

Derleme Makale

FUNGUS VE FUNGAL MATERYALLERİN UZUN DÖNEM SAKLANMASI, KORUNMASI VE GERİ KAZANIMI ÜZERİNE VARILAN SON GELİŞME VE YÖNTEMLER**Murat DİKİLİTAŞ^{1*}, Y. Zekai KATIRCIOĞLU², H. Handan ALTINOK³****ÖZET**

Genel olarak funguslar her yerde bulunurlar ve doğal veya suni olarak hazırlanmış bir dizi besin maddelerini kullanarak çok geniş bir çevrede büyürler. Bazı fungusların izole edilmesi ve yetiştirilmesi çok kolay iken bazıları konukçuya özel olduğundan kültür ortamında büyümelerini engelleyen bir takım ilave maddelere ihtiyaç duyarlar. Günümüzde araştırmacıların ihtiyaç duydukları fungal materyallere hızlı ve güvenilir bir şekilde ulaşması, onlara hem zaman hem de izole etmek için harcanacak enerji kaybının önlenmesini sağlayacaktır. Araştırmacılar, fungal materyallere her ne şekilde ulaşırlarsa ulaşınsınlar, fungal materyallerin virulensliklerini hala muhafaza ediyor olmaları çok büyük önem arz etmektedir. Bu bakımdan fungusların muhafaza edildikleri ortamlarda canlılıklarını kaybetmemeleri ve farklı karakterlere sahip olan ırklarının geri kazanımları sırasında dejenerasyon ve kontaminasyona uğramamaları çok önemlidir. Fungusları kültür ortamında muhafaza etmek için çok çeşitli metotlar vardır. Bu metotların hepsinin ortak yanı, fungusların izole edildikleri durumdaki tazeliklerinin korunmasını amaçlar. Ülkemizde kaliteli bir “fungus kültürleri bankası”nın oluşturulması eldeki kültürlerin sayısına, bu alanda harcanacak emeğe, zamana ve en önemlisi maddi imkanlara bağlıdır. Bu derlemede dünyanın önde gelen laboratuvarlarının kullandığı farklı metotlar ile geniş kullanım ve uygulama özelliğine sahip olan ve kısa sürede araştırmacılara güvenle fungal materyalleri sağlayan metotların değerlendirilmesi yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Fungus, fungal partiküller, fungusların saklanması, fungusların korunması, fungus kültürleri.

LATEST DEVELOPMENTS AND METHODS ON LONG TERM STORAGE, PROTECTION, AND RECYCLE OF FUNGI AND FUNGAL MATERIAL**ABSTRACT**

In general, fungi inhabit everywhere and grow in a wide variety of environments utilizing a diverse array of substrates both natural and artificial. Some are host specific thus they either require additional substances that prevent them being grown in culture media or they grow on media that are formulated from the natural materials from which they were isolated. Supplying rapidly and safely fungal materials required by researchers would enable them to gain time and prevent them from spending extra energy for fungal isolation. It is quite important to keep the virulence of fungal isolates under preservation for the researches who reach the fungal materials in anyway. Under preservation, it is quite important to have viable cultures as well as avoiding of strain deterioration and minimizing contamination within the fungal population during regeneration. There are several methods of maintaining fungi culture collections by which they aim to keep fungi as fresh as possible in which they were at the time of isolation. Establishing of a “fungi culture collection bank” in our country depends on the available culture collections, time and effort as well as financial support. In this review, several methods used by accredited laboratories around the globe and the commonly used and practised methods enabling rapid and safe distribution of fungal materials to the researches were evaluated.

Key Words: Fungus, fungus particules, fungus storage, fungus preservation, fungi cultures.

* Sorumlu yazar: m.dikilitas@gmail.com

¹Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Ş.Urfa

²Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Dışkapı-Ankara

³Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Kayseri

GİRİŞ

Günümüzde araştırmacıların ihtiyaç duydukları fungal materyallere hızlı ve güvenilir bir şekilde ulaşmaları, onların hem zaman hem de izole etmek için harcayacakları enerji kaybını önleyecektir. Ancak araştırmacıların fungal materyalleri her zaman doğadan elde etme imkanları yoktur, bu yüzden araştırmalarda yaygın olarak kullanılan fungusların iyi koşullarda muhafaza edilmeleri ve yeniden kullanım için hazır hale getirildiklerinde ilk günkü özelliğini koruyor olmaları çalışmaların güvenilirliği açısından çok önemlidir. Kültürlerin uzun dönem canlı ve stabil kalmaları gelişen biyoteknolojik çalışmalar için de çok önemlidir. Fungusları uzun süre muhafaza etmek için çok çeşitli metotlar kullanılmaktadır. Bu metotlarda ortak özellik, fungusların izole edildikleri andaki virulensliğini ve canlılığını korumayı amaçlar. Araştırmacıların fungal kültürlere çok hızlı bir şekilde ulaşmaları için bu fungusların iyi koşullarda saklanmaları ve bunun için bir fungus kültürleri bankasının oluşturulması gerekmektedir. Böyle bir bankanın oluşumu için maddi destek yanında pratik ve masrafi az tekniklerin de kullanımı önemlidir. Bu derlemede dünyanın çeşitli laboratuvar ve enstitülerinde kullanılan fungal materyalleri muhafaza tekniklerinin yanı sıra imkanları kısıtlı olan laboratuvar ve araştırmacıların kullandığı yeni ve modifiye edilmiş metotların özelliklerine yer verilmiş ve karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir.

Fungusların her zaman kullanıma hazır tutulmaları ya kültürleri periyodik olarak alt kültüre almak ya da hastalıklı bitkileri izolasyona hazır halde tutmakla mümkün olabilmektedir. Burada önemli olan husus kültür ortamlarının çok dikkatli seçilmesidir. Örneğin, bazı funguslar spesifik yetiştirme ortamlarını tercih ederlerken, bazıları ise uzun süre aynı ortamda muhafaza edildiklerinde dejenere olarak patolojik özelliklerini kaybederler, dolayısı ile zaman içinde yetiştirme ortamlarının değiştirilmesi zorunluluk arz eder. Bu bakımdan kültürleri uzun süre devam ettirmek hem masraflı hem de virulens kaybı ve dejenerasyondan dolayı istenmeyen bir durumdur.

Kullanılacak kültür ortamları araştırmacının tercihi ile birlikte tecrübe ile de dönem içerisinde değişiklik göstermektedir. Aynı amaç için olsa bile kimi araştırmacılar Dox ortamını PDA (Patates Dextrose Agar) ortamına tercih edebilmektedirler. Yine hazır satılan ortamlar ile

araştırmacıların ham maddeleri kullanarak hazırladıkları ortamlar da amaca göre değişmektedir. Çünkü ortamlardaki en ufak bir değişiklik koloni yapısını, rengini ve hatta belirli bir yapının oluşup oluşmayacağına kadar birçok kriteri etkileyebilir (Dikilitaş, 2003). Birçok fungus PDA üzerinde gelişebilir ancak bu ortam kimi funguslar için çok zengin olabilir ve sporulasyondan ziyade misel gelişimini teşvik edebilir. Böyle durumlarda besin içeriği açısından oldukça fakir olan Patates Carrot (havuç) Agar (PCA) kullanılarak sporulasyon teşvik edilebilir (Smith, 2002). Ayrıca, Petri kablarının yakın UV ışık (300-380 nm) altında tutulmaları ile de sporulasyon teşviki mümkün olmaktadır (Smith ve Onions, 1994; CABI Bioscience UK Centre, www.cabi.org).

Funguslar çeşitlilik açısından çok geniş bir yelpazeye sahip canlılardır. Yaklaşık olarak doksan bin tür tanımlanmakta ve bunların her yıl 1500 kadarı isimlendirilerek bu listeye eklenmektedir (www.cabi.org). Hawksworth (1991)'a göre yaklaşık olarak 1.5 milyon fungus türünün var olduğu ve yaklaşık bir bu kadar türün de keşfedilmeyi beklediği tahmin edilmektedir. Bu fungus grupları içinde patolojik ve mikolojik açıdan çok önemli türler mevcut olup, laboratuvar çalışmaları yapılmak istendiğinde hem hazır olmaları hem de orijinal ırkların korunması açısından bunların uzun süre sağlıklı koşullarda saklanmaları büyük önem taşımaktadır. Bunun için öncelikle aşağıdaki hususların yerine getirilmesi gerekmektedir.

Fungus Gelişiminde Dikkat Edilmesi Gereken Faktörler:

Kültür akarları:

Akarlar (çoğunlukla *Tyroglyphus* ve *Tarsonemus spp.*) fungus kültürlerinde çok yaygın ve bulaşması çok hızlı olan canlılardır. Akarlar, organik materyaller ve toprak üzerinde bulduklarından dolayı laboratuvarlara girişleri çok kolay olup, fungus kültürlerini yiyerek zarar verirler ve üzerinde taşıdıkları fungal sporlar veya bakterilerle dejenerasyona ve kontaminasyona neden olurlar. Fungus kültürleri üzerinde bulunan akarlar genellikle çıplak gözle küçük beyaz noktacıklar halinde görüldüklerinden fungal hifleri arasında uzun süre farkedilmeyebilirler. Fungal kültürlerin bulunduğu ortamda yüksek sıcaklık ile birlikte nem de sağlanmış ise çok çabuk çoğalırlar ve yayılırlar. Böyle durumlarda birçok fungal

kültürler daha farkına bile varılmadan elden çıkmış olurlar (Smith, 2002).

Akarları kültürlerden uzak tutmak için mekanik ve kimyasal bariyerler:

İçinde fungal kültürleri ihtiva eden şişeler, tüpler ya da Petri kapları etrafı su ya da yağ ile çevrilmiş üzeri jelimsi yapışkan bir platform üzerinde tutulduklarında hareket halinde olan akarları tutmakta önemli rol oynarlar. Kültür şişeleri ya da ağzı pamuk ile tıkanmış olan tüpler ayrıca sigara kağıdı ile sarıldıklarında akaların kültürlere sızması büyük ölçüde engellenmiş olacaktır. Bu işlem için bir sigara kağıdı ortadan ikiye ayrılır ve 180°C deki bir fırında 3 saat sterilize edilir, şişelerin veya tüplerin boyun kısmı bakır sülfat zıncı (20g jelatin 100 ml suda çözünür ve sonra 2 g bakır sülfat ilave edilir) ile mühürlendikten sonra sigara kağıdını bunun üzerine yapıştırılır (Smith, 1996; CABI Bioscience UK Centre, www.cabi.org). Şişenin ağız kısımlarında artan sigara kağıtları alev ile yakılır ve tüpler depolanır. Ayrıca kısa dönem içinde kullanılacak Petri kaplarında ya da şişelerde akar sorununu azaltmak için, kültürlerin bulunduğu kapların Parafilm ile çevrilmesi de faydalı olacaktır (Dr. Mike Milton ile kişisel görüşme, University of Wales, Swansea, 2007). Düzenli olarak kullanılan kültürlerde, 4-8°C arasında soğukta depolama kesinlikle akar yayılmasını azaltır ancak öldürmez. Eğer akar ile bulaşık kültürlerin yedeği yok ise ve yeniden izole etme durumu söz konusu değilse, kültürler en az 3 gün boyunca derin dondurucuda (-18°C) depolanmalıdır. Bu işlem hem erginleri hem de yumurtaları öldürdüğü için iyi sonuç vermektedir (Dr. Mike Milton ile kişisel görüşme, 2007; Smith ve Onions, 1994).

Kültür Koleksiyonlarının Korunması:

Burada asıl amaç, koleksiyon kaynaklarının morfolojik, fizyolojik ve genetik değişikliğe uğramadan canlı tutulmasını sağlamaktır. Fungusların korunmaları soğukta muhafazadan, sürekli düşük metabolik hızda çoğaltılmaya kadar geniş bir yelpazeyi içerir. Dünya Kültür Koleksiyonu Fedarasyonu (WFCC) "Mikroorganizmaların Toplanması ve Oluşturulması" adlı rehberde gerekli kuralları belirlemiştir (Hawskworth ve ark., 1990).

Fungusları tükenmekte olan yetiştirme ortamlarından yeni ortamlara sık sık alarak sürekli yetiştirme veya alt kültüre almayı geçiktirici teknikler kullanarak uzun süre

muhafaza etmek veya kültürleri derin dondurucuda (-18°C), yağ veya su altında, ya da sporları silica jel üzerinde kurularak saklamak gibi birçok yol mevcuttur (Nakasone ve ark., 2004).

Funguslarda metabolizmanın yavaşlatılması veya durdurulması uzun süreli saklama için en ideal yoldur. Bu durum hücrelerde bulunan suyun dehidrasyonu veya dondurulması ile mümkündür. Fungal materyaller -70°C de muhafaza edildiklerinde metabolizmaları minimum düzeye inmekte, -139°C ve daha altına inildiğinde ise hiç biyokimyasal reaksiyon oluşmamakta ve buz kristallerinin görülme ihtimali ortadan kalkmaktadır (Pasarelli ve McGinnis, 1992; Nakasone ve ark., 2004).

Fungusları saklama yollarından başlıcaları aşağıda sunulmuş olup avantaj ve dezavantajları değerlendirilmiştir.

Filtre kağıdı üzerinde saklama:

Bu yöntem konidi veya misel oluşturan tüm funguslar için kullanılabilir. İlk olarak Correll ve ark (1986) tarafından kullanılan bir yöntem olup *Fusarium oxysporum* izolatları üzerinde denenmiştir. Fungus, su agarı üzerine ya tek mikrokonidi veya hif olarak kültüre alınmış daha sonra PDA üzerine transfer edilmiştir. Her bir fungus izolatu için 7 cm çapında steril Whatman No.3 filtre kağıtları PDA yüzeyine yerleştirilmiş, kütle halinde fungal materyallerin kağıt üzerine (yaklaşık 1-2 gün) kolonize olması sağlanmış ve kağıt diskler PDA yüzeyinden alınarak boş bir Petri kabında hava yardımı ile kurutulmaya bırakılmışlardır. Diskler daha sonra 2-3 mm² lik parçalar halinde steril, ağzı vida kapaklı küçük tüplere konularak 4°C de depolanmışlardır. Yine, Fong ve ark (2000) modifiye edilmiş filtre kağıt metodunu kullanarak *Fusarium*, *Ganoderma* ve *Marasmiellus* gibi türlerini sağlıklı bir şekilde korumuşlardır.

Alt kültüre alarak saklama:

Fungusları Petri kablarında agar ortamında sürekli alt kültüre alarak canlılığını devam ettirmek fungusları saklamanın en kolay yollarından biridir. Aslında çok pahalı bir yöntem olmamasına rağmen alt kültür için ortamların hazırlanması ve fungusları bir kültürden diğerine almak için işgücü gerekmesi yöntemin dezavantajlarından sayılabilir. Ayrıca her fungus grubunun aynı anda alt kültür ihtiyacı hissetmemesi (bazı funguslar 2-4 hafta, bazıları 2-4 ay ve bir kısmı da 12 ay alt kültüre alınmadan

muhafaza edilebilirler) işgücü ihtiyacını arttıracaktır. Fungusların çok sık alt kültüre alınması bazı sakıncaları da beraberinde getirmektedir. Özellikle alt kültüre alınma sırasında fizyolojik ve morfolojik karakterler değişime uğrayabilir, havadan ya da ortamdan kontaminasyona maruz kalabilir, akar bulaşma olasılığı artabilir, ayrıca çok sık kontrol edilmesi gerektiğinden zaman kaybına da neden olur. Yine çok sık transferlerin yaşandığı durumlarda orjinal kültür yerine kontamine olan funguslar ya da genetik olarak değişikliğe uğrayan kültürler de transfer edileceğinden orjinal kültür kaybı çok sık yaşanır. Öte yandan çok sık transferin aslında avantajlı tarafı da vardır. Bu yöntemle kültürler uzun yıllar hayatta kalabilirler, metot çok ucuz olup, herhangi bir ekipman gerektirmez ve fungusun geri kazanılması çok kolaydır, ayrıca az sayıda kültür koleksiyonu olan laboratuvarlar için uygun bir saklama yöntemidir. Ancak 12 ayı geçen süreler için uygun bir saklama yöntemi değildir (Dikilitaş, 2003).

Fungusları 4-7°C'de buzdolabında ya da soğuk odada saklamak 2-4 aylık transfer süresini 4-6 aya kadar çıkarabilir. Hatta, *Verticillium* fungusu ile yapılan çalışmalarda fungusun derin dondurucuda (-20°C) 5 yıl saklanabildiği ve yeniden izole edildiğinde de canlılıklarını koruduğu belirlenmiştir (Dikilitaş, 2003; Dr Chris Smith ile kişisel görüşme, 2007).

Çizelge 1'de çeşitli kaynaklardan alınan fungusların oda sıcaklığında, buzdolabında ve derin dondurucuda saklama ve alt kültüre alma sürelerine yer verilmiştir.

Odun parçaları üzerinde saklama:

Bu yöntemle orman ağaçları üzerinde enfeksiyon yapan funguslar odun kıymıkları ya da kürdanlar üzerinde başarılı bir şekilde saklanabilir (Singleton ve ark., 1992). Bazı Basidiomycetes ve Ascomycetes sınıfına ait funguslar bu şekilde 10 yıla kadar saklanabilmişlerdir. Ancak bunun için fungusun odun parçacıklarını tamamen kolonize etmesi gerekmektedir. İnokule edilmemiş odun parçacıkları (1 cm uzunluk x 0.5 cm çap) %2 lik malt ekstrakt içinde karıştırılarak (60 adet/100 ml malt ekstrakt ortamı) 20 dakika boyunca 121°C'de otoklav edilir, karışım 24 saat sonra birkez daha otoklav edilir. Yaklaşık 15 adet parçacık ortam içinden alınıp drene edildikten sonra Petri kaplarında malt ekstrakt agar üzerinde gelişen fungal ortama bırakılır. Petri kutuları daha sonra Parafilm ile kapatılır ve fungusun

parçacıklar üzerinde gelişmesi beklenir. Yaklaşık 10-15 gün sonra odun parçacıkları 6-7 ml %2'lik malt agar içeren steril test tüplerine aktarılır. Test tüpleri ağzı pamuk ile kapatıldıktan sonra 1 hafta boyunca inkube edilir, daha sonra pamuk çıkartılarak yerine Parafilm veya alüminyum ile kaplanır ve 4°C'de saklanır. Fungusları geri kazanmak için, odun parçacıkları tüplerden alınarak taze hazırlanmış agar ortamına konur ve kullanılan tüpler tekrar mühürlendikten sonra buzdolabında saklanır (Delatour, 1991).

Tahıl taneleri üzerinde saklama:

Sclerotinia, Magnaporthe, Leptosphaeria ve *Rhizoctonia* gibi funguslar yulaf, arpa, çavdar gibi taneler üzerinde uzun yıllar saklanabilmektedir (Singleton ve ark., 1992). Örneğin, *Rhizoctonia* türlerini saklamak için arpa, buğday, yulaf gibi taneler chloramphenicol içeren (250 mg /ml) ortamda bir gece tüpler içinde bekletilmiş ve su kısmı döküldükten sonra taneler 1 saat boyunca 121°C de otoklav edilmiş ve otoklav 2 gün sonra tekrarlanmıştır. Daneler daha sonra ağzı vida kapaklı tüplere alınarak tekrar otoklav edilmiştir. Tüpler daha sonra kültürlerin kenarlarında kesilen funguslar ile inokule edilmişler ve 23-27°C de 10 gün boyunca inkubasyona bırakılmışlardır. Kültürler daha sonra desikkasyon çemberinde iyice kurutulmuş ve tüplerin ağzı daha sonra sıkıca kapatılarak üzeri Parafilm ile kaplanmış ve -25°C de depolanmışlardır (Sneh ve ark., 1991).

Kumda saklama:

Bu yöntemle toprak kökenli funguslar uzun yıllar saklanabilmektedir. Yaklaşık olarak 60 ml'lik şişelerin 2/3'ü kum ve toprak ile doldurulur ve nem oranının %20 olmasına dikkat edilir. Bu şekilde şişeler 20 dakika olarak 121°C de otoklav edilir. Şişeler soğumaya bırakıldıktan sonra tekrar sterilize edilir. Daha sonra şişelere steril su ilave edilerek Petri kaplarında gelişen fungal kolonilerin yüzeyinden, gelişen funguslar alınır ve en az 5 ml'lik spor veya misel solusyonu hazırlanır. Bu solusyondan 1 ml alınarak şişelere ilave edilir. Yaklaşık 2 hafta oda sıcaklığında inkubasyona bırakıldıktan sonra, şişeler gevşekçe kapatılır ve 4°C'de depolanır. Fungusların geri kazanımı ise şişelerden alınan toprak parçalarının taze hazırlanmış agar ortamına serpilmesi ile elde edilir (Sneh ve ark., 1991).

Eğik agarda saklama:

Fungal kültürler test tüp ya da şişelerde genellikle agar içeren ortamlarda yıllarca saklanabilirler. Ancak bu gibi durumlarda fungusun iyi gelişen kısmı eğik agara alınmalı ve kontaminasyon ve genetik varyantların transferinden kaçınmak için özen gösterilmelidir. Genellikle 15 ml hacminde olan küçük şişelere Dox veya PDA ortamı hazırlanarak, agar üzerinde büyüyen misel ya da sporlar transfer edilir. Gelişme ve kontaminasyon durumlarının kontrolü için şişeler 3 hafta kadar oda sıcaklığında inkube edilir daha sonra uygun olanlar buzdolabında saklanırlar (Dikilitaş, 2003).

Agar şeritler üzerinde saklama:

Bu yöntemle saklanmak istenen *Pythium*, *Rhizoctonia* ve bazı Basidiomycetes sınıfına ait funguslar 18 ay muhafaza edilmişler, Ascomycetes sınıfına ait funguslar ise 5 yıl kadar saklanabilmişlerdir (Nuzum, 1989). Fungal kültürler uygun ortamlarda Petri kaplarında geliştikten sonra koloninin kenar kısımlarından 1 cm uzunluk kesilip steril bir Petri kabına yerleştirilir ve oda sıcaklığında yaklaşık bir hafta inkube edildikten sonra kurumuş agar parçaları steril ampüllere yerleştirilerek vakum altında kurutulur ve daha sonra mühürlenerek oda sıcaklığında saklanır. Fungusların geri kazanımı için agar şeritler taze ortama alınarak gelişimi sağlanır.

Mineral yağ altında saklama:

Eğik agarda saklanan funguslar şişelerde ya da tüplerde 30°'lik eğim altında 1 cm kalınlığında mineral yağ (sıvı parafin) altında bırakılırlar ise fungal materyallerde su kaybı az olacağından ayrıca ortamda bulunan oksijen de azalacağından metabolizma yavaşlayacak ve funguslar daha uzun süre saklanabileceklerdir. Bunun için yağ (yoğunluğu 0.830-0.890 g/ml) 121°C'de 15 dakika olarak iki kez otoklav edilmelidir (Lopez Lastra ve ark., 2002). Eğer yağ kalınlığı çok kalın olursa funguslar yeterli oksijen alamaz ve canlılıklarını kaybederler, derinlik az olur ise, kültürlerde kuruma meydana gelebilir. Bunun için hazır satılan mineral yağları kullanmak daha uygun olacaktır (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). 100 x 10 mm lik ortam içeren test tüplerine fungus inokule edildikten sonra kültürlerin sporulasyonu için, genelde 7-10 günlük bir süre verildikten sonra üzeri 1 ml'lik mineral yağ ile kaplanır. Yağ altında saklanmış

fungusların geri kazanımı, fungusun çok az bir kısmının ya da kolonisinin bir iğne yardımı ile alınması ve iğne ucundaki yağın damlatılarak geriye kalan kısmın uygun bir agar ortamına çizilmesi ile elde edilir. Bazı araştırmacılar mineral yağ altında kalan fungal blokları alarak 10-15 saniye 10 ml saf su içinde Petri kabında yıkayarak yağların uzaklaşmasını sağlamışlar ve agar blokları taze ortama alarak fungusların geri kazanımına çalışmışlardır (Lopez Lastra ve ark., 2002). Eğik agarlarda dikkat edilecek bir diğer husus da, eğik agarın tam ortadan inokule edilmesidir, böylece fazla olan yağ şişenin altına ineceğinden fungusun havasız kalması engellenmiş olur.

Bu yolla saklanan fungusların çoğu yaklaşık 40 yıl canlı kalmışlardır. Kurulması ve kullanımının ucuz olması ve akar probleminin çok fazla görülmemesi nedeni ile kısıtlı imkan ve kaynakları olan laboratuvarlar için önerilebilen bir metottur.

Mutant ırkların üretilmemesi için, fungusların iki yıldan fazla bu yolla saklanmaması tavsiye edilmektedir.

Suda saklama:

İngiltere-CABI Bioscience araştırma enstitüsünde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri olup, birçok laboratuvarlarda da tercih edilen metodlardan biri olmuştur (Lopez Lastra ve ark., 2002; Diogo ve ark., 2005).

Hazırlanışı aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

1. Agar bloklar (6 mm²) gelişmekte olan fungal koloninin kenarlarından kesilir.
2. Bloklar yaklaşık 4 ml saf su içeren ağız kapaklı tüplerin içine yerleştirilir (150 x 15 mm). Tüplerin kapakları sıkıca kapatılır ve 20-25°C'de depolanır.
3. Fungusun geri kazanımı, fungal blok'un şişeden çıkarılması ve misel kısmı aşağı gelecek şekilde büyüme ortamına yerleştirilmesi ile olur.

Çizelge 1. Agar ortamında saklanan bazı bitki patojeni fungusların oda sıcaklığında, buzdolabında ve derin dondurucuda raf ömürleri.

Fungus	Depolama sıcaklığı (oda/buzdolabı/derin dondurucu, °C)	Alt kültüre almadan önce geçen süre	Kaynaklar
<i>Alternaria bassicola</i>	5	1 yıl	Kilpatrick (1976)
<i>Aspergillus</i>	20-25/4	2-6 ay /2 yıl	CABI <i>Bioscience</i> , www.cabi.org
Orman patojenleri	5	1 yıl	Chu (1970)
<i>Phytophthora</i>	16/4	2-3 ay/1 yıl	Dick (1965)
<i>Pythium</i>	16/4	2-3 ay/1 yıl	Dick (1965)
<i>Zygomycota</i>	20-25/4-7	1-2 ay/1 yıl	CABI <i>Bioscience</i> , www.cabi.org
<i>Verticillium dahliae</i> *	23/4/-20	2 ay/2 yıl/10 yıl	Dr Mike Milton, Dr Chris J Smith, Dr Murat Dikilitaş (Swansea University- UK, 2007)*
<i>Verticillium theobroma</i> *	23/4/-20	2 ay/2 yıl/10 yıl	Dr Mike Milton, Dr Chris J Smith, Dr Murat Dikilitaş (Swansea University- UK, 2007)
<i>Verticillium nigrescens</i> *	23/4/-20	2 ay/2 yıl/10 yıl	Dr Mike Milton, Dr Chris J Smith, Dr Murat Dikilitaş (Swansea University- UK, 2007)
<i>Verticillium tricorpus</i> *	23/4/-20	2 ay/2 yıl/10 yıl	Dr Mike Milton, Dr Chris J Smith, Dr Murat Dikilitaş (Swansea University- UK, 2007)
<i>Verticillium albo- atrum</i> *	23/4/-20	2 ay/2 yıl/10 yıl	Dr Mike Milton, Dr Chris J Smith, Dr Murat Dikilitaş (Swansea University- UK, 2007)

*Çizelge üzerinde sunulan bazı veriler yazarın kendi çalışmalarından ve kişisel görüşmelerinden elde edilmiştir.

Su içinde depolama sırasında eğer spor ya da misel, agar üzerinden uzaklaştırılır yani agar şişeye transfer edilmez ise fungal büyüme büyük oranda yavaşlatılır. Su agarında 2-3 yıllık bir saklama sırasında *Phytophthora* ve *Pythium* funguslarında herhangi bir canlılık kaybı olmadığı rapor edilmiştir (Onion ve Smith, 1984). Yine Brezilya Devlet Hastanesi Dermatoloji Bölümünde Diogo ve ark. (2005) fungusları kısa dönem muhafaza etmek için 'su içinde saklama yöntemi'ni geliştirmişler, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* ve *Penicillium* gibi patolojik özellikleri olan fungusların yanında 40 dan fazla fungus türünü 12 ay süre ile 4 ml saf su içinde ağzı sıkıca kapatılmış ve alüminyum folye ile sarılmış flasklarda başarılı şekilde muhafaza etmişlerdir. Fungusların yapılarında ve koloni özelliklerinde değişiklik olup olmadığını anlamak için flasklardan her ay 200-250 µl'lik bir örnek alarak PDA ortamına inokule etmişler, fungusların kontamine olmadan geliştiklerini ve bu şekilde muhafaza edilen fungusların depolanmasının ve örnekleme için ihtiyaç duyulduğunda kullanımının kolay ve ekonomik olduğunu ifade etmişlerdir. Yine başka yöntemde sterilize edilmiş kürdanlar steril suda ısıtılarak Petri kaplarında bulunan fungal kültürler üzerinde yuvarlanarak fungus sporlarının yapışması sağlanmış ve bir şişede bulunan steril su içine (3-5 ml) aktarılmış ve şişelerin ağzı sıkıca kapatılarak elde edilen süspansiyon oda sıcaklığında tozsuz bir ortamda saklanmıştır. Fungusların geri kazanımı için, sterilize edilmiş bir kürdan fungal süspansiyonun içine daldırılarak kültür ortamı içine aktarılmış ve fungal gelişme sağlanmıştır. Burada en önemli husus fungal süspansiyondan aşırı miktarda fungal kültür ortamının alınmamasına dikkat edilmeli ve ayrıca şişelerin ağzı sıkıca kapatılarak ortamın buharlaşması engellenmelidir. Kültürlerin ömrünü uzatmak için zaman zaman süspansiyona steril su ilavesi yapıldığı da rapor edilmiştir (www.hardydiagnostic.com). Ayrıca bu yöntem ile pleomorfizm olarak bilinen kültürlerin dejenerasyonun da önüne geçildiği ifade edilmiştir (Baskarathevan ve ark., 2009).

Silika jel üzerinde saklama:

Bu metot CABI Bioscience Enstitüsünde kullanılan metotlardan birisidir. En iyi sonucu fungus sporlarının korunmasında verdiği bilinmekte ve dolayısı ile ince hücre çeperele sahip sporlarda ve misellerin saklanmasında

kullanılmadığı için çok yaygın bir metot değildir. Ağzı vida kapaklı şişelerin yaklaşık 1/3'ü silika jel ile doldurulduktan sonra 180°C'de 3 saat fırınlanır. Daha sonra şişeler kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanır. Muhafaza edilecek fungusların spor solusyonu % 5'lik sade süt içinde hazırlandıktan sonra yaklaşık 1 ml solusyon sterilize edilmiş silika jel üzerine dökülür, şişeler hafifçe çalkalanarak spor solusyonun yayılması sağlanır ve 10-14 gün süreyle 25°C'de silika jel kristalleri kuruyuncaya kadar depolanır. Daha sonra hava geçirmeyen silika jel indikatörlerinde nemi alınarak depolanır (Smith ve Onions, 1983; Nakasone ve ark., 2004).

Hazırlanış aşamasında kontaminasyon riski yüksek olmasına rağmen, yöntem ucuz ve basit olup fungusların geri kazanımı yüksektir. Ayrıca, funguslar kuru ortamda saklandığı için gelişme ve büyüme metabolizmaları önlendiği için bakteri kontaminasyonu riski de azdır. Silika jellerden fungusların kazanılması kolay olup, birkaç adet jel kristalleri agar üzerine saçılarak fungusun gelişmesi beklenir. Depolanmasının kolay olması ve fungusların geri kazanımının başarılı olmasından dolayı 'The Fungal Genetics Stock Center' bu yöntemi uzun yıllardan beri kullanmaktadır (University of Missouri, Kansas City-USA).

Toprakta saklama:

Bu metot iki kez otoklav edilen (121°C/15 dakika) toprakta 1 ml'lik spor solusyonunun 20-25°C'de 5-10 gün süreyle inkube edilmesini ihtiva eder. İnkubasyon süresi fungusun büyüme hızına bağlı olarak değişmektedir. Fungus, ilk büyüme sırasında ortamda bulunan nemi kullanır ve daha sonra kademeli olarak dormant hale geçer. Topraklar şişeler halinde daha sonra 4-7°C'de buzdolabında saklanır. Bu metot özellikle *Fusarium* türleri ve hububat patojenlerinin saklanmasında çok kullanışlı bir metottur (Booth, 1971; Reinecke ve Fokkema, 1979).

Toprakta saklama ile kültürler genel olarak stabil kalabilirler, bozulmazlar, canlılık durumları yüksektir, akar oluşumu hemen hemen imkansızdır, defalarca kullanılabilir (ikinci bir stok bulundurmaya kontaminasyon riski için faydalıdır), metot ucuz ve kolaydır. Dezavantajları ise bazen varyasyon oluşmasına neden olabilir, kuraklığa dayanamayan funguslar için çok uygun değildir ve fungusların geri kazanımında kontaminasyon riski vardır.

Dondurarak kurutma:

Fungal yapılardan suyun uzaklaştırılması metabolizmayı yavaşlatacağından fungusun daha uzun süre saklanmasına da imkan tanıyacaktır. Fungus kültürlerinin üzerinden kuru havanın geçirilmesi misel ya da sporlarda bulunan suyu çok çabuk buharlaştırabilirdiği gibi fungal kültürlerin vakum altında kurutulması da metabolizmayı yavaşlatan bir metottur. Ancak bu yöntem teknik ekipman ve aletleri gerektirdiğinden oldukça pahalı bir yöntemdir. Dondurarak-kurutma, buharlaştırarak soğutmayı esas alır ve birçok fungus için başarılı bir saklama tekniğidir, ancak aletin soğutma hızı organizma için uygun hale getirilmelidir (Smith, 1983). Her bir fungus için soğutma ve ısınma süreleri ayarlandıktan sonra, işlem sadece bir aşamadan oluşur (Smith ve Kolkowski, 1996). Bu yöntemle melanin içeren funguslar daha iyi korunmuşlardır. Yine aynı şekilde, Japonya Tarım Bakanlığı (MAFF) bünyesinde oluşturulan gen bankasında 14836 fungus, maya ve bakteri ırkları dondurarak-kurutma yöntemleri ile muhafaza edilmiş, periyodik olarak yapılan ölçümlerde yalnızca 5 fungus ırkının korunmasında sorun yaşandığını diğer organizma gruplarında herhangi bir bozulma olmadığını rapor etmişlerdir (Nagai ve ark, 2005).

Dondurarak kurutma sırasında canlılığı etkileyen faktörler;

Soğutma hızı: Yavaş kurutmayı takiben yavaş soğutma hızı birçok fungus için çok uygundur. Genel olarak funguslar için 1 °C dak⁻¹'lik soğutma hızı çok yaygın kullanılan bir hızdır.

Dondurma aşaması: Yüksek canlılık seviyesini elde etmek için, su seviyesi %5'in altına ininceye kadar sıcaklığın -15°C'nin altında tutulması zorunludur.

Nem durumu: Dondurularak kurutulmuş materyalin içindeki su miktarı fungal yapıya kalıcı zarar oluşmaması için %1'in altına inmemelidir. Eğer yetersiz su miktarı ilk aşamada uzaklaştırılırsa bu durum canlılık ve stabilite için iyi olabilir ancak saklama sırasında fungusun yapısı hemen bozulabilir.

Saklama koşulları: Örnekler kurutulduğu zaman oda sıcaklığında depolanabilirler, ancak -20 ila -70°C arasında depolamak örneklerin daha uzun süre korunmasını sağlayacaktır. Isı geçirmeyen tüp ya da şişeler düşük basınçta saklandıklarında ya da soy gazlar ile

doldurulduklarında, örneklerin oksijen ile ilişkisi kesileceğinden bozulma daha hızlı olacaktır.

Yeniden sulandırma: Yeniden sulandırma fungusların geri kazanımını etkileyen en önemli faktördür. %0.1'lik pepton ile 24 saatlik yeniden sulandırma hassas fungusların geri kazanımı için çok başarılı bulunmuştur.

Ayrıca Uluslararası Mikoloji Enstitüsü (International Mycological Institute-IMI) tarafından önerilen bir başka yol ise içinde örnek bulunan ampül ya da tüpler ısıtılarak kırılır ya da cam kesici ile kesildikten sonra 0.5 ml steril saf su tüpün ya da ampülün içine boşaltılır ve ağzı pamuk ile kapatılır. Yeniden sulandırma aşamasında hava kabarcıklarının oluşmamasına dikkat edilmelidir. Yaklaşık 30 dakika sonra, su organizma tarafından alındıktan sonra, steril bir çubuk ile ortam hafifçe sallanmalı, ampül ya da tüpün kenarlarına yapışmış olan sporlar nazikçe sallanarak alınıp uygun geliştirme ortamında inkube edilmelidirler (Laviola ve ark., 2006).

Dondurarak kurutma işlemi uzmanlık ve tecrübe gerektirdiğinden, ilk kez bu sistemi çalışacaklar için önerilmeyebilir, sistemin pahalı oluşu ayrıca bir dezavantaj olarak kabul edilmelidir.

Soğukta saklama:

Fungusların soğukta saklanması pratik olarak üç şekilde gerçekleşmektedir; buzdolabında, derin dondurucuda ve sıvı azotta. Hücre içindeki su donduğu zaman metabolizma askıya alınır. -70°C'nin altında çok az metabolik aktivite devam etmesine rağmen mikroorganizmaların çok çok düşük sıcaklık olan -190 veya -196°C'de saklanması metabolizmayı tamamen durdurur ki bu ancak sıvı azot ile mümkündür ve bu en sağlıklı yöntem olarak kabul edilmektedir (Smith, 1998; Nagai ve ark., 2000).

Sıvı azotta saklama; CABI Bioscience Enstitüsünde depolanan 695 cinse ait 3000 fungus türünün 7354 izolatu herhangi bir fizyolojik ve morfolojik değişikliğe uğramadan bu yöntemle saklanmaktadır (Dahmen ve ark., 1983; Smith ve Onions, 1994). Bu yöntemle funguslar canlılıklarını ve virulensini koruyabilmektedirler. Raf ömrü de sonsuz olarak düşünülmektedir. Depolanan örneklerde sınırlı radyasyona ulaşma sınırı olan 32000 yıl olarak kabul edilmektedir (Ashwood-Smith ve Grant, 1976).

Soğukta saklama metodu:

1. Fungus hücreleri steril % 10 (v/v)'luk gliserol içinde hazırlanır ve 0.5 ml aliquotlar halinde üzerleri hangi ırk olduğunu belirten silinmeyen cam yazar kalemlerle etiketlenmiş 2 ml'lik borosilikat cam ampüllere veya 2 ml'lik polypropylen kriotüplere aktarılır.
2. Akıntı veya sızıntı olup olmadığını kontrol etmek için ısı geçirmeyen cam ampuller erythrocin B boyasına yerleştirilir. Fungal hücreler en az 1 saat gliserol içinde bekletilir.
3. Ampuller ya da kriotüpler programlanabilir uygun bir soğutma hızında soğutulur. -1°C dak^{-1} soğutma hızı birçok fungus için uygundur ancak yine de %100'lük bir başarı sağlamayabilir. Soğutma hızı kritik nokta olan 5°C ila -50°C arasında kontrol edilmelidir. İlk aşamada soğutma hızı -10°C dak^{-1} olarak belirlenebilir.
4. Donmuş solüsyon -50°C 'ye ulaştığında en son depolama sıcaklığına ulaşılacak 320 litre hacminde sıvı azot depolama kaplarına transfer edilir. Kriotüplerde organizmaların depolanması halinde çok yüksek oranda geri kazanım elde edilecektir. Fungusun geri kazanımının ve işlemin sağlıklı yapılıp yapılmadığının kontrolü için dondurma işleminden dört gün sonra ampul ya da kriotüplerin bir tanesi 37°C 'de bir su banyosunda ya da uygun bir soğutma programı olan bir büyüme çemberinde bekletilir. Ampül ya da kriotüp üzerindeki buz çözüldükten sonra ortamdan alınır. Solüsyonun kendi sıcaklığının, su banyosundaki sıcaklığa ulaşmamasına özenle dikkat edilmelidir. Tüpler mikrobiyolojik olarak emniyetli bir kabinde açılmalıdır. Ampülün ya da tüpün içeriği uygun bir ortama dökülmelidir (www.cabi.org). Kültür ortamında yetiştirilmesi zor ya da imkansız olan funguslar bu yolla saklanabilir. *Sclerospora* türleri, rastık ve pas fungusları sıvı azotta saklama yöntemleri ile başarılı bir şekilde muhafaza edilmişlerdir (Long ve ark., 1978; Hoffmann, 1999). Hatta yüksek forma sahip olan şapkalı mantarlar da bu yolla uzun süre saklanmışlardır (Singh ve ark., 2004). Ancak hiçbir saklama tekniğinin her fungus için hatta bir fungus türünün farklı ırkları için optimum koşulları sağlamadığının bilinmesi çok önemlidir. Örneğin, Peters ve Sturz (2001) *Phytophthora erythroseptica* ve *P. infestans* funguslarının -20°C 'de saklandıktan 3 hafta sonra geri kazanım için canlılıkları test ettiklerinde *P. erythroseptica*'nın canlılık oranının % 90 ile oldukça yüksek olup istatistik olarak *P. infestans*'tan farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir.

Sıvı azotta saklamanın avantajları; funguslar ısı geçirmeyen ampüllerde kontaminasyon riski taşımazlar, sporulasyon yapan ya da yapmayan birçok fungus bu sistemde uzun süre yaşayabilir. En önemli dezavantajı ise sistem oldukça pahalıdır. Büyük tanklarda depolama yapılsa bile her 3 günde bir sıvı azot temini gerekmektedir, ayrıca eğer sıvı azot temininde gecikme yaşanırsa bütün kültür koleksiyonu kaybolabilir. Saklama kapları iyi havalandırılmış odalarda tutulmalıdır, çünkü sıvı azot sürekli olarak buharlaşır ve çalışanlar açısından tehlike arz edeceğinden iyi havalandırılmış odalar bu durum için çok uygundur. Hava geçirmeyen veya iyice yalıtılmış saklama kaplarının aşınmaya uğradığı veya çatladığı bilinmektedir, bu gibi başarısızlık durumu depolanan bütün ırkların kaybolmasına neden olabilir. Sıvı azot içine fungal tüpleri bırakmak yerine sıvı azot buharında fungusların dondurulması daha mantıklıdır. Çünkü, fungusların bulunduğu tüplerin içine herhangi bir şekilde sıvı azot sızıntısı olur ise fungal kültürlerin geri kazanımı sırasında oda sıcaklığında veya 37°C 'de hızla buharlaşan gaz patlamaya neden olabilir (Nakasone ve ark., 2004).

Sıvı azot içinde fungusların saklanması durumunda ortama gliserol veya DMSO gibi korucuyucu maddeler ilave edilerek fungus hücreleri içinde oluşabilecek muhtemel buz kütlelerinin engellenmesi hedeflenmiştir (Dahmen ve ark., 1983). Ancak, yapılan bir çalışmada nematodların biyokontrolünde kullanılan *Arthrobotrys robusta* ve *Monacrosporium thaumasium* fungus türleri 18 ay boyunca 4°C , -196°C ve -196°C 'de koruyucu madde ilave edilerek muhafaza edilmişler, fungusların geri kazanımı sağlandığında misel çapı veya misel kuru ağırlığı bakımından incelendiğinde gruplar arasında herhangi bir fark görülmediği rapor edilmiştir (Mota ve ark., 2003). Yine benzer bir çalışma, Simpfendorfer ve ark. (1996) tarafından yapılmış olup, *Phytophthora clandestina* fungusunu sıvı azotta ve sterilize edilmiş saf su içinde bulunan darı tohumları üzerinde 4°C 'de olmak üzere 2 farklı yöntemle saklamışlar ve aylık olarak canlılık ve patojenisite testleri yapılmış, 4°C 'de su içinde saklanan fungusların 10 aylık süre sonunda canlılıklarını ve virulenslerini kaybetmediklerini bildirmişlerdir. Kısa ve orta dönem fungusların saklanmasında bu yöntemi hem ucuz hem de kolay olduğu için tavsiye etmişlerdir.

Buzdolabında saklama (-20°C); 5 mm²'lik inokule edilmiş agar bloklar steril 1.5 ml'lik mikrosantrifuj tüplerine aktarılır ve üzerine sterilize edilmiş % 10'luk gliserol ilave edilerek bir gece 4°C'de bekletilir. Genelde bir adet tüp içine 5 agar blok yeterlidir. Tüpler daha sonra -20°C'de depolanır (Ito, 1991; Lopez Lastra ve ark., 2002). Bu şekilde fungal yapılar saklanabildiği gibi, enfekteli bitki artıkları da muhafaza edilmektedir. Örneğin, Laviola ve ark. (2006) yaprak dokuları üzerinde bulunan *Plasmopara viticola*'ya ait fungal yapıları -25°C'de muhafaza ederek Petri kaplarına yerleştirmişler ve herhangi bir ön işlem yapmadan 8 yıl gibi bir süre korumayı başarmışlardır. Örneklerin canlılığını test etmek için, yapraklar oda sıcaklığında 30 dakika kadar bekletilmiş ve enfekte edilen yaprak parçaları 10 ml'lik tüplere alınarak üzerine 2 ml sterilize edilmemiş musluk suyu ilave edilerek 3-4 dakika çalkalanıp bir fungal süspansiyon elde edilmiştir. Daha sonra taze koparılmış asma yapraklarının alt kısmı üste gelecek şekilde 15 ml saf su içeren bir Petri kabına yerleştirilmiş ve yaprak damarları arasına 10 damla fungal süspansiyon damlatılmış 20-22°C'de inkubasyona bırakılarak enfeksiyon gelişmesi başarı ile gözlenmiştir.

Derin dondurucuda saklama (-80°C); inokule edilmiş agar bloklar 2 ml hacminde kryotüplere (Nalgene Co., Rochester, N.Y) yerleştirildikten sonra üzerlerine 1.5 ml hacminde sterilize edilmiş % 10'luk gliserol ilave edildikten sonra isopropanol içeren özel dondurma kutularına ("Mr. Frosty", Nalgene Co.) konup bir gece 4°C'de bekletilir, daha sonra dondurma kutuları -80°C'ye alınarak orada da 24 saatlik bekleme süresinden sonra tüpler kutudan alınarak -80°C'de depolanır. Fungusların geri kazanımı ise su banyosunda 37°C'de şişeler üzerinde bulunan buz parçacıkları eriyinceye kadar bekletilip daha sonra alt kültüre alınması ile mümkün olmaktadır (Lopez Lastra ve ark., 2002). Bu metodu modifiye eden Kitamoto ve ark. (2002) Oomycota, Zygomycota, Ascomycota ve Basidiomycota'ya ait 66 fungus türünü talaş ortamında % 10'luk gliserol kullanarak (% 65 nem içeriği sağlamıştır) hemen -85°C'de dondurmuşlardır. Kültürler kullanılmak istendiğinde ise oda sıcaklığında bekletilip uygun sıcaklığa gelince bir alt kültüre alınarak fungusların geri kazanımı elde edilmiştir. Bu şekilde kültürler 10 yıldan fazla korunmuş herhangi bir soğutma programı uygulanmamıştır.

Genel olarak bakıldığında iki tip koruma amaçlı kimyasal bulunmaktadır. Bunlardan birincisi; hücre duvarını geçerek hücre içi ve hücreler arası boşluklara penetre ederek koruyan gliserol ve DMSO gibi kimyasallar; diğeri ise penetre kabiliyeti olmayan sukroz, glikoz, laktoz, mannitol, PVP (polyvinyl pyrrolidone) ve polietilen glikol gibi hücre duvarının dışında koruyucu etkiye sahip olan kimyasallardır (Simpfendorfer ve ark., 1996; Palagyi ve ark., 1997). Ancak en iyi korumanın % 10'luk gliserol tarafından sağlandığı ifade edilmiştir (Denning ve ark, 1992; Baskarathevan ve ark., 2009). Dolayısı ile bu derlemede gliserol ile yapılan çalışmalara yer verilmiştir.

Ayrıca, son yıllarda North Dakota State Üniversitesi tarafından -80°C'de soğukta saklama ile ilgili yeni bir metot geliştirilmiş ve bu yöntem Moss ve ark. (2011) tarafından *Stereum* spp., *Nectria* spp. ve *Armillaria* spp. funguslarının korunması için kullanılmıştır (Colorado State University, www.treehealth.agsci.colostate.edu). Buna göre; Petri kaplarında gelişen fungusların üzerlerine iki adet otoklav edilerek sterilize edilmiş arpa taneleri yerleştirilmiş ve bu taneler kolonize olduktan sonra arpa taneleri eppendorf tüplerine yerleştirilerek -80°C'de depolanmıştır. Fungusların geri kazanımı, kolonize olmuş arpa tanelerinin PDA ortamına aktarılması ile yapılmıştır. Yöntem oldukça ucuz olup, geri kazanım yüzdesi oldukça yüksek bulunmuştur. Pasarelli ve McGinnis (1992) tarımsal alanlardan ve hastanelerden izole edilen küf, maya ve çeşitli aerobik funguslara ait 1447 adet fungusu kısa (6 ay) ve uzun dönem (13 yıl) olarak -70°C'de muhafaza etmişler, belirtilen süreler sonunda fungusları 25°C'de alt kültüre alarak canlılık derecelerini kontrol etmişlerdir. Elde ettikleri sonuca göre depolama süresinin ve fungus türünün canlılıkta çok önemli rol oynamadığını ancak düşük sıcaklığın hem kısa hem de uzun dönem saklama için en iyi yol olduğunu rapor etmişlerdir.

Suni dehidrasyon yöntemi ile saklama:

Bu yöntem normal şartlarda fungusların yapısına zarar vermeden bünyelerindeki suyu uzaklaştırarak metabolizmanın yavaşlamasını esas alır. Bu metot için, 4 g CaCl₂ bir test tüpüne konur ve yaklaşık olarak 1 cm kalınlığında bir pamuk tabakası ile üzeri kaplanır ve yaklaşık olarak 1 cm²'lik genç, sporulasyon halinde olan yaprak veya Petri kabından kesilmiş taze fungal parçalar pamuk üzerine yerleştirilir. Daha sonra

bunun üzeri de ince bir pamuk tabakası ile kaplanarak tüpün ağzı parafilm ile kapatılır. Tüpler daha sonra 4-6°C'de depolanır ve fungusların geri kazanımı Laviola ve ark. (2006)'na göre yapılmış olup konu ile ilgili detaylı bilgi "Buzdolabında saklama (-20°C)" kısmında verilmiştir.

Bu çalışmada, araştırmacılara sunulan detaylı bilgilerin kısa değerlendirilmeleri Çizelge 2'de sunulmuştur.

Fungus Türlerinin Dağıtımı:

Ulusal ve uluslararası kurallar biyolojik materyallerin dağıtımını bir dizi kurallara bağlamıştır. Birçok hükümet yurt dışından fungal ırkların özellikle bitki patojenlerin ithalatını kısıtlamakta, bu yüzden araştırmacılar fungal ırkların ithalatından ve kullanımından önce çoğunlukla resmi yazılı izin alınmak zorundadır. Çabuk bozulan bulaşıcı ve bulaşıcı olmayan biyolojik materyallerin milli posta servisi ile ithalat ve ihracatını kısıtlayan kurallar "Official Compendium of Information of General Interest Concerning the Implementation of the Convention and Its Detailed Regulations-Mikrobiyal materyallerin durumu hakkında resmi olarak yerine getirilmesi gereken detaylı kurallar ve genel bilgiler" International Bureau of the Universal Postal Union, Berne tarafından hazırlanmıştır (Smith, 1996). Dünyanın birçok yerlerinde milli postaneler Uluslararası Postaneler Sendikasının üyesidirler ve dolayısı ile fungal kültürlerin taşınımı konusunda detaylı bilgilere sahiptirler.

CABI *Bioscience* UK nematodlar, böcekler, bitki bakterileri ve fungusların tanımlanması konusunda ücret karşılığı hizmetler sunmaktadır. Ücretler bazı özel durumlar için alınmamaktadır. Bu konular ile ilgili detaylı bilgiler CABI *Bioscience* UK, Bakeham Lane, Egham, Surrey TW20 9TY UK adresinden alınabilir.

Funguslar ile her zaman çalışma yapılması çeşitli sebeplerden dolayı mümkün olmamaktadır, ya kullanılacak fungusun izole edilmesinde karşılaşılan sorunlar ya da muhafaza altındaki fungusların deneylerde kullanılmadan önce patojenisite testine tabi tutularak yeniden izole edilmesi hem zaman kaybına hem de çalışmaların gereksiz yere uzamasına neden olmaktadır. Bu konular göz önünde bulundurulduğunda fungusların aktif maddelerinin koruma altına alınarak yapılacak

deneylerde amaca uygun olarak değerlendirilmesi hem zaman kaybını önleyecek hem de kültürler konusunda yukarıda belirtilen sorunlar yaşanmayacaktır. Bunun için fungusların bitkilerde savunma reaksiyonu oluşturacak kadar protein ve karbohidrat depolamasını sağlamak yani onlardan elisitör elde etmek patolojik çalışmalar için çok önemlidir (Dikilitaş, 2003; Dr Chris J Smith ile kişisel görüşme, 2010).

Funguslardan elisitör elde edilmesi:

Fungal izolatlar Dox veya PDA üzerinde geliştirildikten sonra 1 cm'lik diskler alınarak 250 ml'lik konikal flasklar içinde hazırlanmış olan 100 ml'lik sıvı Dox ortama aktarılır ve fungusun optimum gelişme sıcaklığında çalkalayıcıda 6 hafta kadar inkubasyona bırakılır. Bu süre sonunda sıvı ortamda gelişen funguslar kaba filtre kağıtlarından geçirilerek misel kısmı atılır ve sıvı kısım 10000g de 4°C'de 20 dakika santrifuj edilerek -20°C'de depolanarak dondurak-kurutmaya maruz bırakılır. Daha sonra elde edilen organik kısım 200 ml saf su içinde çözülerek 4 °C'de diyaliz edilir. Bu aşamadan sonra ham elisitör ikinci kez dondurarak-kurutulur ve tekrar yukarıdaki gibi santrifuj edilir. Hazırlanan elisitör 5 ml'lik hacimler halinde -20°C'de saklanarak protein ve karbohidrat konsantrasyonu tayin edilir ve çalışmalarda kullanıma hazır hale getirilir (Dikilitaş, 2003). Bu şekilde hazırlanan elisitör patolojik ve biyokimyasal çalışmalarda fungusların yerine kullanılabilir.

Çizelge 2. Fungusları saklama yöntemlerine ilişkin değerlendirmeler

Metot	Masraf	Stabilite	Tavsiye edilen saklama ömrü
Filtre kağıdı üzerinde saklama	Düşük	İyi	2 yıl
Alt kültüre alarak saklama	Düşük	İyi	1 yıl
Odun parçacıkları üzerinde saklama	Düşük	İyi	10 yıl
Tahıl taneleri üzerinde saklama	Düşük	İyi	1-2 yıl
Kumda saklama	Düşük	İyi	2-4 yıl
Eğik agarda saklama	Düşük	İyi	2-4 yıl
Agar şeritler üzerinde saklama	Düşük	İyi	5 yıl
Mineral yağ altında saklama	Düşük	İyi	5-20 yıl
Suda saklama	Düşük	İyi	2-4 yıl
Silika jel üzerinde saklama	Düşük	İyi	5-20 yıl
Toprakta saklama	Düşük	İyi	5-20 yıl
Dondurak-kurutma şeklinde saklama	Çok Yüksek	Çok iyi	10-40 yıl
Derin dondurucuda saklama (-75°C)	Yüksek	Çok iyi	10-15 yıl
Sıvı Azotta saklama	Çok Yüksek	Çok iyi	32.000 yıl
Buzlukta saklama (-20 °C)	Düşük	İyi	8-10 yıl
Buzdolabında saklama (4°C)	Düşük	İyi	1-2 yıl
Suni dehidrasyon yöntemi ile saklama	Düşük	İyi	2-3 yıl

Sonuçlar:

Laboratuvar çalışmaları için kullanılacak fungusların çalışma yapılmadığı dönemlerde veya gen kaynaklarının muhafaza edilmesi açısından uzun süre canlılığını muhafaza ederek saklanması büyük önem taşımaktadır. Ancak, unutulmaması gereken önemli bir husus bütün fungal organizmalar için tek ve mükemmel bir koruma yöntemi yoktur. Bu derlemede yer ve finansal sorunları ön plana çıkan laboratuvar ve enstitüler için hazırlanmış en ucuz ve uygun metotlar, dünyanın saygın laboratuvarlarının güvenle kullandığı metotlardan seçilmiştir. Fungus veya fungal materyallere çok hızlı ve güvenilir bir şekilde ulaşmak hem çalışmaların kalitesini arttıracak hem de rutin olarak kullanılan mikroorganizmaların yeniden temin edilmesi için geçecek süreyi önleyecektir. Bunu sağlamak için yapılacak en önemli adım onların güvenli bir şekilde muhafaza edilmesinden geçer. Bunun için en uygun muhafaza ve saklama yöntemleri her laboratuvar için ayrıntıları ile değerlendirilmeli ve uygulanmalıdır. Bu laboratuvarlarda fungusların canlılığı ve stabilitesi altı ay arayla test edilmelidir (Espinell-Ingroff ve ark., 2004).

Ülkemizin de önde gelen fakülte ve araştırma kuruluşlarında böyle bir yapılanmaya giderek merkezi bir fungus bankası oluşturulmalıdır. Son yıllarda Avrupalı bazı ülkelerinde mikroorganizmaların gen kaynaklarının korunması için projeler başlatılmış ve bu kapsamda üyelerine ya da ilgili kuruluşlara ücretsiz olarak materyal dağıtımını 3 yıl gibi kısa bir sürede başarmış, mikroorganizmalara ilişkin tüm veriler elektronik veri tabanı ile internet üzerinden hizmete açılmıştır (Kubatova, 2010; www.vurv.cz/collections/vurv.exe/search). Aslında ülkelerarası merkezi bitki patolojisi laboratuvarları aralarındaki işbirliğini arttırmak suretiyle kendi hastalık etmenleri listesini çıkarmalı ve yeni izolatlar karşılaştırarak ortaya çıkan hastalıkların teşhisine çok hızlı ve sağlıklı şekilde gidebilmelidir.

Kültür bankası oluşturulurken ihmal edilmemesi gereken bir diğer husus ise, ikinci bir koleksiyon merkezinin bir başka bina ya da yerde de kurularak kültürlerin güven altına alınması sağlanmalıdır.

Teşekkür ve Açıklama

Bu çalışmanın yazımı aşamasında fikirlerini bizimle paylaşan Dr. Mike Milton ve Dr. Chris J Smith'e şükranlarımızı arz ederiz.

Yazarlar, burada bahsedilen kimyasallar ve kullanılan metotlar ile ilgili olarak herhangi bir çıkar sağlamamışlar, burada bahsedilmeyen ve aynı işlevlere sahip yöntemler ve kimyasallar ile ilgili olarak herhangi bir olumsuz görüşe sahip değillerdir.

KAYNAKLAR

- Ashwood-Smith, M.J. and Grant, E. 1976. Mutation induction in bacteria by freeze drying. *Cryobiology*, 13: 206-213.
- Baskarathevan, J., Jaspers, M.V., Jones, E.E., Ridgway, H.J. 2009. Evaluation of different storage methods for rapid and cost-effective preservation of *Botryosphaeria* Species. *New Zealand Plant Protection*, 62: 234-237.
- Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.
- Chu, D. 1970. Forest pathology, storing of agar slants and cultures. *Bi-monthly Research Notes*, 26: 48.
- Correll, J.C., Puhalla, J.E., Schneider, R.W. 1986. Identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *apii* on the basis of colony size, virulence and vegetative compatibility. *Phytopathology*, 76: 396-400.
- Dahmen H., Staub T., Schwinn, F.J. 1983. Technique for long-term preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen. *Phytopathology*, 73: 241-246.
- Delatour, C. 1991. A very simple method for long-term storage of fungal cultures. *European Journal of Forest Pathology*, 21 (6): 444-445
- Denning, D.W., Clemons, K.V., Stevens, D.A. 1992. Quantitative preservation of viability of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 30: 485-488.
- Dick, M.W. 1965. The maintenance of stock cultures of Saprolegniaceae. *Mycologia* 57: 828-831.
- Dikilitaş, M. 2003. Effect of salinity & its interactions with *Verticillium albo-atrum* on the disease development in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and Lucerne (*Medicago sativa* & *M. media*) plants. Ph.D. Thesis, University of Wales, Swansea.
- Diogo, H.C., Sarpieri, A., Pires, M.C. 2005. Fungi preservation in distilled water. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 80 (6): 591-594.

- Espinel-Ingroff, A., Montero, D., Martin-Mazuelos, E. 2004. Long-term preservation of fungal isolates in commercially prepared cryogenic microbank vials. *Journal Of Clinical Microbiology*, 42: (3): 1257–1259.
- Fong, Y.K., Anuar, S., Lim, H.P., Tham, F.Y., Sanderson, F.R. 2000. A modified filter paper technique for long-term preservation of some fungal cultures. *Mycologist*, 14: 127-130.
- Hawksworth, D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 9 (6): 641-655.
- Hawksworth DL, Sastramihardja I, Kokke R and Stevenson R. 1990. Guidelines for the Establishment and Operation of Collections of Culture of Microorganisms. World Federation for Culture Collections, Campinas, Brazil.
- Hoffmann, P. 1999. Cryopreservation of fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7: 92-94.
- Ito, T. 1991. Frozen storage of fungal cultures deposited in the IFO culture collections. *IFO Research Communication*, 15:119–128.
- Kilpatrick, R.A. 1976. Fungal flora of crambe seeds and virulence of *Alternaria brassicola*. *Phytopathology*, 66: 945-948.
- Kitamoto, Y., Suzuki, A., Shimada, S., Yamanaka, K. 2002. A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. *Mycoscience*, 43:143–149.
- Kubatova, A. 2010. Collection of food relevant microscopic fungi under the Czech National Programme of Protection of Genetic Resources of economically significant microorganisms. *Czech Journal of Food Science*, 28: (1) 79–82.
- Laviola, C., Cannizzaro, G., Conigliaro, G., Burruano, S. 2006. Simple techniques for long-term storage of *Plasmopara viticola*. *Phytopathologia Mediterranea*, 45: 271–275.
- Long, R.A., Wood, J.M., Schmitt, G.C. 1978. Recovery of viable conidia of *Sclerospora philippinensis*, *S. sacchari* and *S. sorghi* after cryogenic storage. *Plant Disease Reporter*, 62: 479-481.
- Lopez Lastra, C.C., Hajek, A.E., Humber, R.A. 2002. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany*, 80: 1126–1130.
- Mota, M.A., Campos, A.K., Araujo, J.V. 2003. Sporulation, radial growth and biomass production of *A. robusta* and *M. thaumasiium* submitted to different methods of preservation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34: 157-160.
- Nagai, T., Ideno, A., Tsuge, M., Oyanagi, C., Oniki, M., Kita, K., Horita, M., Aoki, T., Kobayashi, T., Tsuchiya, K. 2000. Preservation of fungi in an atmosphere over liquid nitrogen after uncontrolled freezing. *Microbial Culture Collection*, 16 (1): 13-22.
- Nagai, T., Tomioka, K., Takeuchi, K., Iida, M., Kawada, M., Sato, T. 2005. Evaluation of preservation techniques of microorganism resources in the MAFF Genebank. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 39: (1) 19-27.
- Nakasone, K.K., Peterson, S.W., Jong, S.C. 2004. Preservation and distribution of fungal cultures Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004: p 37-47.
- Nuzum, C. 1989. A simple method for the preservation of some non-sporing fungi. *Australasian Plant Pathology*, 18: 104-105.
- Onions, A.H.S., Smith, D. 1984. Current status of culture preservation and technology. In: Batra LR and Ligima T (eds) Critical Problems of Culture Collections. Institute of Fermentation, Osaka.
- Palagyi Z, Nagy1 A., Vastag M., Ferenczy L and Vagyölgyi C. 1997. Maintenance of fungal strains on cryopreservative-immersed porous ceramic beads. *Biotechnology Techniques*, 11 (4): 249–250.
- Pasarelli, L., McGinnis M.R. 1992. Viability of fungal cultures maintained at -70°C. *Journal Of Clinical Microbiology*, 30 (4): 1000-1004.
- Peters, R.D., Sturz, A. V. 2001. Application of a simple freezing method for short term storage of *Phytophthora erythroseptica*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23:106-109.
- Reinecke, P., Fokkema, N.J. 1979. *Pseudocercospora herpotrichoides*: storage and mass production of conidia. *Transactions of the British Mycological Society*, 72: 329-331.
- Simpfendorfer, S., Harden, T.J., Murraf, G.M. 1996. Viability and pathogenicity of *Phytophthora clandestina* after storage in water and liquid

- nitrogen. *Australasian Plant Pathology*, 25: 234-239.
- Singh, S.K., Upadhyay, R.C., Yadav, M.C., Tiwari, M. 2004. Development of a novel lyophilization protocol for preservation of mushroom mycelial cultures. *Current Science*, 87 (5): 10.
- Singleton, L.L., Mihail, J. D., Rush, C. M. 1992. *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, U.S.A.
- Smith, D. 1983. A two stage centrifugal freeze-drying method for the preservation of fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 80: 333-337.
- Smith, D. 1996. Quality systems for management of microbial collections. In: Samson RA, Stalpers JA, van der Mei D, and Stouthamer AH (eds). *Culture Collections to Improve the Quality of Life*. Centraalbureau voor schimmecultures, Baarn, The Netherlands, p 137-142.
- Smith, D. 1998. The use of cryopreservation in the ex-situ conservation of fungi. *Cryo-Letters*, 19: 79-90.
- Smith, D. 2002. Culturing, preservation and maintenance of fungi. In: CAB International Plant Pathologist's Pocketbook (eds J.M. Walker, J.M. Lenne and S.J. Waller). p 384-409.
- Smith, D. Kollowski, J.A. 1996. Fungi. In: Belt A and Hunter-Cervera, J (eds). *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. Academic Press, New York, p 101-132.
- Smith, D., Onions, A.H.S. 1983. A comparison of some preservation techniques for fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 81: 535-540.
- Smith, D., Onions, A.H.S. 1994. *The Preservation and Maintenance of Living Fungi*, 2nd edn. IMI Technical Handbooks 2. CAB International, Wallingford, UK.
- Sneh, B., Burpee, L., Ogoshi, A. 1991. *Identification of Rhizoctonia Species*. St Paul, MN, USA: APS Press.