

BİTKİ GERMLAZMLARININ İN VİTRO MUHAFAZASI

Bitki germplazmlarının in vitro koşullarda muhafazasında iki temel yöntem uygulanmaktadır:

- 1- Büyümenin yavaşlatılması
- 2- Soğukta muhafaza (kryoprezervasyon)

1- Büyümenin Yavaşlatılması Yöntemi ile Germplazm Muhafazası

İn vitro kültürlerde bitki hücre ve dokularında büyüme;

- İnkübasyon sıcaklığının azaltılması,
- Besin ortamının yapısının değiştirilmesi,
- Bitki materyalinin mineral yağ ile kaplanması,
- Dehidrasyon,
- Sıcaklık ve besin ortamının yapısının birlikte değiştirilmesi,
- Kültürlerde basınç ve gaz bileşiminin değiştirilmesi yoluyla azaltılabilmektedir.

İnkübasyon sıcaklığının azaltılması:

Bitki türlerinin normal koşullardaki optimum büyüme sıcaklıklarına bağlıdır. Örneğin 25°C'de büyüme gösteren bir türde muhafaza sıcaklığı 4-10°C'ye; 30°C'de büyüyen bir türde 15-20°C'ye düşürülmektedir. Ayrıca aydınlatma periyodu ve ışık yoğunluğu da (50 lükse kadar düşürülmekte) düzenlenebilmektedir.

Besin ortamının yapısının değiştirilmesi: Metabolik faaliyetlerin azaltılması amacıyla ortama büyümeyi kontrol edici absisik asit, N- dimetil suksinik asit ve manitol ilavesi; şekersiz besin ortamının kullanılması.

Bitki materyalinin mineral yağ ile kaplanması: Solunumun engellenmesi amacıyla eksplantın mineral yağ ile kaplanması.

Dehidrasyon: Metabolik faaliyetlerin azaltılması amacıyla suyun azaltılması.

Kültürlerde basınç ve gaz bileşiminin değiştirilmesi: Solunumu azaltmak amacıyla düşük basınç ve düşük oksijen kullanılması.

2- Soğukta Muhafaza (Kryoprezervasyon)

Kryoprezervasyon, biyolojik materyalin canlı olarak dondurulması ve daha sonra sıvı azot içerisinde çok düşük sıcaklıklarda (-196 °C) muhafaza edilmesidir. Bu teknik ile;

- Sürgün uçları ve meristemler
- Hücreler ve somatik embriyolar
- Protoplastlar
- Embriyo, endosperm, ovul, anter, polen ve tohum vb.

muhafaza edilmektedir.

Bitkisel materyalin soğukta muhafazasındaki olumsuz etkiler, hücrelerde;

- Kurutmaya ve donmaya toleransın teşvik edilmesi,
- Hücre içi boşlukların (vakuollerin) azaltılması,
- Hücre zarı geçirgenliğinin artırılması,
- Şekerlerin hücre içerisinde artırılması ile sağlanır.

Canlı hücreleri dona karşı koruyan kimyasalların (kryoprotektantların) belirlenmesinden sonra bu tekniğin uygulanmasında büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu maddeler içinde en yaygın kullanılanı DMSO (dimetil sülfoksit)'dir ve -20 °C'de yüksek koruma sağlamaktadır. Bu madde, hücrede dondurulamayan suyun artışı sağlar, hücre zarının geçirgenliğini artırır, şeker ve suyun tutulmasını kolaylaştırır.

Tablo: In vitro soğukta muhafaza işlemlerinde kryoprotektant (antifriz) olarak kullanılan kimyasal bileşikler

| Alkoller | Kükürt Bileşikleri | Polimerler |
|---------------|--------------------------|-------------------------|
| Etilen glikol | Amino asitler | Hidroksietilen amidon |
| Gliserol | Dimetil sülfoksit (DMSO) | Polietilen glikol (PEG) |

| | | |
|-----------------|--------------------------------|---------------------------|
| Propilen glikol | Şekerler (Glikoz, Sakaroz vb.) | Polivinil pirolidon (PVP) |
| Sorbitol | | |
| Manitol | | |

Hücre İçinde Serbest Suyun Azaltılması:

Soğukta muhafazadan önce hücrelerde serbest suyun azaltılması ve hücrelerin daha az vakuol ihtiva eder duruma gelmesi istenir. Hücrede serbest suyu azaltmak için sakkaroz (0.3, 0.5 ve 1 M) ve ABA kullanılmaktadır. **Soğukta muhafazada esas alınan bazı uygulamalar:**

- 1) Alt kültüre alma,
- 2) Krayoprotektant (DMSO, sakkaroz, gliserol, etilen glikol gibi) ilavesi,
- 3) Hücre dışı donmanın sağlanması,
- 4) Vitrifikasyon,
- 5) Kurutmadır.

İn Vitro Kültürlerde Dondurma Yöntemleri

1- Yavaş dondurma: Materyal özel dondurucular içerisine yerleştirilir ve sıcaklığı 0.5-1.0 °C/dakika olacak şekilde yavaş yavaş -30, -40 °C'ye soğutulur. Hücreler arası su donar ve hücre dışarıya doğru su kaybederek büzülür ve hücre içi buz oluşumu önlenir.

2- Hızlı dondurma: Materyalin dona karşı koruyucu maddeler ile muamele edildikten sonra sıvı azot içerisine daldırılması ile uygulanır.