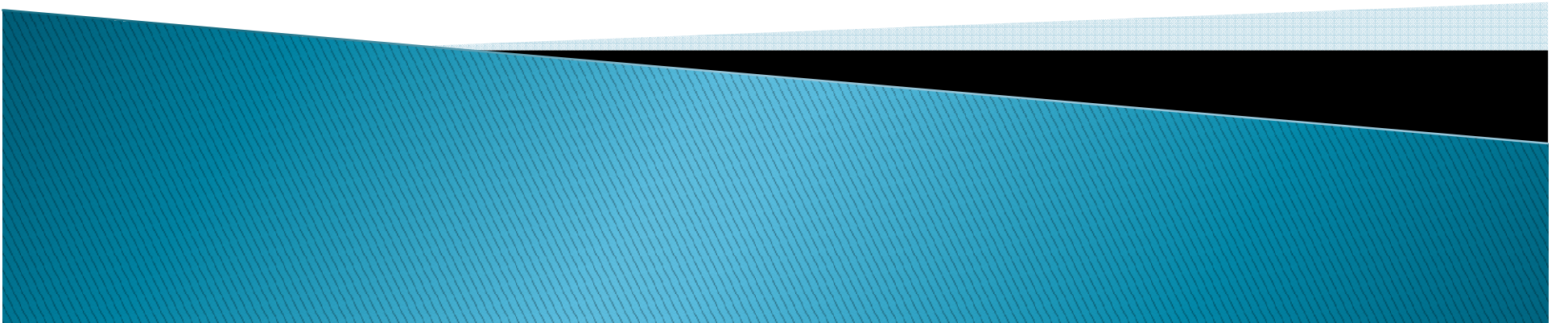
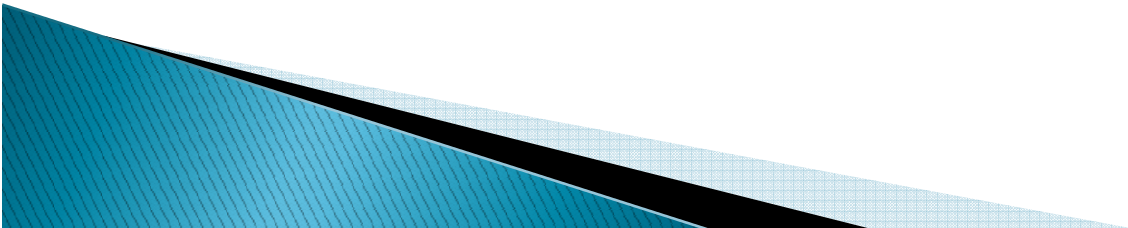


GENETİK KAYNAKLARIN MUHAFAZASI

Doç. Dr. Yıldız Aka Kaçar



- ▶ Germplazm muhafazasında iki temel yöntem uygulanmaktadır;
- ▶ Bitki materyalinde büyümenin yavaşlatılması veya azaltılması
- ▶ Bitki materyalinin soğukta muhafaza edilmesi (kryoprezervasyon)



Tablo: bitki gen kaynaklarının başlıca muhafaza yöntemleri

Muhafaza edilen materyal	Muhafaza yöntemleri	
Tohum	Kurutmaya toleranslı tohumlar	1) Düşük sıcaklıkta muhafaza (-1 veya -10 °C)
		2) çok düşük sıcaklıkta muhafaza (-150/-196 °C)
	Kurutmaya duyarlı tohumlar	1) Düşük sıcaklıkta muhafaza
		2) doku kültürü
	İnatçı tohumlar	Doku kültürü ile muhafaza
Bitki	Kültüre edilmiş genç bitki (plantlet)	1) altkültür (in vitro koşullarda)
		2) 0 °C'de karanlıkta veya öteki kontrollü koşullarda
	Saksıya şaşırtma ve tarlaya dikim	Gözlem evi (sıcaklık, nem, ışık kontrollü koşullarda)
Organ	Kallus	1) altkültür (in vitro koşullarda)
		2) soğukta muhafaza (LN ₂ 'de)
Doku	Sürgün ucu	1) Düşük sıcaklıkta muhafaza
		2) soğukta muhafaza (LN ₂ 'de)
Hücre	Hücre kültürü	1) altkültür (in vitro koşullarda)
		2) soğukta muhafaza (LN ₂ 'de)
	Protoplast kültürü	soğukta muhafaza (LN ₂ 'de)

YAVAŞ (AZALTI MIŞ) BÜYÜTME İLE MUHAFAZA

- ▶ Yavaş ya da azaltılmış büyüme ile muhafazanın esası, bitki kültürlerinin canlı kalabilmelerinin izin verdiği oranda, kültür ortamının ve kültür koşullarının değiştirilmesine dayanır.

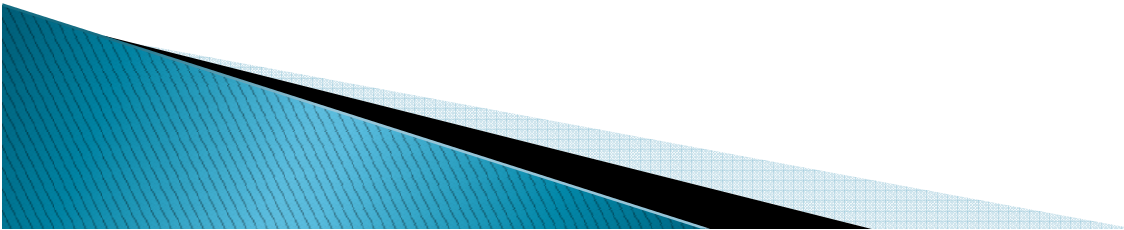


Büyüme odaları



SOĞUKTA MUHAFAZA

- ▶ Bitki örneklerinin dakikada birkaç °C, kademe kademe soğutulularak muhazasıdır.
- ▶ Örnekler çoğunlukla sıvı azota daldırılarak depolanırlar.

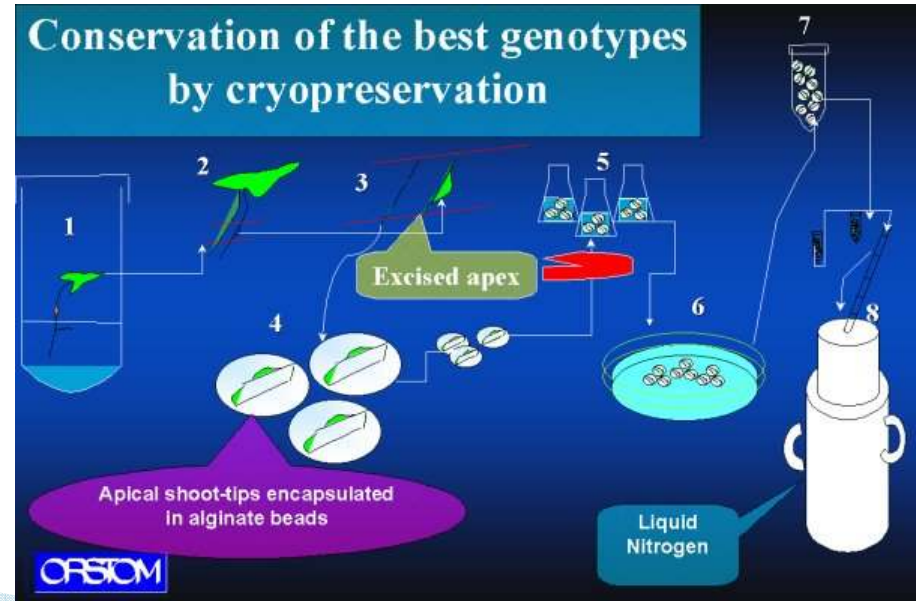


Dondurma işlemleri ve zararları

► Bitkisel hücrelerde donmanın iki tipi vardır;

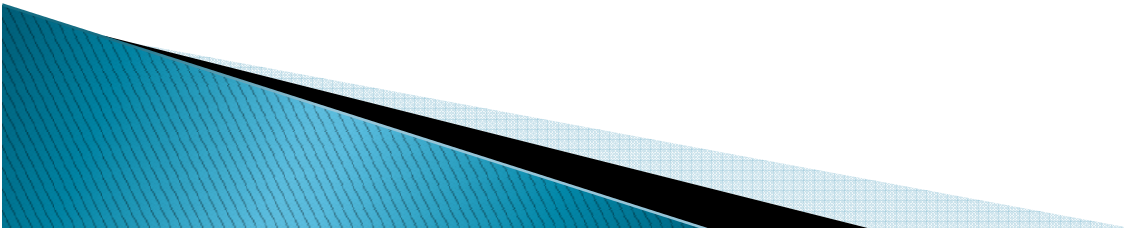
1. Hücre dışı (ekstraselüler) donma

2. Hücre içi (intraselüler) donma

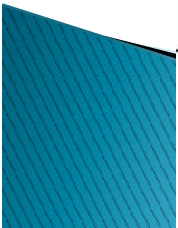
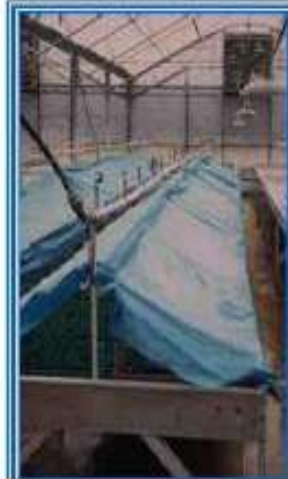
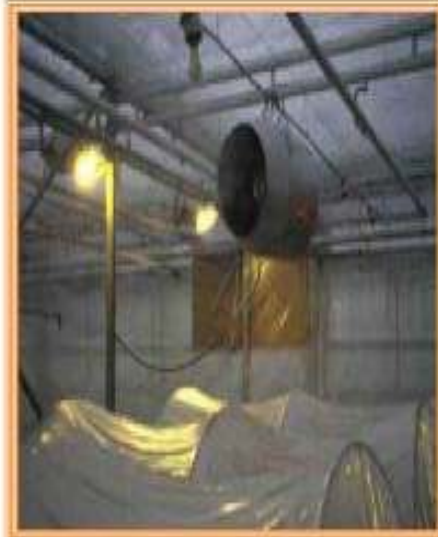


Hücre dışı buz oluşumu

- ▶ Bitki hücreleri yavaş soğutulduğu zaman buz kristalleri genellikle hücre duvarının dışında oluşur.
- ▶ Sıcaklık, suyun donma noktasının altına düştüğünde buz kristalleri hücreler arası ortam boşluğunda oluşur.

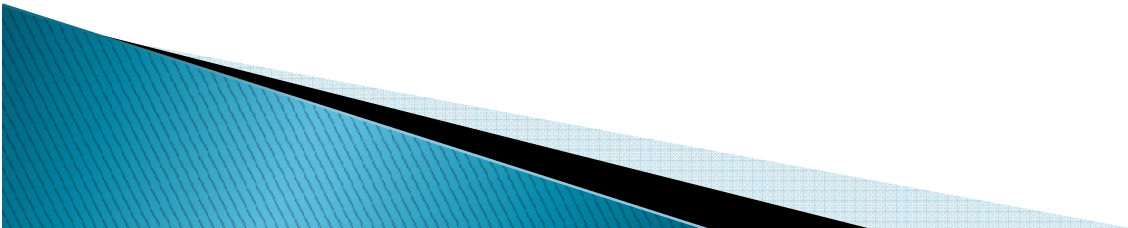


Alıştırma ve Büyütme tünelleri



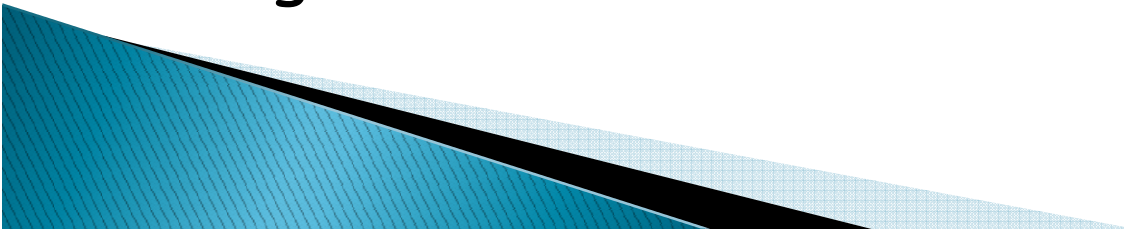
Hücre dışı buz oluşumunda, hücre düzeyinde iki temel olay gerçekleşir;

1. Suyun çıkarılması (dehidrasyon)
2. Hücre zarının açılması



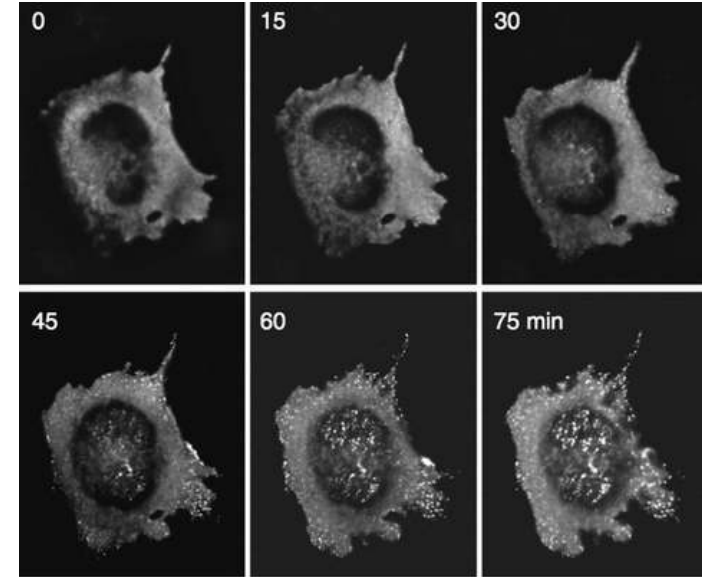
Hücre içi buz oluşumu

- ▶ Bitki hücreleri hızla dondurulursa ya da soğuğa duyarlı hücreler donma sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda soğuğa maruz bırakılırsa, hücre içi donma meydana gelir.
- ▶ Hücre içi buz oluşumunun meydana gelme derecesi soğutma oranına ve materyalin bulunduğu muhafaza soğukluğunun minimum derecesine bağlıdır.



Hücre içinde serbest suyun azalması

- ▶ Donma noktası altındaki sıcaklıklarda hücrelerin hayatta kalması için serbest suyun azaltılması gerekir.

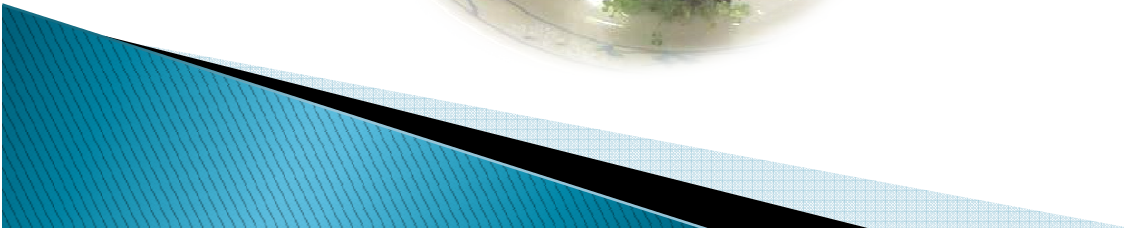


Hücrenin 75 dakika içerisinde donma aşamalarını gösteren şekil

➤ Hücrede serbest suyu azaltmak için sakkaroz ve ABA kullanılmaktadır.

➤ Bu işlemler sırasıyla;

- Altkültür yapılması,
- Krayoprotektant ilavesi,
- Hücre dışı donmanın sağlanması





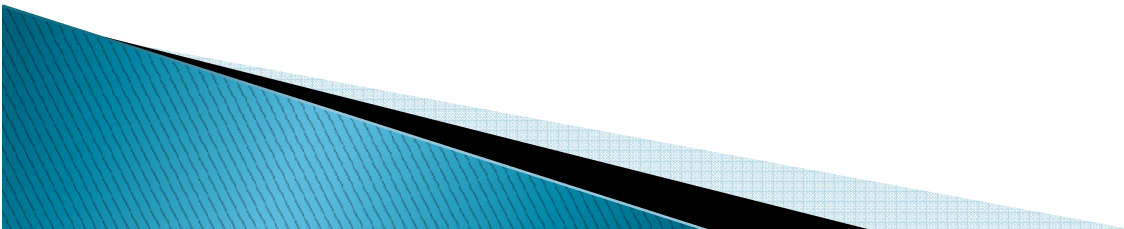
Öndondurma yöntemi

- ▶ Sıvı azota daldırıldıktan sonra hücrelerin canlılığını muhafaza etmek için gerekli öndondurma sıcaklığı, soğuğa dayanıklılıkla yakından ilişkilidir.



Yavaş öndondurma kuralları

1. Hücre kültürünün hasadı ya da apikal meristemin izolasyonu yapılır.
2. Materyale uygun ön işlem ya da önkültür yapılır.
3. Öndondurma öncesi krayoprotektantların ilavesi damla damla yavaşça ya da seri halde damlatılarak hızla doğrudan yapılabilir.
4. Materyalde donmayı başlatmak için $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ile $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de buz aşılması yapılır.
5. Materyal LN_2 içine daldırılır ve orada depolanır.
6. Hızlı çözündürme yaklaşık $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta su banyosunda yapılır.
7. Krayoprotektantların materyalden uzaklaştırılması yapılır
8. Kültüre edilmiş materyal yeniden kültüre alınarak canlılık kontrolü yapılır.



Vitrifikasyon (camlařtırma) yöntemi

- Bu yöntem, LN₂ sıcaklığına düşürmek için yapılan hızlı soğutma sırasında buz kristallerinin gelişme sıcaklığından (genellikle -10 °C ile -40 °C arasındaki sıcaklık zonundan) hızla geçilirken oluşan hücre içi buz kristallerinin gelişmesinin engellenmesinden ibarettir.

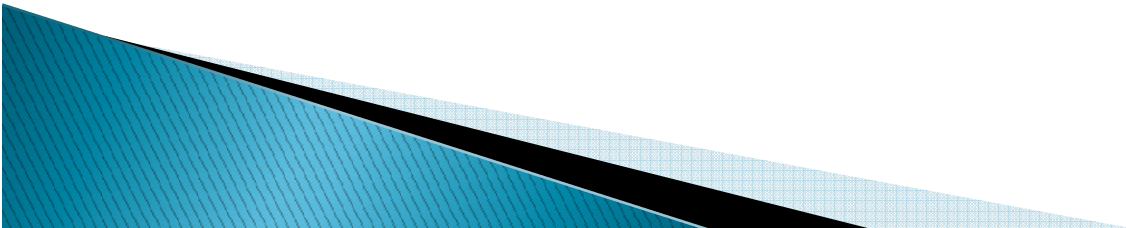


Vitrifikasyon kuralları

1. Uygun dönemde kültür ya da uygun boyutlarda materyal seçimi yapılır.
2. 0.3-1 M sakkaroz içeren ortamda önkültür yapılır.
3. Ufak şişe ya da tüp içindeki materyale doğrudan 0.3-0.5 mL vitrifikasyon çözeltisi ilave edilir.
4. Tüpler doğrudan LN₂'ye batırılır ve depolanır.
5. Tüplerin 40 °C'deki suya batırılmasıyla hızlı çözündürme yapılır.
6. Buzlar çözündürüldükten sonra vitrifikasyon çözeltisi 1.2-1 M sakkaroz içeren suyla sulandırılıp 5 kez yıkanır.
7. Filtre kağıdı üzerine toplanan materyal çıkarılır ve filtre kağıdının üzerinden yarı katı ortama alınarak yeniden kültür yapılır ve rejenerasyon sağlanır.

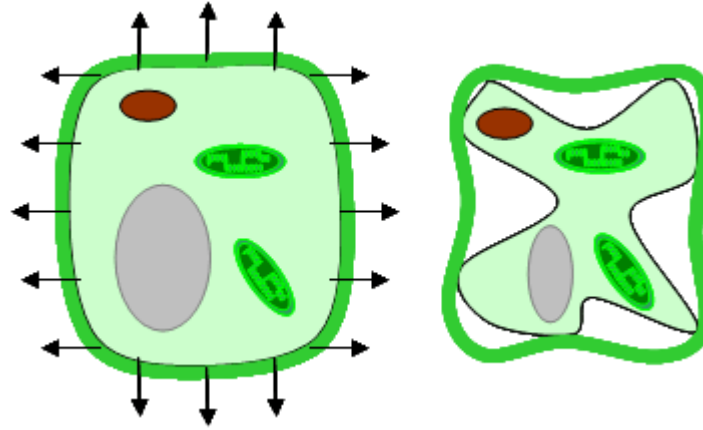
Hızlı soğutma ve hızlı çözündürmeyle öndondurma yönteminin kombinasyonu

- ▶ Hızlı soğutma/hızlı çözündürme yöntemi, öndondurmayla kombine edildiğinde, önceden uygun krayoprotektant uygulanmış soğuğa az dayanıklı veya duyarlı örneklerin soğukta muhafazasında çok yararlı olmaktadır.



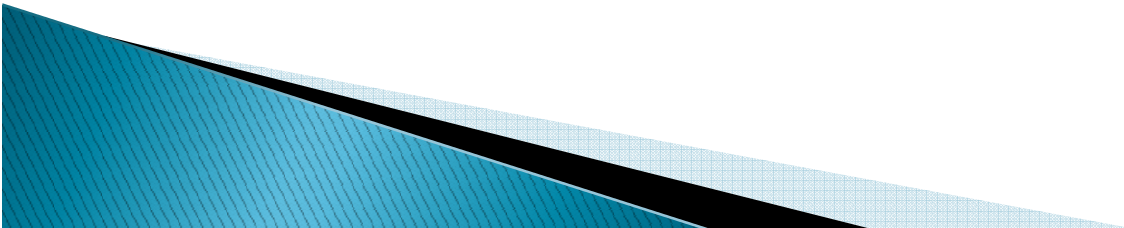
Hızlı öndondurma yöntemi

- ▶ Plazmolize ederek kısmi kurutmayla kombine edilmiş öndondurma yöntemidir.



Hızlı öndondurma kuralları

1. Uygun dönemdeki kültürler seçilir.
2. Yüksek ozmotikum ortamında, 1-3 gün kadar önkültür yapılır.
3. Ufak şişeler ya da tüpler içindeki hücrelere 0.5-1 mL krayoprotektant ilave edilir.
4. Oda sıcaklığında 5-10 dakika krayoprotektant maddenin inkübasyonu beklenir.
5. Tüpler -30 varlığında -30 °C'ye hazırlanmış dondurucunun buhar fazına, doğrudan transfer edilir., bir saat burada bekletilir.
6. Sonra derhal LN₂'ye batırılır ve depolanır.
7. Çözündürme tüplerin 40 °C'deki suya batırılmasıyla yapılır.
8. 1 M sakkaroz ilave edilmiş suyla krayoprotektant madde 5 kez yıkanır.
9. Kültürler doğrudan rejenerasyon ya da altkültür ortamına alınır.



Kurutma yöntemleri

- Kurutma yönteminde, hormon uygulaması ya da yüksek dozda ozmotikum uygulaması ile potansiyel kurumaya toleransın kontrolü amaçlanır.



Kurutma kuralları (yapay tohumların soğukta muhafazası)

1. Somatik embriyoların ve embriyonik kallusların uygun gelişme döneminde seçilmesi gerekir.
2. Önkültür yapılır.
3. Uygun nem oranına kadar kurutulan örnekler daha sonra tüplere ya da şişelere transfer edilir.
4. Tüp ya da şişeler doğrudan LN₂'nin buhar ya da likit fazına maruz bırakılır.
5. Çözündürme işlemleri tüplerin 40 °C sıcaklıktaki suya daldırılmasıyla hızlı ya da oda sıcaklığında tutulmasıyla yavaş olarak yapılır.
6. Yeniden kültür işlemine tabi tutularak, kültürlerin rejenere olmaları veya altkültür ortamında yeniden kullanılmaları sağlanır.

Sunumun Yayınlandığı Siteler:

- ▶ www.bahcebitkileri.org
- ▶ www.bahcebitkileri.org/bitkibiyoteknolojisi

