geliştirmiştir. Düşük maliyet ve yüksek genetik homojenliği, hatta genotip dengesizliği ve düşük tohum verimliği gibi sorunların giderilebilirliği nedeniyle yapay tohum üretiminin uygulanabilir olduğu ileri sürülmüştür. Bahçecilik, tarla ve orman bitkilerinin vejetatif çoğalma listeleri nedeniyle iyi bir somatik embriyogenez sistemi mevcuttur. Bu sistem içerisinde sıvı azota daldırma (kriyopreservasyon), kurutulmuş kaplamalar, hidrojel ve diğer teknikler kabul edilmiştir. Bitki embriyolarının hidrojel ile enkapsülasyonu bu yöntemler arasında daha sıklıkla uygulanmaktadır. 4 yapraklı yoncanın kullanıldığı bu çalışmada somatik embriyolarının üretimi tarif edilmiş olup, yapay tohum üretiminin ticarileştirilebilmesi için gerekenler özetlenmiştir.

González ve ark. (1997) yapmış oldukları çalışmada endemik ve tehlike altında bir tür olan *Centaurium rigualii* Esteve (Gentianaceae) 'nin *in vitro* koşullar altında yetiştirilen vejetatif sürgünleri, dondurarak saklama yöntemi ile başarılı bir şekilde saklanmıştır. Sıvı nitrojen (-196 °C) içine doğrudan daldırma işleminden sonra buz kristallerinin oluşumunun engellenmesi amacıyla enkapsülasyon tekniği kullanılarak bir protokol geliştirilmiştir. Enkapsülasyon yapılan bitki farklı sıcaklık ve farklı konsantrasyonlardaki sukrozun MS besisi yerine eklenmesine bağlı olarak gelişim süresi açısından değerlendirmeye alınmıştır. Bu çalışmadaki asıl amaç, dondurarak saklama yapılacak *C. rigualii*'nin enkapsülasyonu için farklı protokollerin geliştirilmesi ve bu protokolün koruma çalışmalarında kullanılabilirliğinin ele alınmasıdır. Çalışma sonucunda en uygun protokol olarak belirlenen 1 gün boyunca 0.3M sukroz ilave edilmiş MS besisi ortamında tutulan enkapsüle edilmiş *C. rigualii* tomurcukları için %70 en yüksek sağ kalım oranı elde edilmiştir.

Blandino ve ark. (1999) tarafından yapılan çalışma erken dönem alginat enkapsülasyon kinetiği üzerine olup, çeşitli katalizörler için bir immobilizasyon ortamı olarak ele alınmış ve kinetik özellikleri ortaya çıkarılmıştır.

Blandino ve ark. (2000)'nin çalışması aynı araştırma ekibinin immobilize enzim uygulamalarında alginat kapsüllerinin kullanım olanakları üzerinedir.

Datta ve ark (2001) tarafından nesli tehlike altında bir orkide türü olan *Geodorum densiflorum*(Lam.) Schltr.türünün protokormbenzeri gövde yapılarının enkapsülasyonu ile yapay tohum üretimi üzerine bir araştırma yapılmıştır. Bu protokorm benzeri yapılar sodyum alginat ile enkapsüle edilip 30 gün beklemeye alınmıştır. Kaplanmış olan yapay tohumların çimlenme ve rejenerasyon kapasitesi besi yeri ortamında tohumların çimlenmesine bağlı olarak test edilmiştir. %88 çimlenme kaydedilmiştir. Yapay tohumlar 4°C' de 120 gün bekletildiğinde, tohum canlılığında hiçbir azalma olmadığı görülmüştür. Enkapsüle edilmemiş kısımlar 4°C'de 30 gün sonra canlılığını tamamen yitirmiştir. Kaplama jelinin içine gıdakoruyucu ve mantar ilacı ilave edildikten sonra steril olmayan toprak ortamına transfer edildiğinde, sentetik tohumlar % 28 canlılık göstermiştir.

Saiprasad (2001) yapay tohumlar ve uygulama alanları üzerine yapmış olduğu çalışmayla, tohum üretemeyen bitkiler, transgenik bitkilerdeki propagasyon ve elit özelliklere sahip bitki türlerindeki tohum yayılım sorunları için yapay tohum üretiminin umut vaat eden bir yöntem olduğu ortaya koyulmuştur. Doğada klonal tekniklerin kullanımı, geleneksel rekombinasyon ve bitki ıslahı için seçilmiş daha az zahmetli ve daha kısa süre gerektiren, daha düşük maliyetli ve daha etkin sonuçların elde edilebildiği bir çalışmayı oluşturmaktadır. Agar, alginat, poliko 2133, karboksimetil selüloz, karragen, jelrite guar gum, sodyum pektat, zambk vb jeller ile yapılan denemelerde; sentetik tohum üretimi için alginat ile enkapsülasyonun daha uygun ve kullanılabilir olduğu ortaya konulmuştur. Alginat hidrojel; ayarlanabilir viskozitesi, çözelti içerisinde düşük yapısal bozulma, somatik embriyolar için düşük toksik etki, hızlı jelleşme, düşük maliyet ve biyolojik olarak uygun özellikleri nedeniyle sıklıkla sentetik tohum matriksi olarak seçilmektedir.

Longton (1981) bu çalışmada ılıman, tropikal ve soğuk bölgelerden alınan *Bryum argenteum*Hedw.klonlarının düşük ve yüksek sıcaklığa maruz bırakılarak protonema ve sürgün gelişim tepkileri incelenmiştir. Farklı sıcaklıklarda tutulmasından sonra görülen çimlenme, sonraki çalışmalar için temel bilgiyi oluşturmaktadır.

Burch (2003)'un yaptığı bir çalışmada, bazı karayosunu türlerinde ön işlem olmaksızın dondurarak saklama sonrası hayatta kalma oranları değerlendirilmiştir. Sukroz veya absisik asit ile ön muamele edilen bitki dokularında dehidrasyon ve dondurma işlemi sırasında kuruma toleransını arttırarak koruma sağladığı düşünülmektedir. Bu çalışmada bazı karayosunlarında doğal kuruma toleransının dondurma sırasında yeterli korumayı sağladığı görülmüştür. Bu çalışmanın amacı; kuruma toleransı seviyeleri birbirinden farklı 3 karayosunu türünün bir ön işlem ve enkapsülasyon işlemi yapılmadan dondurma sonrası hayatta kalma ve rejenerasyon yeteneğinin belirlenmesidir. Kurumaya toleranslı, toleransı sınırlı ve toleransı olmayan bu 3 tür, enkapsüle edilmiş ve enkapsüle edilmemiş olmak üzere 2 ayrı grup halinde ele alınmıştır. 2 grup içinde kurumaya toleranslı olan türde kurutma sonrası hayatta kalım %100, toleransı sınırlı olan türde ise %40'dır. Dondurma sonrası hayatta kalım kurumaya toleranslı türde %100-90, toleransı sınırlı olan türde %30-20 olduğu görülmüştür. Kuruma toleransı olmayan türde hem kurutma hem de dondurma işleminden sonra hayatta kalım olmamıştır. Sonuçta doğal olarak kurumaya toleranslı bazı karayosunu türlerinin bir ön işlem olmaksızın dondurma işleminin hayatta kalım için yeterli olacağı sonucuna varılmıştır.

Rowntree ve Ramsay 'ın 2005 yılında yaptıkları çalışmada, biryofitlerin enkapsülasyon yoluyla dondurularak saklanmasına ilişkin metodolojinin geliştirildiği ilk yayınlardan biri olarak göze çarpmaktadır. Bu çalışmada yöntemin uygulanışı hakkında detaylı bilgi verilmiştir.

Erdağ ve Kırmacı (2006)'nın çalışması ise bir TÜBİTAK projesi olup, Türkiye'den hasat edilen Biryofit türlerinin durumu üzerine bir rapor halindedir (Tübitak proje no: 104T126).

Mallónve ark. (2007)'nin yapmış oldukları çalışmada nadir bir karayosunu olan *Splachnum ampullaceum* Hedw.'ingametofitik tomurcukları kullanılmıştır. Bu tomurcuklar dondurarak saklama öncesi bir ön hazırlık olarak kalsiyum alginat ile kaplanmıştır. Karayosunu koruma çalışmalarına etkilerini gözlemek için karayosunu rejenerasyonu farklı zaman aralıklarında değerlendirilmiştir. Protonemal koloni çapı, tomurcuk uzunluğu ve tomurcuk sayısı ve gelişimi üzerine enkapsülasyon ve soğuk uygulamasının etkileri ele alınmıştır. Sonuç olarak karayosunu enkapsülasyonunun uzun süre koruma ve saklama çalışmaları için bir tehlike oluşturmadığı, uygun bir yöntem olduğu görülmüştür.

Enkapsülasyon yöntemiyle saklanan bitki materyalinde canlılık 2,5 yıl sonra %50'nin üzerinde iken; dondurma yöntemiyle saklanan bitkilerde ise canlılık %0'dır.

Rowntree ve Ramsay (2009) Kew Kraliyet Botanik Bahçesinde bulunan ve İngiltere'de nesli tükenme tehlikesi altında olan 22 türün korunmasına yönelik yaptıkları çalışmada dondurarak saklama için basit bir enkapsülasyon protokolü geliştirmişlerdir. Test edilen tüm türler için dondurulmuş materyalde rejenerasyon oranı %68'den büyüktür. Türlerin yarısında rejenerasyon oranının %100 olduğu görülmüştür. Sonuç olarak dünya genelinde yapılan uzun süre saklama ve benzer koruma çalışmaları için uygun ve başarılı bir yöntem olduğu görülmüştür.

Kikowska ve Thiem (2011) alginat enkapsülasyonu yoluyla üretilen yapay tohumların biyoteknolojik araştırmalarda ve gen bankalarında genetik materyalin korunmasındaki önemine vurgu yapmıştır ve bu yöntemin uygulanışına ilişkin bilgiler vermiştir. Ayrıca tıbbi bitkilerin mikropropagasyonu araştırmalarında bu yöntemin uygulanmasındaki yararları da değinmiştir.

Rowntree ve ark. (2011) Avrupa genelinde biryofit türleri üzerinde yapılan koruma çalışmaları, bu çalışmalarda kullanılan ve geliştirilen *in vitro* teknikler ve bu tekniklerin kullanımı ile oluşturulan korunmuş biryofit koleksiyonlarını bir derleme halinde sunmuştur.

Reed ve Sarasan (2011)'in gerçekleştirdiği bir çalışmada, biyoçeşitliliğin korunmasında *in vitro* tekniklerin tümüne ilişkin değerlendirmeler sunulmuştur. Bu tekniklerin gerekliliği ve kullanışlılığı hakkında bilgiler verilmiş olup, koruma çalışmalarında destekleyici özelliklerinden bahsedilmiştir.

Ros ve ark. (2013) yapmış oldukları çalışmada kurumaya toleranslı 4 Akdeniz türünü kullanarak *in vitro* kültür çalışmalarında ve dondurarak saklama öncesi hazırlık aşamasında kullanılmak üzere enkapsülasyon metotları denemişlerdir. Çalışmada *Entosthodon conmutatus* Durieu & Mont, *E. hungaricus* (Boros) Loeske, *Funariella curviseta* (Schwägr.) Sérgio, *Orthotrichum handiense* F. Lara, Garilleti & Mazimpaka kullanılmıştır. Bu 4 türden *Entosthodon conmutatus*, *Funariella curviseta* Akdeniz bölgesinde nadir rastlanan endemik türlerdendir. Her türde koruma çalışmaları da göz önünde bulundurularak kültür ve dondurma işlemlerinin başarı ile gerçekleştirildiği görülmüştür. Protonema ve gametoforlar

%3 'lük alginat ile kaplanıp CaCl_2 çözeltisi içerisinde katılaşma için 3 dakika bekletilmiştir. Bu çalışmada sıvı azot uygulamasından çok kısa bir süre sonra bitki canlılığı test edilmiştir. Dondurarak saklama öncesi hazırlanan protokollerin germplazmin uzun süreli depolanması için uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Sabovljević ve ark. 'nın 2014 yılında yaptıkları araştırma biryofitlerin *ex situ* korunmaları için *in vitro* tekniklerin uygulanışı ve gerekliliği hakkında kapsamlı bir çalışmadır. Makale içinde bazı türlere ait mikropropagasyon örnekleri sunulmuş olup, Belgrad Üniversitesinde bu güne değin korumaya alınan (saklanan) *in vitro* biryofit kültürleri de listelenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Denemelerimizde araştırma materyali olarak Conocephalaceae familyasına ait *Conocephalum conicum* L. Underw., Marchantiaceae familyasına ait *Marchantia polymorpha* L., Sphagnaceae familyasına ait *Sphagnum centrale* C.E.O. Jensen, *S. capillifolium* (Ehrh.) Hedw., Pottiaceae familyasına ait *Timmiella barbuloidea* (Brid.) Mönk., *Pterygoneurum ovatum* (Hedw.) Dixon, Encalyptaceae familyasına ait *Encalypta vulgaris* Hedw, Bryaceae familyasına ait *Bryum dichotomum* Hedw, *B. capillare* Hedw., Orthotrichaceae familyasına ait *Orthotrichum pumilum* Dicks., Hypnaceae familyasına ait *Hypnum cupressiforme* Hedw. kullanılmıştır. Aşağıda kullanılan biryofit türlerine ilişkin kısa açıklamalar verilmiş olup, bu açıklamalar taksonomik betimlerden ziyade tanıtıcı amaçlıdır:

3.1.1. *Conocephalum conicum*

Tallusu 17 mm genişliğe ulaşabilen iri bir ciğerotudur. Tallus yüzeyi hegzagonal bölmelere ayrılmış görünümde olup, bu bölmelerin orta kısmında belirgin solunum açıklıklarına (baca) sahiptir. Enine kesitlerde fotosentetik tabakayı oluşturan hücreleri lobut-konik biçimlidir. Islak (çeşme veya dere kenarları gibi) ortamlarda yayılış gösterir. Ülkemizin neredeyse tamamında yayılmaktadır.



Şekil3.1. *C. conicum* (Foto: Mesut KIRMACI)

3.1.2. *Marchantia polymorpha*

İri talluslu bitkilerdir. Gemma çanaklarının silindirik yapılar halinde yükselmesiyle kolayca tanınırlar. Oldukça iri arkegonioforları ve anteridioforları ile belgindirler. Yine ıslak ortamlarda ülkemizin tüm bölgelerinde bulunmaktadırlar.



Şekil 3.2. *M. polymorpha* (Foto: Adnan ERDA )

3.1.3. *Sphagnum centrale*

Dal yapraklarının klorositleri varil veya mercek şeklinde, hücre çeperleri adaksiyal yüzeyde kalınla mı tır. Karadeniz bölgemizde Giresun – Rize arasından bilinmektedir.



Şekil 3.3 *S. centrale*(Foto: Mesut KIRMACI)

3.1.4. *Sphagnum capillifolium*

15 cm. ye kadar uzayabilen iri türlerdir. Kırmızımsı pembemsi tonlarda renklenme gösterir. Klorositler enine kesitte üçgensel görünümlüdür. Yine Karadeniz bölgelerimizden bilinen bir türdür.



Şekil 3.4. *S. capillifolium*(Foto: Mesut KIRMACI)

3.1.5. *Timmiella barbuloidea*

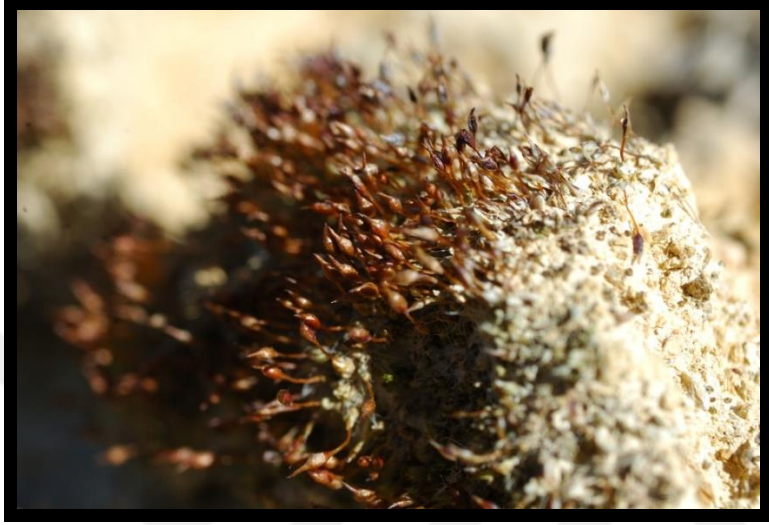
Uzun silindirik sporofitleri, oldukça uzun setası ve belirgince dişli yaprakları ile kolayca tanınabilen ve de toprak banklar üzerinde geniş örtüler oluşturan bir karayosunudur. Batı Anadoluda son derece yaygındır. Toprak bankların üzerinde vertikal olarak gelişim gösterirler.



Şekil 3.5. *T. barbuloidea*(Foto: Mesut KIRMACI)

3.1.6. *Pterygoneurum ovatum*

Oldukça küçük boylu (2-5 mm) karayosunlarıdır. Kapsül silindirik oval ve yakl. 1-1,5 mm uzunluktadır. Gametofit son derece kısa olup (1-2 mm) az sayıdaki yaprakların iç yüzeylerinde katlanmış kumaşlar gibi görünün fotosentetik lameller bulunur. Kurakçıl ve kalkerli ortamlarda sıkça rastlanır.



Şekil 3.6. *P. ovatum*(Foto: Adnan ERDAĞ)

3.1.7. *Encalypta vulgaris*

Kalkerli kayalar üzerindeki küçük açıklıklarda dahi gelişebilen kısa gametofitli (ca 0,5 cm) ve görece uzun setalı (ca 1,5 cm) ve silindirik kapsüllü karayosunlarıdır. Kurakçıl ortamların bitkileridir. Olgunlaşan sporofitin kukullat kaliptrası uzun süre düşmediği için arazi koşullarında kolayca ayırt edilebilen taksonlardır (cins bazında).



Şekil 3.7. *E. vulgaris*(Foto: Adnan ERDAĞ)

3.1.8. *Bryum dichotomum*

Bryum L. cinsi içinde kompleks oluşturan bir taksondur. Küçük ve eğik kapsüllerinin gelişme esnasında yarıya kadar açık ve uca doğru koyu tonlanması nedeniyle daha önceden *B. bicolor* olarak isimlendirilmiştir. 0,5 ile 1 cm kadar toplam uzunluğa sahip olan bu tür her türlü coğrafyada karşılaşılabilen bir taksondur. Çok sayıda bryofit topluluklarına katılır.



Şekil 3.8. *B. dichotomum*(Foto: Adnan ERDAĞ)

3.1.9. *Bryum capillare*

Son derece yaygın bir karayosunudur. Sernuoz kapsülleri ve kuruduğunda spiral olarak kıvrılmış yapraklarıyla nispeten kolayca tanınabilen karayosunlarıdır. Kırmızıya kaçan tonlarda renklenmelere sahip olabilir. Rizoidleri papillalı olup kırmızımsı renktedir. Bazen gemma (rizoidal) taşırlar.



Şekil 3.9. *B. capillare*(Foto: Adnan ERDAĞ)

3.1.10. *Orthotrichum pumilum*

0,5 cm boylarında otoik küçük epifitik bitkilerdir. Genellikle diğer *Orthotrichum* türleri arasına karışarak gelişirler. Kapsüller gömük olup 8 şerit taşırlar. Boş kapsüller kuru olduğunda sulkattır. Peristom dişleri 8 çift halindedir, kuru halde geriye doğru uzanırlar. Stomaları gömük (Kriptopor) tiptedir.



Şekil 3.10. *O. pumilum*(Foto: Adnan ERDAĞ)

3.1.11. *Hypnum cupressiforme*

Ülkemizde *Hypnum* Hedw. cinsinin en yaygın türüdür. Bir yöne doğru kıvrılmış falkat yapraklarıyla cins düzeyinde kolayca ayırt edilmekle beraber sporofit taşımayan örneklerinin uzman olmayanlarca tanınması oldukça zordur. Geniş bir tür ve altı taksonlardan oluşan bir kompleks olarak değerlendirilir. Halı tipi örtü oluşturmaları nedeniyle hortikültürel kullanımı belkide en yüksek türlerimizdendir. Geliştiği ortama çim kaplama görüntüsü verdiği gibi katlandığında birbirinden ayrılmayan dokusu nedeniyle çeşitli kaplama (ornamental) işlemlerinde yaygınca kullanılır.



Şekil 3.11. *H. cupressiforme* (Foto: Adnan ERDAĞ)

3.2. Yöntem

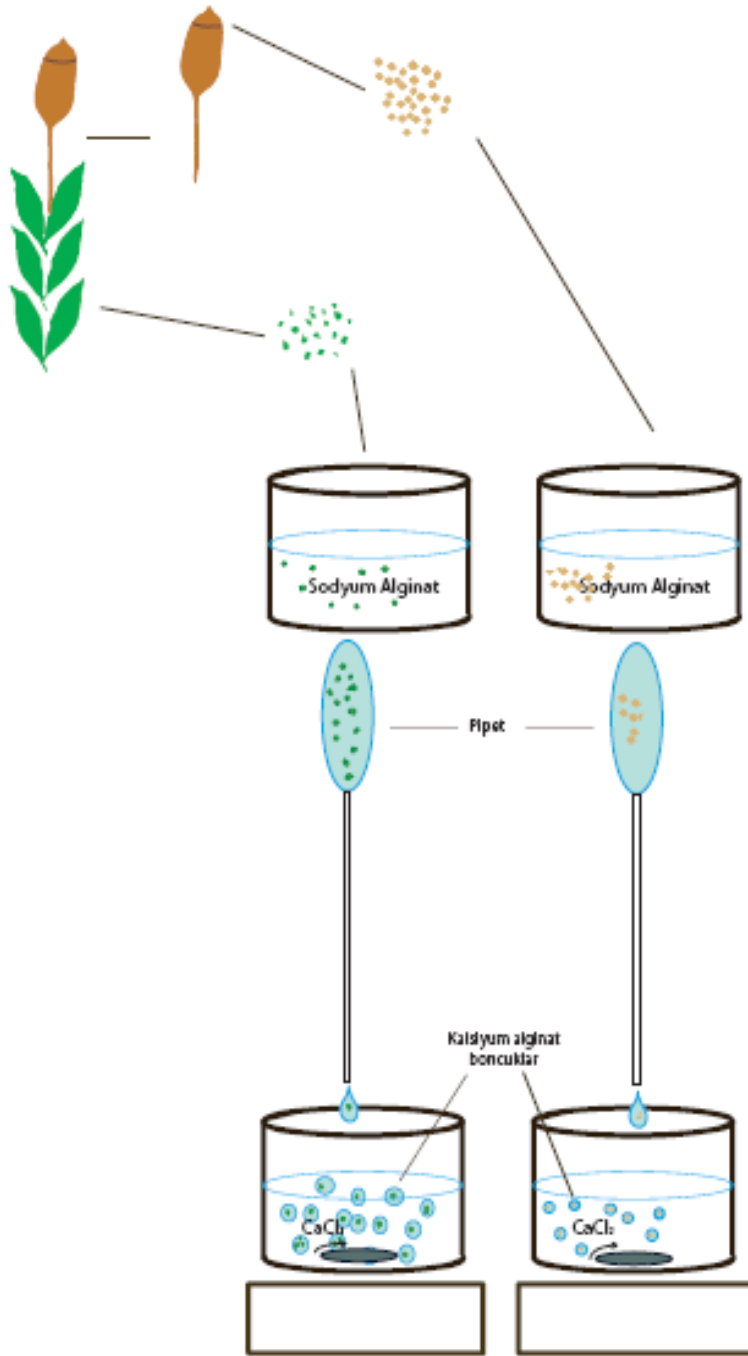
3.2.1. Bitkilerin Toplanması ve İzolasyonu

Denemelerimizde Aydın ili çevresinden ve Karadeniz bölgesinden Prof. Dr. Adnan Erdağ, Doç. Dr. Mesut Kırmacı, Doç. Dr. Hatice Özenoğlu Kiremit tarafından toplanan *Marchantia polymorpha* (AYDN 2348), *Conocephalum conicum* (AYDN 2512), *Sphagnum centrale* (AYDN 3237), *S. capillifolium* (AYDN 3238), *Timmiella barbuloidea* (AYDN 3094), *Pterygoneurum ovatum* (AYDN 2216), *Encalypta vulgaris* (AYDN 2725), *Bryum dichotomum* (AYDN 2576), *B. capillare* (AYDN 2670), *Orthotrichum pumilum* (AYDN 2528), *Hypnum cupressiforme* (AYDN 2851) türleri çalışma materyali olarak kullanılmıştır. Arazi çalışması ile toplanan bitkiler uygun torbalara aktararak laboratuvar ortamına getirilmiştir. Tayin edilip adlandırılan bitki türlerinin çalışma

için kullanılacak olan kısımları stereo mikroskop altında ana bitkiden ayrılmıştır. Tayin işlemleri yukarıda adı geçen biryologlarca yapılmıştır. Çalışmamızda *Conocephalum conicum*, *Sphagnum centrale*, *Sphagnum capillifolium* ve *Bryum dichotomum* türlerinin vejetatif kısımları; *Marchantia polymorpha* türünün gemmaları; *Timmiella barbuloidea*, *Pterygoneurum ovatum*, *Encalypta vulgaris*, *Orthotrichum pumilum*, *Bryum capillare*, *Hypnum cupressiforme* türlerinin ise sporları kullanılmıştır.

3.2.2. Enkapsülasyon Uygulaması ve Enkapsülasyon Sonrası Deneme Ortamları

Denemelerde kullanılan tüm materyaller (tallus, gametofit, gemma, spor) için aynı enkapsülasyon işlemi uygulanmıştır. Enkapsüle edilmiş boncukların oluşturulması için, 25 ml % 4 lük düşük viskoziteye sahip sodyum alginat çözeltisi hazırlanmıştır. Sodyum alginat çözeltisinin yoğunluğu % 1, 2, 3 ve 4'lük seriler hazırlanarak ön denemeler sonucu belirlenmiştir. İstenilen düzgün şekil ve kalite açısından değerlendirilen boncukların oluşturulması için % 4 lük sodyum alginat çözeltisi uygun bulunmuştur. Bunun için 100 ml distile su içinde 4g sodyum alginat (Sigma A1112) manyetik karıştırıcıyla ısıtılarak (20°C) çözündürülmüştür. Daha önceden hazırlanmış olan propagüller sodyum alginat çözeltisi içine aktarılmıştır. Ayrıca boncuk sertliği ve katılaşması için 100mM CaCl_2 çözeltisi hazırlanmıştır. Damlatma işlemi sağlamak için sıradan plastik laboratuvar pipetleri kullanılmıştır. Damlacık boyutu, oluşacak boncuk boyutunu doğrudan belirlediğinden, pipetler yaklaşık 2 mm kadar genişleyen kısımlarına doğru kesilmiş ve istenen açıklık elde edilmiştir. Sodyum alginat + propagül karışımından bu pipetlerle, CaCl_2 çözeltisine el kontrolüyle damlatma yapılmıştır. Bilindiği üzere CaCl_2 çözeltisinde karıştırarak bekletme esnasında sodyum alginattaki Na^+ iyonları ile Ca^{2+} iyonları yer değiştirerek sonuçta kalsiyum alginat haline dönüşüm sağlanır ve bu yolla istenen boncuk sertliği ve dayanıklılığı elde edilir (Blandino vd., 1999). İyon değişimi ve sertleşmeyi sağlamak için 20 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmaya devam edilmiştir. Bu sürenin sonunda propagülleri içeren boncuklar (yaklaşık 4-5mm çapında) elde edilmiştir. Yapılan işlemlerin genel bir şeması Şekil 3.12'de sunulmuştur.



Şekil 3.12. Enkapsülasyon işlemi genel şeması

Denemelerimizde *C. conicum* talluslarının sürgün uçları 4-5 mm'lik boncukların içerisine sığabilecek şekilde bisturi ile kesilerek küçük parçalara ayrılmıştır. Şekil 3.12 de belirtilen yöntem uygulanarak oluşturulan boncuklar 3 kez distile su ile yıkandıktan sonra çimlendirme için içerisinde 2ml distile su bulunan petrilere aktarılmış ve oda sıcaklığı koşullarında bekletilmiştir.

M. polymorpha'nın gemmaları bir pens yardımıyla çanaklarından çıkarılarak Şekil 3.12'de gösterilen yöntem ile enkapsüle edilmiştir. Elde edilen boncuklar 2ml distile su bulunan petrilere aktarılmış ve oda sıcaklığı koşullarında bekletilmiştir.

S. centrale, *S. capillifolium*, *B. dichotomum*'un gametofit kısımları enkapsülasyon işleminde kullanılmıştır. Gametofitler teflon başlıklı homojenizatör yardımıyla parçalanmış ve fragmentler Şekil 3.12 de belirtilen yöntem ile enkapsüle edilmiştir. *B. dichotomum*'un gametofitleri bir makas yardımıyla küçük parçalara ayrılmıştır. Bu gametofit parçacıklarını kalsiyum alginat ile kaplayabilmek için şekil 3.12'de belirtilen yöntem uygulanmıştır. Oluşturulan kalsiyum alginat boncuklar oda sıcaklığında steril (121°C de 15 dk otoklav ile sterilize edilmiştir) nemli toprak üzerinde çimlenme için bırakılmıştır.

*T. barbuloide*s, *P. ovatum*, *E. vulgaris*, *O. pumilum*, *B. capillare*, *H. cupressiforme*'nin spor kapsülleri kullanılmıştır. Stereo mikroskop altında ana bitkiden ayrılan kapsüller, içerisinde 1ml steril distile su bulunan ependorf tüpleri içine steril pens yardımıyla açılarak muhteviyatının doğrudan tüp içine boşalması sağlanmıştır. Bu yolla kapsül sterilizasyonu işleminden kaçınılmıştır. Homojenizasyon için titreşimli karıştırıcı yardımıyla oluşturulmuş spor süspansiyonları içinden bir damla alınarak, damlacık içindeki spor dağılımı mikroskop altında incelenmiş ve homojen dağılımları onaylanmıştır. Sporların enkapsülasyonu şekil 3.12 de gösterilen yöntem ile aynı şekilde gerçekleştirilmiştir. *T. barbuloide*s sporları kullanılarak oluşturulan boncuklar çimlenme için steril nemli toprak üzerine bırakılırken; *P. ovatum*, *E. vulgaris*, *O. pumilum*, *B. capillare*, *H. cupressiforme* ile elde edilen boncuklar ise distile su içinde oda sıcaklığında tutulmuştur. *H. cupressiforme* ve *B. capillare* için ayrıca kurutma veya dondurma uygulaması yapılmıştır. Kurutma işlemi için boncuklar petri içinde (susuz) oda sıcaklığı koşullarında 1 ay açıkta bırakılmış, dondurma işlemi için ise 1 ay süre ile (± 2) -20°C de derin dondurucuda tutulmuşlardır.

Tüm denemelerde petri kapaklarının etrafı parafilm ile çevrilmiştir. Her bir deneme seti için petri başına 50 boncuk kullanılmıştır ve denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

Denemelerde kullanılan türler için enkapsüle edilen materyal tipi ve enkapsülasyon sonrası gelişimlerin gözlendiği deneme ortamları Çizelge 1’de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan bryofit türleri, kullanılan propagül tipi ve deneme ortamları

Tür	Kullanılan bryofit propagülü	Deneme Ortamları				
		Nemli Toprak	Distile Su	Kurutma	Dondurma	Meşe Talaşı
<i>Conocephalum conicum</i>	Gametofit Fragmenti	-	+	-	-	-
<i>Marchantia polymorpha</i>	Gemma	-	+	-	-	-
<i>Sphagnum centrale</i>	Gametofit Fragmenti	-	+	-	-	-
<i>S. capillifolium</i>	Gametofit Fragmenti	-	+	-	-	-
<i>Timmiella barbuloidea</i>	Spor	+	-	-	-	-
<i>Ptreygoneurum ovatum</i>	Spor	+	+	-	-	-
<i>Encalypta vulgaris</i>	Spor	+	+	-	-	-
<i>B. dichotomum</i>	Gametofit Fragmenti	+	-	-	-	-
<i>Orthotrichum pumilum</i>	Spor	-	-	-	-	+
<i>Bryum capillare</i>	Spor	-	+	+	+	-
<i>Hypnum cupressiforme</i>	Spor	+	+	+	+	-

Fotoğraflama çalışmaları için Leica S-ATO8 stereomikroskop (fotoğraf ataçmanlı) ve Olympus CX 31 mikroskop Olympus E330ADU1 foto ataçmanlı ekipman kullanılmıştır. Araştırmamız sırasında kullanılan sporlarla ilgili sayısal değerlendirmeler (boncuk başına spor sayısı, çimlenen spor sayısı vb.) küresel formun ve ışığı istenmedik ölçüde kıran kaplama malzemesinin yarattığı görsel sorunlar nedeniyle gerçekleştirilememiştir. Bunun yerine boncukların görülebilen yüzey kısımlarındaki çimlenmeler / gelişmeler üzerinden değerlendirilmiştir. Bazı boncukların bitkisel materyal içermediği görülmüş bunun temel nedeninin spor gibi küçük materyalin birbirine yapışarak yoğunlaşma odakları halinde dağılması olduğu anlaşılmıştır. Deterjan gibi kimyasallarla bunu kısmen aşmak mümkün olsa da, çalışmanın elden geldiğince doğal koşullara yakın ve minimum kimyasal ajan kullanarak yapılması istendiğinden böyle bir uygulamadan kaçınılmıştır. Buna rağmen boncuklara dağılan bitkisel materyalin homojenizasyonuna azami özen gösterilmiş ve en azından her boncuğa materyal girmesinde (sporlar için) başarı sağlanmıştır. Buna rağmen, bazı boncuklarda diğerlerinden daha yoğun spor birikimi olduğu da görülmüştür.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

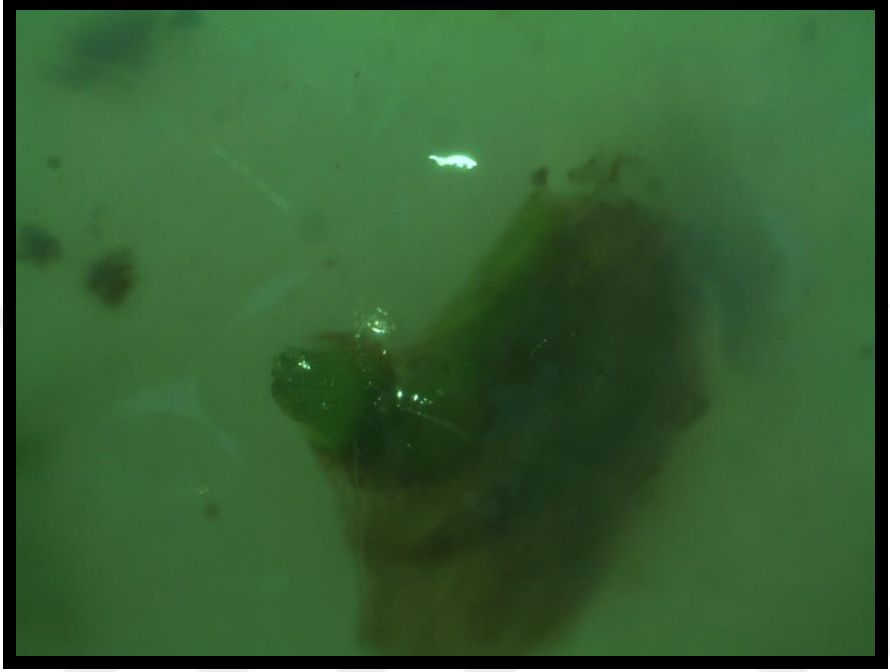
Araştırmamız enkapsüle edilmiş bitkisel materyalin nemli toprak, distile su ortamı ve bir epifit olduğu için *Orthotrichum pumilum* için nemlendirilmiş meşe ağacı talaşı üzerinde gelişimlerinin gözlenmesi ekseninde yürütülmüştür (çizelge 1).

4.1. *Conocephalum conicum*

C. conicum'un tallus uçlarının başarılı bir şekilde kalsiyum alginat ile kaplanıp, oda sıcaklığında, distile su ortamına aktarılmasının ardından 17. gün, 1 ay, 3 ay, 5 ay sonraki dönemlerde gözlemleri yapılmıştır. Tallus uçlarının çimlenme ortamına aktarılmasından 17 gün sonra yapılan ilk gözlemlerde, vejetatif sürgünlerin gelişmeye başladığı görülmüştür (şekil 4.1). 1. ayın sonunda gelişen kısımların kapsül dışına çıktığı belirlenmiştir (şekil 4.2). 3. ayda vejetatif sürgün gelişiminin devam ettiği (şekil 4.3), 5 ay sonra yapılan gözlemlerde ise herhangi bir kontaminasyon olmadan tallusun bağımsız olarak yaşayabilecek kadar geliştiği ve rizoidlerinin tamamen teşekkül ettiği görülmüştür (şekil 4.4). Denemenin başlangıcından sonraki 1 yıllık dönem boyunca sürgünler canlılığı ve rejenerasyon yeteneğini devam ettirmiştir.



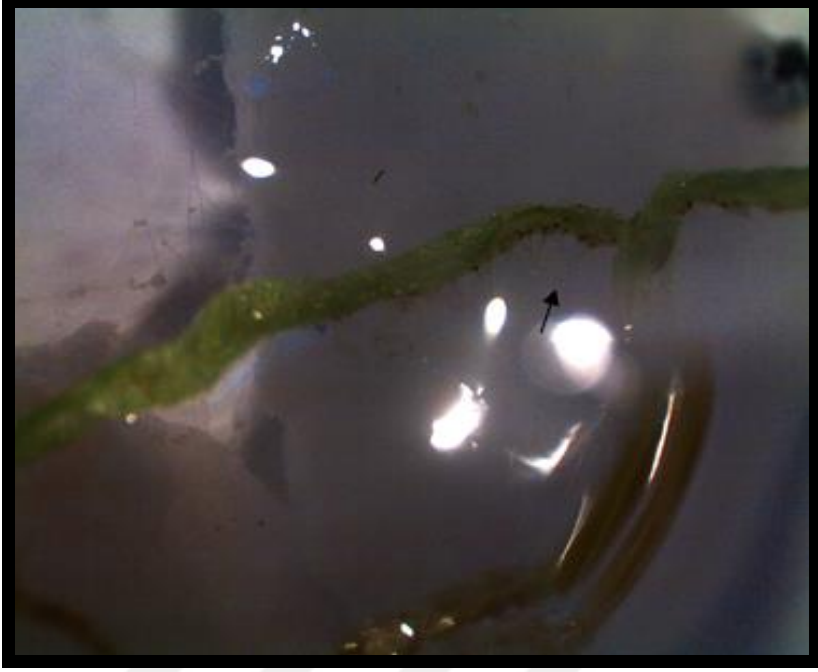
Şekil 4.1. *C. conicum*, Sürgün gelişiminin devamı (17.gün)



Şekil 4.2. *C. conicum*, gelişen sürgünler (1. ay)



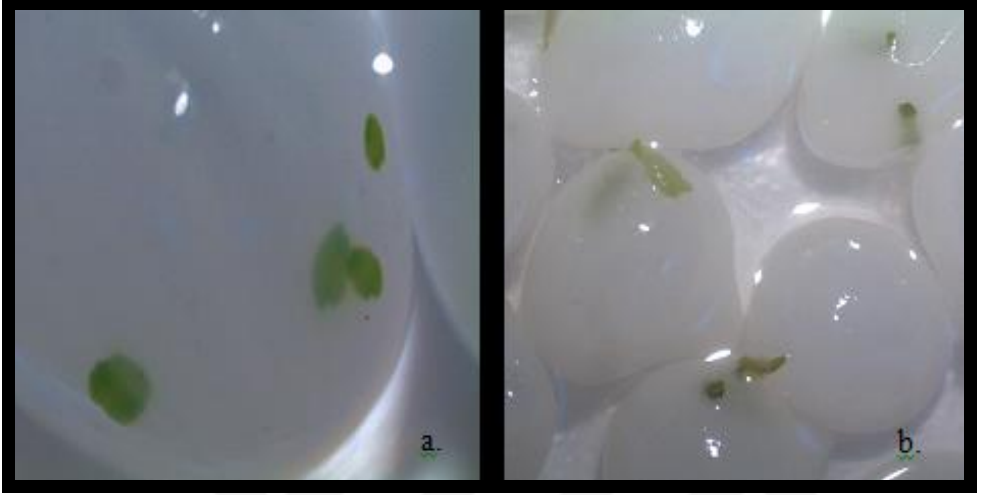
Şekil 4.3. *C. conicum*, gelişen sürgünler (3. ay)



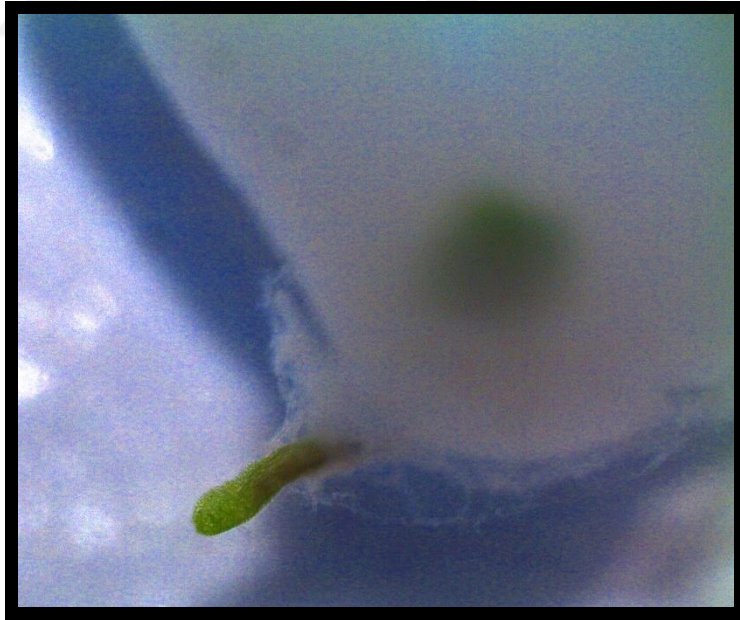
Şekil 4.4. *C. conicum*, 5. ay olgunlaşma sürecine doğru birey (oklar rizoidleri göstermektedir.)

4.2. *Marchantia polymorpha*

M. polymorpha 'nın gemmaları kalsiyum alginat ile başarılı bir şekilde kaplanmıştır (şekil 4.5. a). Kaplama sonrası ilk 1 ay içinde herhangi bir gelişme olmamıştır. 2. ay itibarıyla gemmalar sürgün vermiş ve sürgünler hızlı bir gelişim göstermiştir (şekil 4.5.b.). Bu arada sürgün uçlarının kapsül dışına çıkışı ve rizoid gelişimi de başlamıştır. 6 ay boyunca yapılan gözlemlerde gemmalardaki gelişimin 3. aydan sonra yavaşladığı gözlenmiştir. Bu gelişimsel yavaşlamaya rağmen herhangi bir kontaminasyon belirtisi görülmemiştir (şekil 4.6). Gemmalardan herhangi bir sterilizasyon işlemi uygulamadan çimlenme ve gelişme sağlanması türün ileride yapılacak farklı çalışmalarda gemmalar üzerinden çoğaltılmasına temel oluşturacak durumdadır. Çok yıllık bitki oluşu nedeniyle bu türün gözlemlerinin devamında tez süresi içerisinde olgunlaşmış bireylere ulaşılamayacağından gözlemlere son verilmiş ve enkapsülasyon işlemine yanıtının olumlu olduğu kabul edilmiştir.



Şekil 4.5.a. *M. polymorpha*, gemmaların kalsiyum alginat ile kaplanmış hali b. gemmalarda 2 ay sonraki gelişme durumu

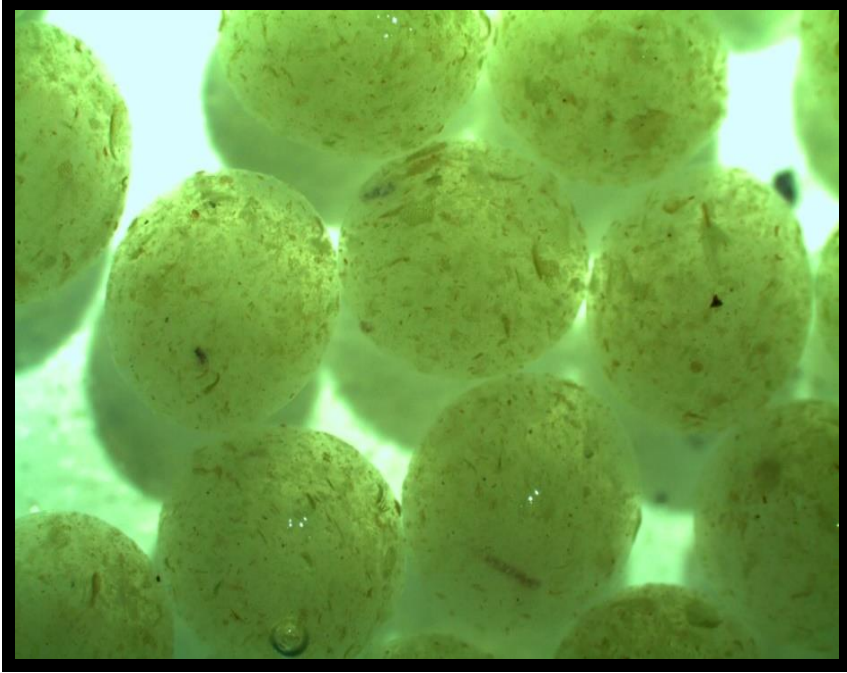


Şekil 4.6. *M. polymorpha*, 3.ay itibarıyla gelişme durumu

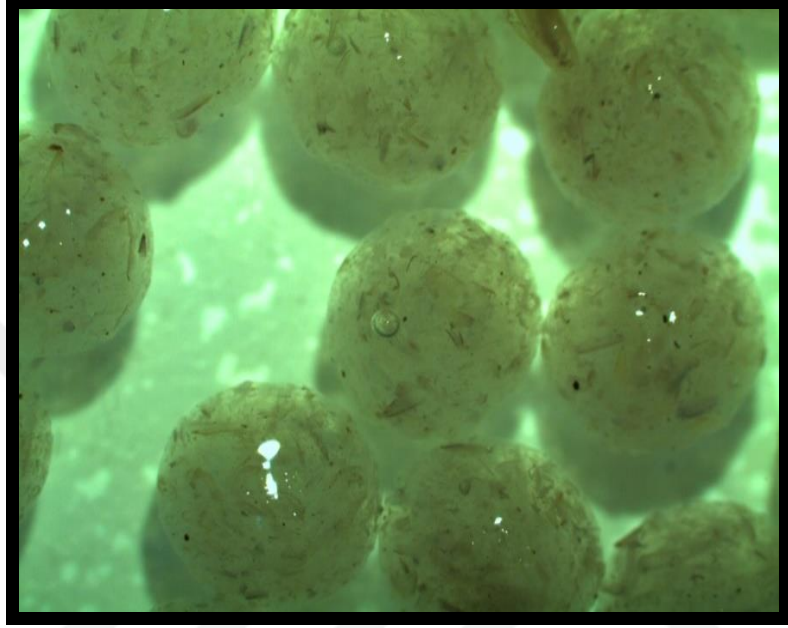
C. conicum ve *M. polymorpha* iki higrofitik ciğerotu olarak enkapsüle diasporlarının kendi doğal koşullarına yakın bir ıslak ortamda çimlenme ve nispeten ileri seviyede gelişme eğilimi göstermeleri nedeniyle bu çalışma bazında başarılı türler olarak bulgulanmışlardır.

4.3. *Sphagnum capillifolium* ve *S. centrale*

Sphagnum türlerine ait fragmentler son derece başarılı biçimde enkapsüle edilmesine rağmen (şekil 4.7 ve 4.8) işlemi takip eden hafta içinde kontaminasyona uğramışlar ve süreç başarısız olmuştur. Bulunduğumuz bölge itibarıyla taze materyalin teminindeki güçlükler nedeniyle bu grup üzerine çalışmalara son verilmiştir.



Şekil 4.7. *S. centrale*, enkapsüle gametofit parçaları



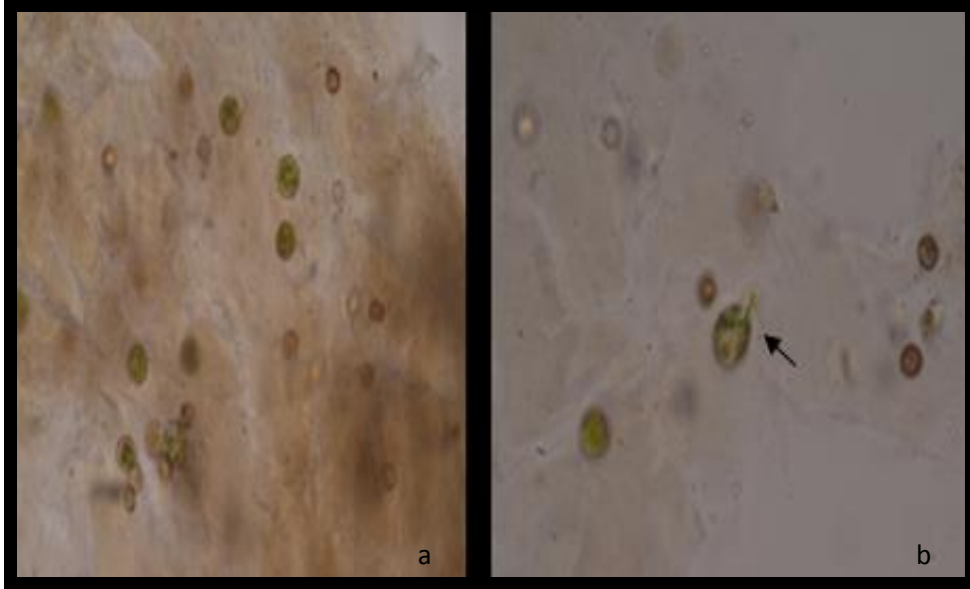
Şekil 4.8. *S. capillifolium*, enkapsüle gametofit parçaları

4.4. *Bryum dichotomum*

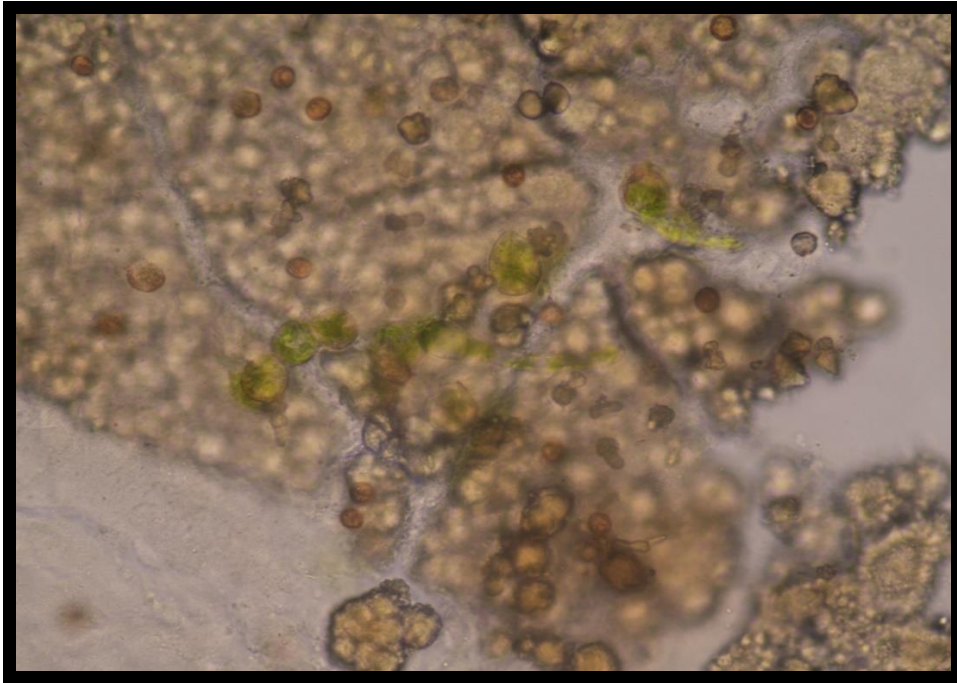
Enkapsülasyon yöntemi başarılı bir şekilde uygulanıp, gametofitler kalsiyum alginat ile kaplanmıştır. *B. dichotomum* yalnızca nemli toprak üzerinde gametofit fragmentleri diaspor olarak kullanılarak denenmiştir. Denemenin başlamasını takip eden hafta içinde gelişen kontaminasyon denemeleri sonlandırmıştır. Bir başka *Bryum* türünün (*B. capillare*) denemelerimizde kullanılıyor olması nedeniyle bu türle ilgili çalışmalar terkedilmiştir.

4.5. *Timmiella barbuloidea*

Enkapsülasyon yönteminin uygulanması sonucu sporlar kalsiyum alginat ile kaplanmıştır. Enkapsüle *T. barbuloidea* sporlarının nemli toprak ortamı üzerine bırakılmalarından 45 gün sonra sporların çimlenmeye başladıkları ve bazı çimlenen sporların protonemal iplikleri ürettikleri gözlenmiştir (şekil 4.9 ve 4.10). Toprağa bırakılan boncuklar bulundukları ortamın rengini alarak koyulaşmışlardır. Bu yüzden sporların gelişimini takip edebilmek için, sodyum alginatın ezilerek parçalanması sağlandıktan sonra lam lamel arası binoküler mikroskop ile incelemeler yapılmıştır.



Şekil 4.9. *T. barbuloides*, a. Şişmiş ve şişmemiş sporlar a. germ tübü oluşumu



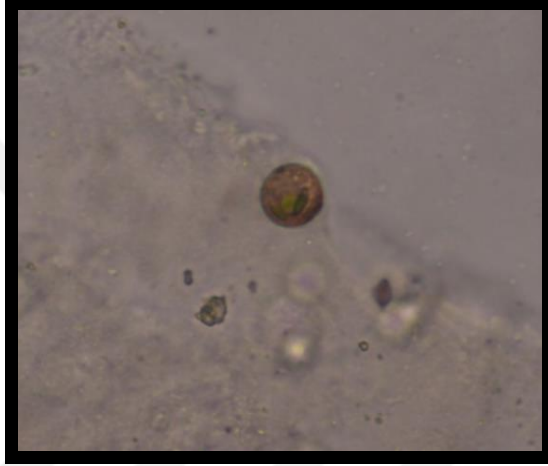
Şekil 4.10. *T. barbuloides*, protonemal ipliklerin oluşumu

Başarılı çimlenme ve gelişme göstermesine rağmen bu tarihten sonra gelişen kontaminasyon deneyi sonlandırmıştır. Kserofitik karakterli bir taksonun muhtemelen gereksiniminin ötesindeki sulu ortam koşullarında mantarların kendisinden daha hızlı gelişerek süreci sonlandırdığı düşüncesine bu noktada değer verilebileceği akla gelmektedir. Ancak, deney ortamları doğal koşulların mikro ölçekli simulasyonları olduğundan ve hiçbir zaman gerçek bir eşitliğin sağlanamayacağı mutlak olduğundan bu türün çimlenme ve sonrası gelişime yönelik cevap vermiş olmasının bu noktada diğer olumsuzluklardan daha önemli olduğunu ileri sürmek olasıdır. Zira geniş bir doğal ortama uygun bir mevsimde bırakılacak enkapsüle materyalin en azından çimleneceği ve hiç olmazsa kabul edilebilir miktarda protonemanın daha ileri gelişme evrelerine ulaşabileceğini düşünmek hayal değildir. Bilindiği üzere doğal koşullar altında tüketilme riski ne kadar büyükse tüketicilerin (burada mantar türleri) inhibitörleri de o ölçüde yaygındır. Yine anlaşılabileceği üzere bir türü yeni bir alana ya da kendisine ait kaybettiği bir alana tekrar yaymaya çalışırken normal sınırların çok üzerinde diasporun ortama bırakılması en temel başarı sağlayıcı önlemlerden biri olacaktır. Dolayısıyla enkapsüle materyalde gözlenen çimlenme başarısı en azından sporlarının veya kullanılan diğer diasporalarının doğal koşulda çıplak kalacak olanlardan daha uzun süre koruma altında kalacağını, daha az su stresi yaşayarak olumsuz koşulları geçireceği düşünüldüğünde gerçek bir başarı olarak değerlendirilebilecektir. Daha mütevazı bir düşünce ile, denenen ve çimlenebilen karayosunu türleri için enkapsülasyonla propagasyon umut vaat eden bir alternatif olmaya devam edecektir. Bizim bu noktada kontaminasyon ve zaman sınırlaması gibi engellere rağmen çimlenme ve mümkünse gametofor başlangıcına doğru yönelen gelişme gözlemlerini tür bazında başarı ölçütü olarak almamız aşırı bulunmayacaktır.

4.6. *Pterygoneurum ovatum*

Enkapsülasyon işlemi uygulanmış sporlar başarıyla sodyum alginat ile kaplanmıştır. Toprağa koyulan boncuklar bulundukları ortamın rengini alarak koyulaştıklarından sporların gelişimsel takibi, sodyum alginatın ezilerek parçalanması sağlandıktan sonra lam lamel arası binoküler mikroskop ile incelemeler yapılarak sağlanmıştır (şekil 4.11). İlk 1 ay içinde şişme oranlarının düşüklüğü bu türe ait sporlarda canlılık sorunu olduğu endişesini getirmiştir. Kısa süre içinde de (ilk 30 gün) şişen sporların da canlılığını kaybettiği görülmüştür. Hem distile su ortamında hem de nemli toprakta aynı durumun gözlenmesi

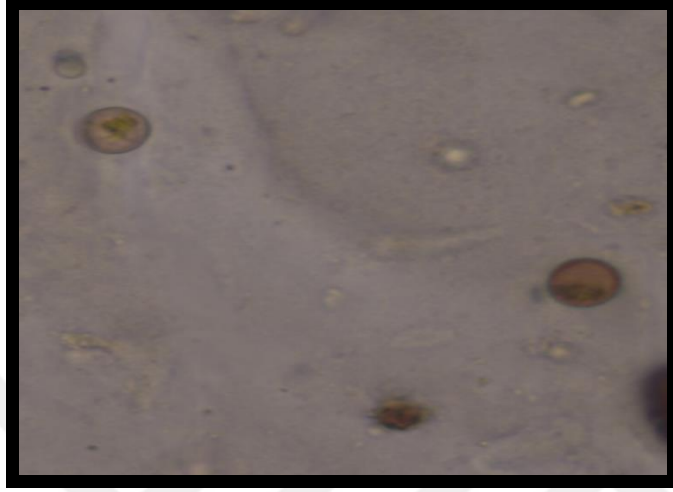
nedeniyle en azından elimizdeki populasyonun bu işlem için uygun olmayabileceği düşüncesiyle denemeler sonlandırılmıştır. Bazı durumlarda son derece fertil sporlar üreten karayosunlarında dahi boyutça küçük ve canlı olmayan sporlar üretilmektedir.



Şekil 4.11. *P. ovatum*, 1 ay sonra toprakta

4.7. *Encalypta vulgaris*

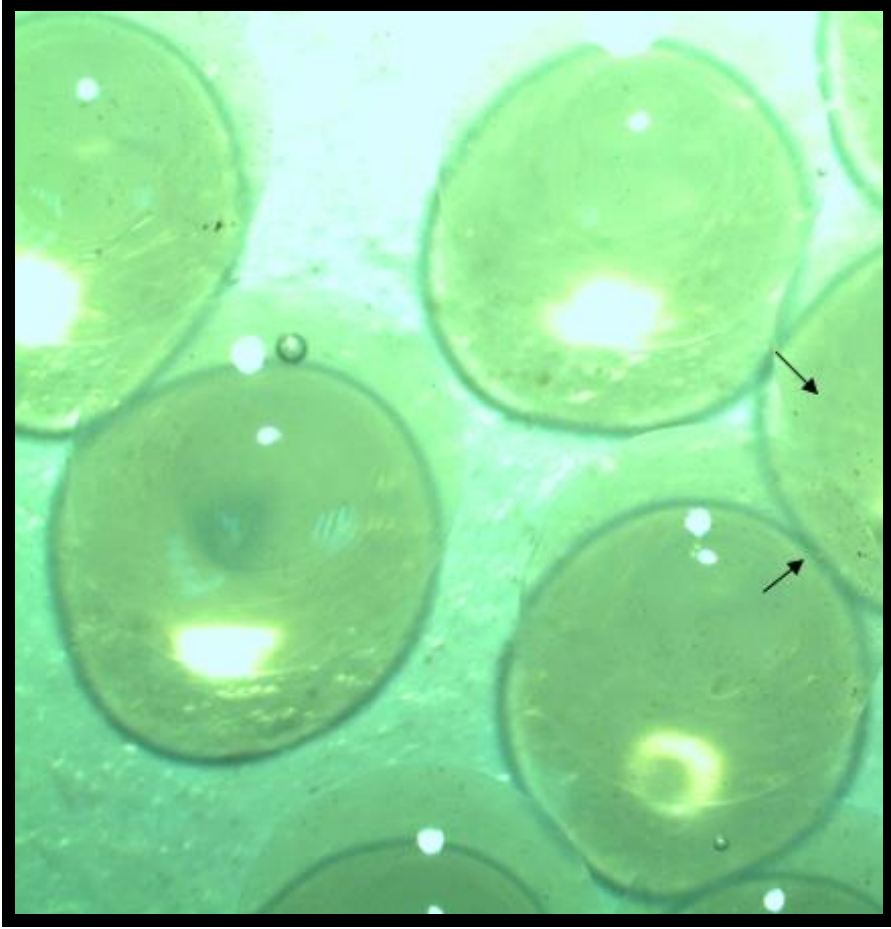
Sporlar başarılı bir şekilde enkapsüle edilmiştir. Toprağa koyulan boncuklar bulundukları ortamın rengini alarak koyulaştıklarından sporların gelişimsel takibi, sodyum alginatın ezilerek parçalanması sağlandıktan sonra lam lamel arası binoküler mikroskop ile incelemeler yapılarak sağlanmıştır (şekil 4.12). Ancak *P. ovatum* gibi bu türde de şişme sonrası gelişme durmuştur. Kontaminasyon nedeniyle de deneme sonlandırılmıştır.



Şekil 4.12. *E. vulgaris*, 2 ay sonra toprakta

4.8. *Orthotrichum pumilum*

Enkapsülasyon işlemi başarı ile uygulanmıştır. Enkapsüle *O. pumilum* sporları (şekil 4.13) meşe odunu talaşı üzerine bırakılmış ancak hızlı gelişen kontaminasyon sporların şişmesine dahi izin vermemiştir. Bitkinin epifitik oluşu ve vertikal düzlemde yayılan bir tür oluşunun bir sonucu olarak kalsiyum alginat boncuklarının yatay konumda tutulması için başka çözümler gerektireceği ve bunun da tez kapsamını daha da genişleteceği düşüncesiyle bu tür üzerine daha başka deneme yapılmamasına karar verilmiştir. Epifitik türler için olası çözümler muhtemelen bir başka çalışmanın konusu olacaktır.

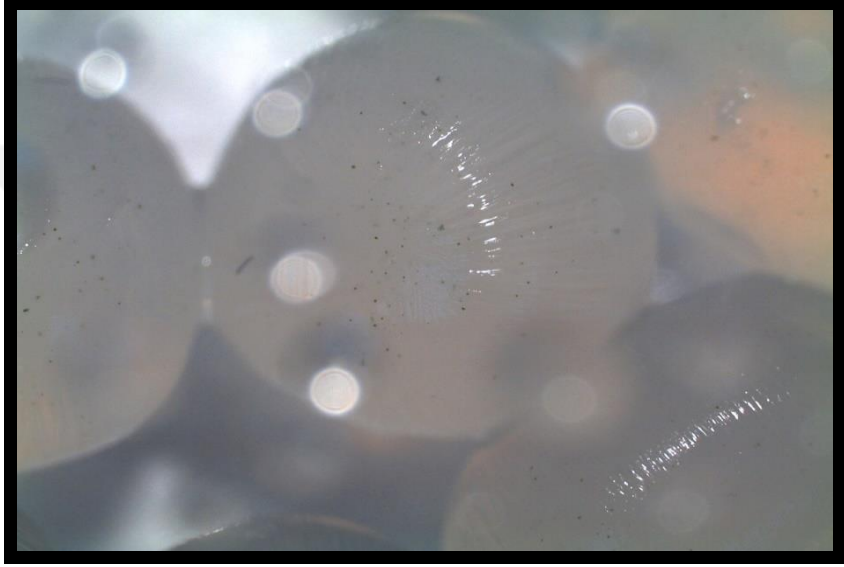


Şekil 4.13. *O. pumilum*, alginat ile kaplanmış boncukların görünümü

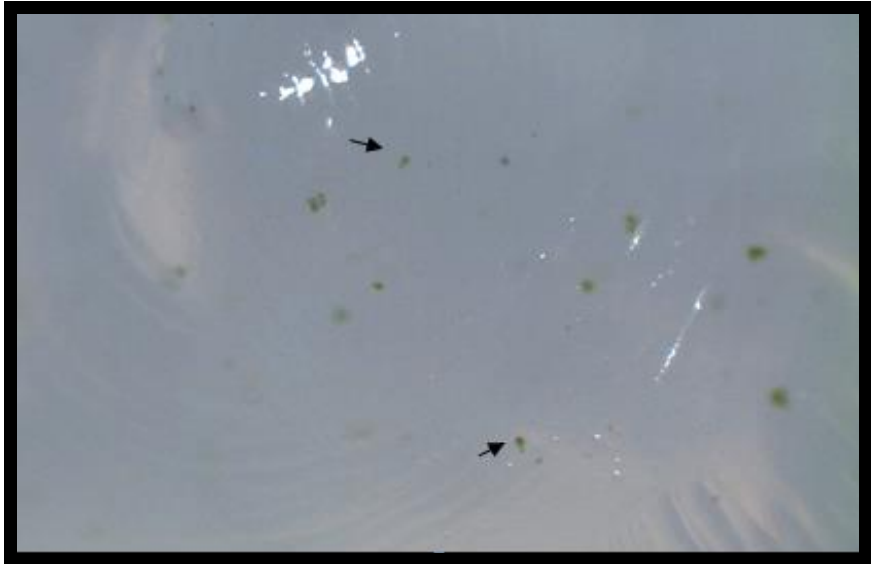
4.9. *Bryum capillare*

Sporlar başarılı bir şekilde enkapsülasyon yöntemi ile alginat ile kaplanmıştır (şekil 4.14). Oda sıcaklığında distile su ortamına koyularak yapılan gözlemlerde; sporların alginat ile kaplanmasından 2 ay sonra spor çimlenmelerinin başladığı belirlenmiştir (Şekil 4.15). *B. capillare* örneklerinde 2. ay içinde gelişme bazı boncuklarda aşırı hızlanmış ve protonema ağı gözlenmiştir (şekil 4.16). 4. ayda yapılan gözlemlerde ise gelişimin devam ettiği sporlarda görülen çimlenmenin boncuk iç kısmını bir ağ gibi sardığı ve boncuk dışına doğru kaulonemal gelişimini sürdürdüğü tespit edilmiştir (şekil 4.17). 5. ay süresince benzer gelişim devam etmiştir (şekil 4.18). 6. aydan sonra gelişim hızında ciddi düşüş gözlenmiş ve 10. ay içinde yapılan gözlemde de benzer formun korunduğu ve tomurcuk

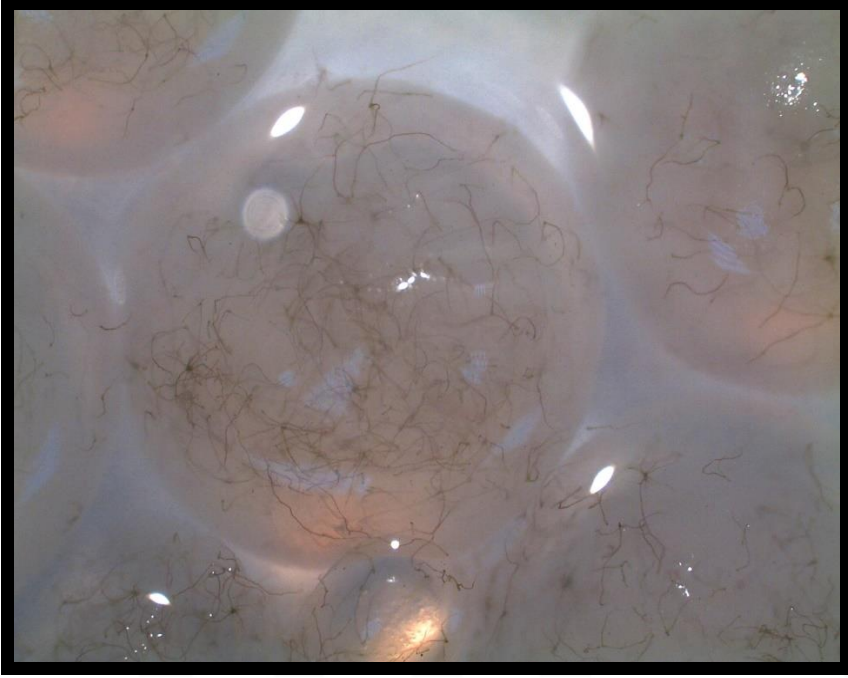
oluşturma evresine henüz geçilmediği gözlendiğinden tez süresini açacağı açık ar olan bu sürecin izlenmesi terkedilmiştir ancak kaulonemal evrenin belirginliği bu dönemde artmıştır.



şekil 4.14.B. *capillare* kalsiyum alginat ile kaplanmış sporlar



şekil 4.15. *B. capillare*, şişme ve çimlenme (2.ay)



Şekil 4.16. *B. capillare* protonemal gelişim ve dışa büyüyen kaulonemal iplikler, 4. ay



Şekil 4.17. *B. capillare*, ileri protonemal gelişim 5.ay



Şekil 4.18. 6. ayda protonemal ve kaulonemal iplikler

Denemelerin bir başka aşaması olan kurutma işlemi için enkapsüle materyal 1 ay süreyle oda koşullarında bekletilmiş ve ardından 2 ml. distile su içeren petrilere aktarılarak çimlenme durumu gözlenmiştir.

B. capillare'de çimlenme ortamının oluşturulmasından 1 ay sonra sporlar şişmiş ve çimlenme gözlenmiştir. Kurutma işlemine tabi tutulmuş materyallerde ideal boncuk formunun bozulduğu fakat iç kısımlarında sporların halen kalsiyum alginat yığınları içinde koruma altında kaldığı görülmüştür (şekil 4.19 ve 4.20).

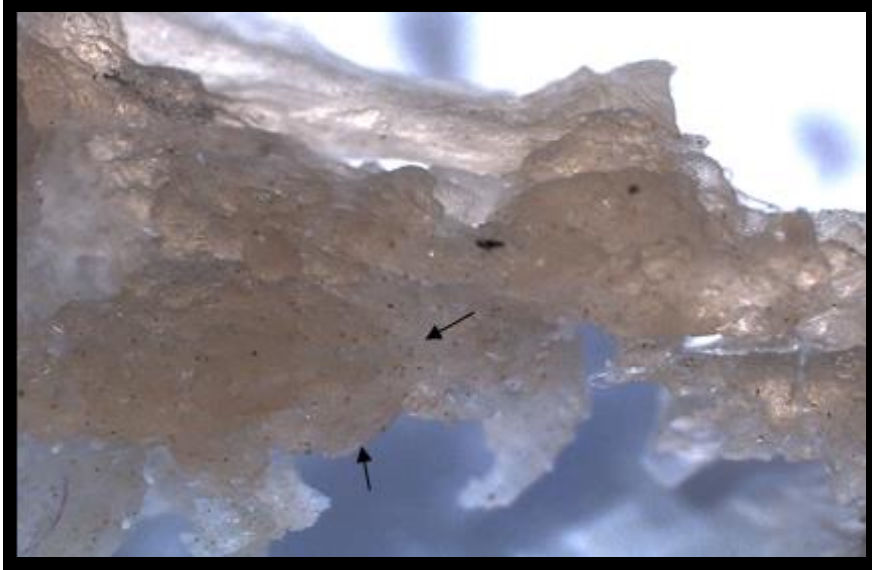


Şekil. 4.19. Kurutulma işlemi sonunda kalsiyum alginat kaplamanın durumu



Şekil 4.20. *B. capillare*, kurutma sonrası nemlendirme ve sporlar

Yeniden nemlendirmeyi takiben geçen 1 ay sonunda sporlarda gözlenen şişme durumu şekil 4.21’de gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Nemlendirmeden 1 ay sonraki şişme durumu

2 Ay boyunca yapılan gözlemlerde şişme olgusunun devam ederken bazı sporların çimlenmeye başladıkları görülmüştür (şekil 4.22).



Şekil 4.22. 2.Ay sonunda sporların çimlenmeye başlaması (oklar çimlenen sporların bazılarını göstermektedir.)

3. ay sonunda ise halen çimlenmenin erken safhalarında yavaş gelişimin devam ettiği gözlenmiş olup, *B. capillare* sporlarının diğer denemelerde gözlenen agresif gelişiminin gerçekleşmeyeceği kanaati oluşmuştur (şekil 4.23).

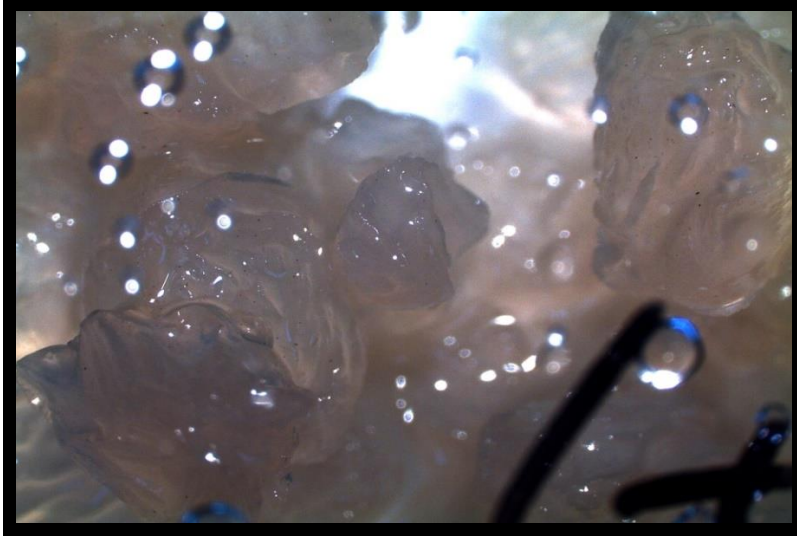


Şekil 4.23. 3. ay sonunda çimlenme sürecinde gelişme durumu

Gelişmedeki bu yavaşlamaya rağmen çimlenmenin başlaması bu geciktirilmiş büyümenin muhtemelen zamanla kırılacak bir fizyolojik tepki olduğunu akla

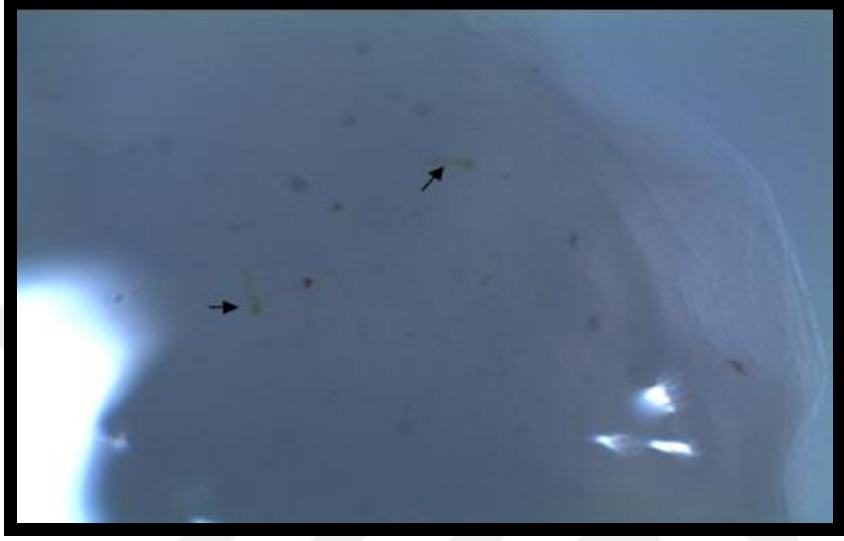
getirmiştir. *B. capillare* kurutma sonrası uygulamaya da olumlu yanıt vermiş olarak değerlendirilmiştir.

Dondurulan örnekler derin dondurucudan çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığına ulaşana değin beklenmiş ve yeniden nemlendirme işlemi bu noktadan itibaren uygulanmıştır. Bu materyalde de aynı kurutulan materyalde gözlenen şekil bozulması gözlenmiş ancak oluşan kalsiyum alginat yığınlarının dağılmış yığınlardan ziyade büzülmüş veya ezilmiş topaklar biçiminde eski küre formlarını anımsatan bir yapıya büründüğü gözlenmiştir (şekil 4.24).



Şekil 4.24. Dondurma sonrası yeniden nemlendirme ve boncukların durumu (Spor yığınları merkezin sol kısmında görülmektedir)

-20 °C $\pm$ 2 sıcaklıkta dondurulmuş örneklerde görülen sporların canlılığı çok belirgin olduğundan çimlenme sürecine erken gireceği düşünülerek gözlemler sıklaştırılmış ve 1 ay itibarıyla ilk protonemal ana ipliğin oluşumu gözlenmiştir (şekil 4.25).



Şekil 4.25. 1. ay itibarıyla protonemal ana ipliğin oluşumu

İkinci ay süresince daha çok sayıda spor protonemal iplik üretmeye başlamış ve 3. ay itibarıyla ilk kaulonemal dönüşümün izlerine rastlanmıştır (şekil 4.26).

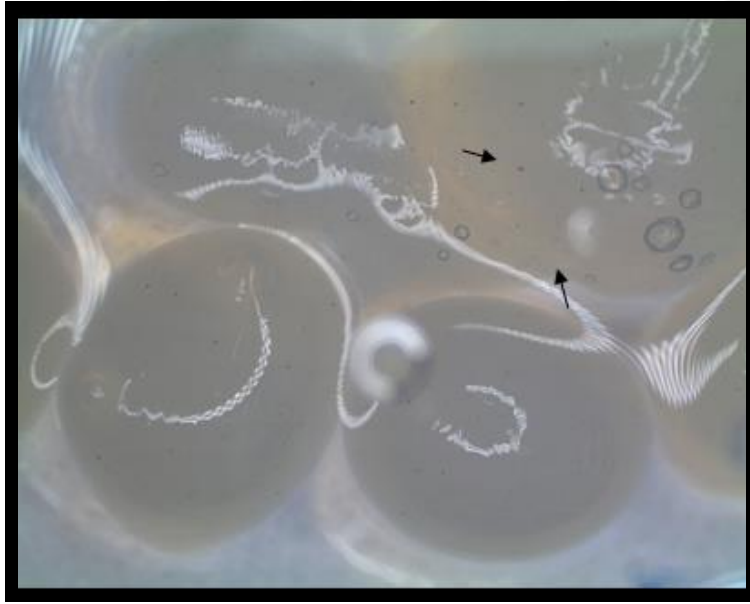


Şekil 4.26. Kaulonemal evrenin erken safhası

Her ne kadar kaulonemal evreye kurutma denemelerindekinden hızlı girmiş olsa da benzer fizyolojik tepki (duraksama) bu denemede de karşımıza çıkmıştır. Üç farklı koşul altında yapılan deneylerin ortak bulgusu *B. capillarespor*larının yüksek çimlenme kapasitesini ortaya koymaktadır. Gözlem süresinin yıllara dağılması durumunda tam gelişmiş bireylerin eldesi uzak bir ihtimal değildir. Çalışmamızın ana amacı incelediğimiz türlerin sınırlı zaman aralığında enkapsülasyon işlemine yatkınlıklarını denetlemek olduğundan, enkapsülasyonun *B. capillare* 'nin çeşitli amaçlarla propagasyona son derece uygun olduğunu ileri sürmek olasıdır.

4.10. *Hypnum cupressiforme*

Denemelerimizde kullanılacak olan sporlara enkapsülasyon yöntemi başarı ile uygulanmıştır (şekil 4.27).



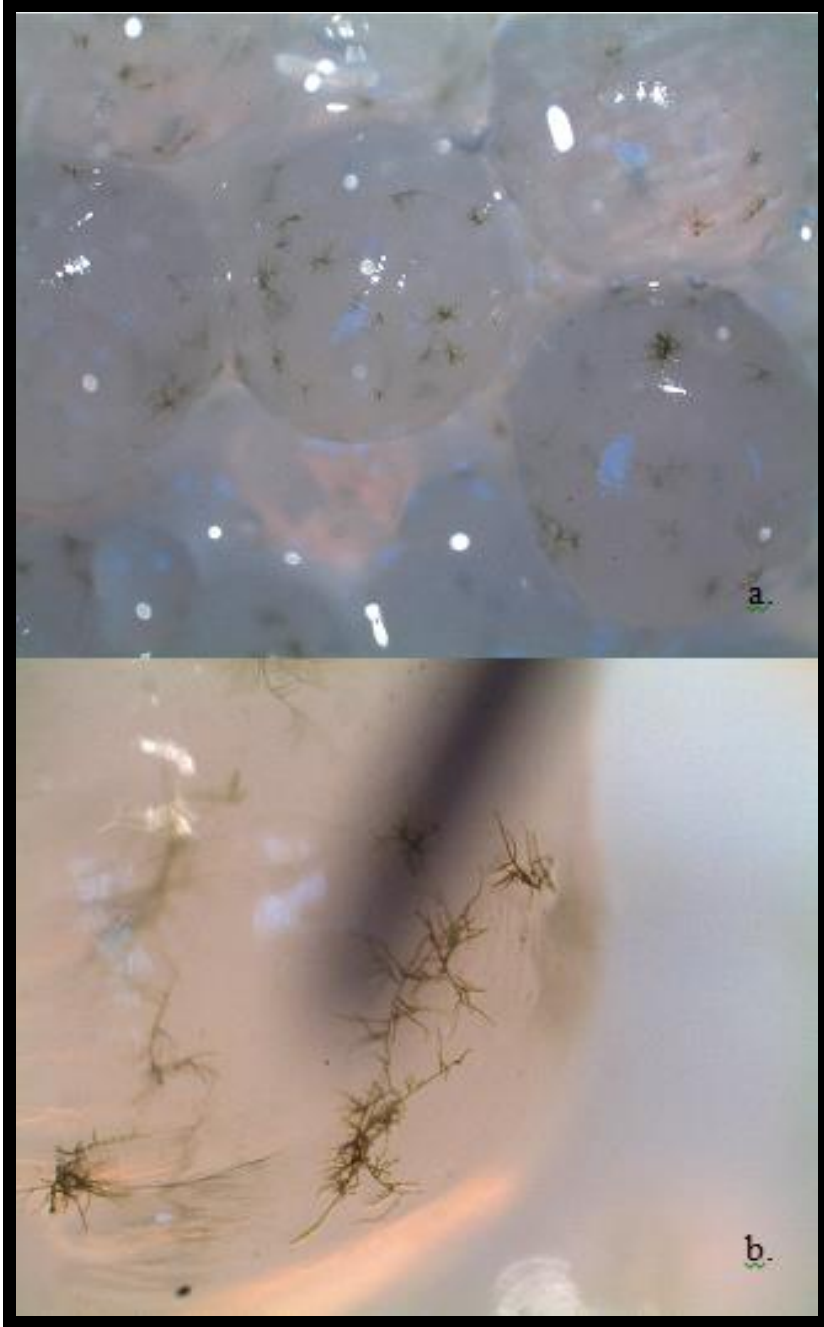
Şekil 4.27. Enkapsüle edilmiş sporlar (oklar boncuk içinde dağınık halde bulunan sporların bazılarını belirtmektedir.)

Enkapsüle sporların distile su içine alınması ile yapılan denemelerde bu tür ilk iki ay içinde çimlenme tepkisi verdiği gibi protonemal iplikleri de oluşturmaya başlamıştır (şekil 4.28).



Şekil 4.28. *H. cupressiforme*, 2 ay sonraki protonemal gelişim

İlk ekimi takiben geçen 4 aylık sürede boncuklarda yoğun protonemal iplikler gelişmiş ve bu gelişme 3 boyutlu olarak boncuğun her tarafını sarmıştır (şekil 4.29.a). Şekil 4.29. b de de görüldüğü üzere gelişen iplikler boncuğun dış yüzeyine doğru ilerlemiş (bir tür ışığa yönelme tepkisi) ve dışarıya uzanmaya başlamıştır. Bu tür gelişim, ilerleyen dönemde enkapsülasyonun sadece merkezi protonemal yapı dışında yeni iplikleri sarmayacağı ve giderek yok olacağına işaretler. Doğal olan ve beklenen de tam olarak bu durumdur. Enkapsülasyon sınırlı zaman aralığında diasporların dış etmenlerden korunduğu (kuruma vb.) ve uygun zamanda terk edeceği geçici bir sığınaktır.

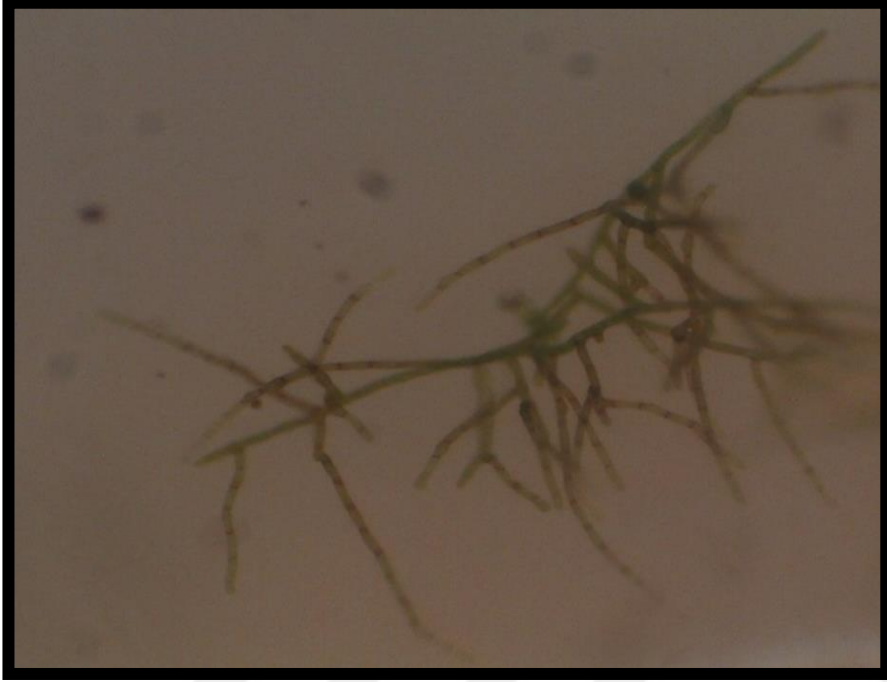


Şekil 4.29.a. *H. cupressiforme*, ileri derecede protonemal gelişim, b. Dış yüzeye gelişim gösteren protonemal iplikler, 4.ay

Beşinci ayda yapılan gözlemde, gelişimin ilerlediği ve bazı ipliklerin tamamen boncuk dışına çıktığı görülmüştür (şekil 4.30).Altıncı ay süresince de benzer gelişmeler devam etmiş dışarı uzanan iplikler kaulonemal evreye ilerlemeye başlamışlardır (şekil 4.31).



Şekil 4.30. *H. cupressiforme*, dışarı uzanan protonemal iplikler, 5.ay



Şekil 4.31. *H. cupressiforme*, kaulonemal gelişim detay 6.ay

Distile su ortamında yapılan denemeler ışığında *H. cupressiforme*'nin uygulanan yönteme uygunluğu ortaya çıkmıştır. Çimlenme gösteren sporların çokluğu ve bunların neredeyse eş zamanlı gelişme göstermesi bu türün enkapsüle sporlarının nispeten daha uygun sürede bir yeşil örtü halinde yayılmasına yol açacağı görülmektedir.

Nemli toprak denemelerinde *H. cupressiforme* sporları 45 günde çimlenmeye başlamış gelişmeler devam ederken bir fungal atak eldeki kültürü tamamen yok etmiştir. Ancak çimlenmenin başlamış olması ve ilk protonemal uzantıların görülmesi türün uygulamaya koşullar değiştirildiğinde kolayca olumlu cevap vereceğinin işareti olarak değerlendirilmiştir.

Kurutma işlemine alınan enkapsüle sporlar hiçbir çimlenme belirtisi göstermemişler ve nemlendirildiklerinde ölü oldukları kanısına varılmıştır.

Dondurma işlemine tabi tutulan örneklerde de çimlenme tepkisi alınamamış ve şişme dahil hiçbir gelişim gözlenmemiştir. Muhtemelen bu türün sporlarının derin dondurucuda kademeli soğutma yerine ani dondurma (sıvı azot) uygulamasına karşı test edilmeleri uygun olacaktır.

5.SONUÇ

Çalışmamız kapsamı içine alınan 11 tür üzerinde yapılan tüm deneylerin bir kısmı kontaminasyon, bir kısmı da muhtemel spor canlılığı sorunu gibi nedenlerle başarısız sonuç vermiştir (*Sphagnum* türleri, *E. vulgaris*, *P. ovatum*, *B. dichotomum*, *O. pumilum*). Geriye kalan 5 tür içinden en başarılı sonuçlar *B. capillare*'den alınmış, *H. cupressiforme* dondurma ve kurutma işlemi dışında başarılı olmuş, *T. barbuloides* toprak üzerinde gelişim göstermiş ve iki ciğer otu türü olan *C. conicum*, *M. polymorpha* ise distile su ortamında oldukça başarılı sonuçlar vermiştir.

Enkapsülasyon işleminin karayosunlarında sofistike sistemler ve pahalı kimyasallar kullanmaksızın kullanılabilirliğine ilişkin olarak elde edilen veriler umut vericidir. Denemelerin farklı diaspor kaynakları ve kısmen sterilizasyon uygulamasıyla daha başarılı sonuçlar vermesi beklenmektedir. Ancak bu çalışma henüz ülkemiz için bir öncü çalışma (çalışılan bitki grubu itibarıyla) olması nedeniyle elden geldiğince fazla sayıda türün çimlenme tepkilerini almak hedeflenmiş ve daha ileri gözlem ve deneysel uygulamalardan bir yüksek lisans tezinin sınırlamaları nedeniyle kaçınılmıştır. Buna rağmen çalışmalardan gelen sonuçlar bu uygulamanın karayosunları ve ilgili gruplarda uygun biçimde kullanılabileceğini göstermiştir. Yine çalışmaların ışığında enkapsülasyon için sterilizasyondan kaçınılarak uygulama yapıldığında en uygun materyalin sporlar ve gemmalar olduğu, gametofit fragmentlerinin üzerlerinde taşıdığı bir kısım mikroorganizma nedeniyle kontaminasyona daha açık olduğunu belirtmekte yarar vardır. Tamamen vejetatif olarak çoğalan bryofitler için gametofit fragmentlerinin ciddi sterilizasyon işleminden geçirilmesinin zorunluluğu aşıkardır. Dondurarak saklama ve koruma çalışmalarında (Rowntree ve Ramsay 2009, Mallon ve ark. 2007) ve diğer bitki grupları üzerine yapılan propagasyon çalışmalarında (*Aplodon wormskioldii* (Hornem.)R. Br., *Bartramia stricta* Brid., *Bryum calophyllum* R.Br., *B. rubens* Mitt., *B. schleicheri* Schwägr., *B. uliginosum*(Brid) Bruch & Schimp., *B. warneum* (Röhl.) Brid., *Buxbaumia viridis* (DC.) Mougl. & Nestl. , *Cyclodictyon laetevirens* (Hook. & Taylor)Mitt., *Ditrichum cornubicum* Paton, *Leptodontium gemmascens* (Mitt.) Braithw., *Micromitrium tenerum* (Bruch & Schimp.) Crosby, *Orthodontium gracile* (Wilson) Schwägr. ex Bruch & Schimp., *Orthotrichum pallens* Bruch ex Brid., *Rhynchostegium rotundifolium* (Scop. ex Brid.) Schimp., *Seligeria carniolica* (Breidl. & Beck) Nyholm, *Sematophyllum demissum* (Wilson) Mitt., *Tortula cernua* (Huebener) Lindb., *Weissia multicapsularis* (Sm.) Mitt., W.

squarrosa (Nees & Hornsch.) Müll. Hal., *Sphagnum fallax* H. Klinggr., *Jamesoniella undulifolia* (Nees) Müll. Frib.) süreç tamamen steril koşullar altında geliştirilmiş ve sonuçlar alınmıştır. Bu tip çalışmaların tehdit altında olan türlere yönelik veya özel araştırmalara materyal temini (genetik vb.) için yapıldığını ve ciddi maliyet ve özel ortam gereksinimi gösterdikleri ortadadır. Ancak, bu yolla elde edilen materyalle ticari yönlü hasata maruz türlerde tacir veya kullanıcı taleplerini karşılama olanağı yoktur. Eldeki mevcut bilimsel yöntemlerin daha düşük maliyet ve özelleşmiş iş gücü gereksinimi koşullarında çalışabilen versiyonlarının da üretilmesine ihtiyaç vardır. Konumuz özelinde çeşitli ornamental amaçlarla tüm Dünya’da hasat edilen biryofit türlerinin doğadaki kayıplarının geri verilmesinde veya talebin diğer yollarla karşılanarak doğal örtülerin korunmasında hasatçıların veya korumacıların kullanabileceği bir yöntemin oluşturulmasında büyük yarar vardır. Enkapsüle edilmiş materyalin saklama süresinin standardizasyonu, bu süreç zarfında oluşan ölüm veya canlı kalabilme olgularının değerlendirilmesi, hangi türlerin bu amaçla kullanıma uygun olduğunun bilinmesi-belirlenmesi, enkapsüle materyalin çimlenme ve ileri düzeyde gelişime devam edebilme özelliklerinin bu düşük maliyetli uygulamalar altında anlaşılması gibi bilgiler ileride ortaya çıkarılabilecek yöntemlerin temel gereksinimleri olacaktır. Bu sayede bahçesine yosun bahçesi eklemek veya karayosunlarıyla sepet aranjmanlarını doldurmak isteyen tüketici ve üreticiler doğal ortamlara daha az zarar vererek faaliyet gösterebileceklerdir.

Araştırmamız sonunda *B. capillare* ve *H. cupressiforme*’nin minimum laboratuvar gereksinimi koşullarında bu uygulamaya yatkınlığı ortaya konmuş ve geri kalan 3 türün (*C. conicum*, *M. polymorpha*, *T. barbuloides*) de uygulamaya pozitif tepkileri alınmıştır. Çalışma sırasında karşılaşılan kontaminasyon gibi engelleyici olguların bertaraf edilmesi için yine düşük uygulama maliyeti ve teknik kapasite gerektiren alternatif yöntemler sonraki çalışmaların konusu olmalıdır. Kalsiyum alginat boncuklar içine alınmış sporların *B. capillare* ve *H. cupressiforme*’de verdiği neredeyse eş zamanlı çimlenme tepkisi bu ve bunlara benzer türlerin istenen mekanlarda propagasyonu için umut vericidir. Bu süreçte hiçbir hormon veya besleyici desteğinin verilmemiş olması bu iki türün biyolojik kapasitesinin bu anlamda gücünün ifadesidir. Özellikle *H. cupressiforme*’nin ülkemizde en yoğun hasat edilen karayosunu türü olması bu yolla hasatın yarattığı veya yaratacağı sorunlara karşı başka çözümler üretilebileceğine ilişkin bir umut vermektedir.

C. conicum ve *M. polymorpha*'nin gösterdiği gelişme hızı da, bu türlerin süs bahçelerinin oluşturulmasında kullanılma potansiyeli olan iki higrofit olması sebebiyle önemlidir. Zira günümüz modern yaşamında yapay doğal ortamlar alışılmışın ötesinde ilgi çekmekte ve bu alanda bir çok önemli mekanda moss wall veya moss roof gibi uygulamalara rastlanmaktadır. Bu uygulamalarda kullanılacak karayosunu veya genel adıyla biryofit materyalinin ekonomik koşullara sahip kültürlerden elde edilmesi doğayı koruma adına önemli bir katkı olacağı düşüncesini taşıdığımızdan; çalışmamız bazı biryofit türlerinin enkapsülasyon yoluyla saklanması başlığıyla oluşturulmuş ve çalışma süresince bu yolla saklanan materyalin tekrar çoğalabilme özellikleri gelecekte biryofit kültürlerini bu amaçla oluşturabilmenin yollarını aramak üzere incelenmiştir.

KAYNAKLAR

- Blandino, A., Macias M., Cantero D. 1999. Formation of calcium alginate gel capsules: influence of sodium alginate and CaCl_2 concentration on gelation kinetics, **Journal of Bioscience and Bioengineering** Vol.88, No.6, 686-689.1999.
- Blandino, A., Macias M., Cantero D. 2000. Glucose oxidase release from calciumalginate gel capsules, **Enzyme and Microbial Technology** 27 319-324.
- Burch, J. 2003. Some mosses survive cryopreservation without priorpretreatment. **The bryologist** 106(2): 270-277.
- Datta, K. B., Kanjilal B., De Sarker D. 2001. Artificial seed technology: Developmentof a protocol in *Geodorum densiflorum* (Lam) Schltr.- An Endangered orchid. **Current Science** 76: 1142-1145.
- Edward O., Guerrant Jr., Kayri Havens, Mike Maunders 2004. Ex situ plantconservation supporting survival in the wild. Island Press, Washington, Covelo, London.
- Erdağ, A.; Kırmacı M. 2006. Hasat ve ihraç edilen Türkiye biryofitlerinin güncel durumu, **TÜBİTAK**, TBAG.24 (104T126).
- González-Benito, M. E., Pérez C., Viviani A. B. 1997. Cryopreservation of nodalexplants of endangered plant species (*Centaurium rigualii* Esteve) usingthe encapsulation- dehydration metod, **Biodiversity and Conservation** volume 6, issue 4, 583-590.
- Kikowska, M., Thiem B. 2011. Alginate-encapsulated shoot tips and nodalsegments in micripropagation of medicinal plants. A review. **Herbapolonica**, vol. 57, no.4, 45-57.
- Kim YH, Janick J (1989). ABA and polyox encapsulation of high humidityincrease survival of desiccated somatic embryos of celery. **Horticulturel Science**, 27: 674-676.

Kitto SK, Janick J (1982). Polyox as an artificial seed coat for asexual embryos. **Horticulture Science**, 17: 488-490.

Kitto, ve Janick 1985a. Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. **Journal of The American Society Horticulture Science**, 110: 277-282.

Kitto, ve Janick 1985b. Hardening treatments increase survival of synthetically coated asexual embryos of carrot. **Journal of The American Society Horticulture Science**, 110:283-286.

Longton, R. E. 1981. Inter – population variation in morphology and physiology in the cosmopolitan moss *Bryum argenteum* Hedw. **Journal of Bryology**, 11: 501-520.

Longton, R. E. 1988. The biology of polar bryophytes and lichens. Title1. Polar regions, Bryophytes: pp 13-64, Cambridge, New York.

Mallón, R., Barros P., Luzardo A., González M. L. 2007. Encapsulation of mossbuds: an efficient method for the *in vitro* conservation and regeneration of the endangered moss *Splachnum ampullaceum*. **Plant cell tissue organ culture** 88: 41-49.

Murashige T (1977). Plant cell and organ culture as horticultural practice. **Acta Horticulturae** 78: 17-30.

Redenbaugh, K., Fujii J. A., Slade D. 1988. Encapsulated plant embryos. Biotechnology in agriculture, (Redenbaugh, K.; Fujii, J. A.; Slade, D. Eds.), Plant Genetics, pp 225-248, USA.

Redenbaugh, K., Fujii J., Slade D., Viss P., Kossler M. 1991. Artificial seeds- Encapsulated somatic embryos. In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry, high-tech and micropropagation. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 395–416.

- Reed, B. M., Sarasan V., Kane M., Bunn E., Pence V. C. 2011. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 47: 1-4.
- Ros, R. M., Werner O. & Pérez-Álvarez J. R. 2013. Ex situ conservation of rare and threatened Mediterranean Bryophyte, **Flora Mediterranea** 23: 223-235.
- Rowntree, J. K., Ramsay M. M. 2005. Ex situ conservation of bryophytes: progress and potential of a pilot Project, **Boletín de la Sociedad Española de Briología** 26-27: 17-22.
- Rowntree, J. K., Ramsay M. M. 2009. How bryophytes came out of the cold: successful cryopreservation of threatened species. **Biodiversity and Conservation** 18: 1413-1420.
- Rowntree, J., Pressel S., Ramsay M. M., Sabovljevic A., Sabovljevic M. 2011. In vitro conservation of European bryophytes. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 47: 55-64.
- Saiprasad, G. V. S. 2001. Artificial seeds and their applications. **Resonance**, 6: 39-47.
- Sabovljević, M., Vujčić M., Pantović J., Sabovljević A. 2014. Ecology and conservation of bryophytes, Bryophyte conservation biology: in vitro approach to the ex situ conservation of bryophytes from Europe. **Plant Biosystems**, vol. 148, No. 4, 857-868.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Özge Muslu
Doğum yeri ve Tarihi : İzmir, 15.08.1990

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi 2008-2012
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi,
Fen Bilimleri enstitüsü,
Biyoloji Ana Bilim Dalı, 2013-2015

İŞ DENEYİMİ

	YIL	GÖREV
Adnan Menderes üniversitesi	2012 (Halen)	Biyolog
Uygulama ve Araştırma Hastanesi		

İLETİŞİM

E-posta Adresi : ozgemuslu@windowslive.com

Tarih : 11.01.2016