

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/353821423>

Tarımsal yönden önemli fungusların muhafazası ve koleksiyonları

Chapter · July 2021

CITATIONS
0

READS
321

2 authors:



İnci Güler Güney

Mardin Artuklu Üniversitesi

20 PUBLICATIONS 39 CITATIONS

SEE PROFILE



Sibel Dervis

Mardin Artuklu Üniversitesi

88 PUBLICATIONS 571 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



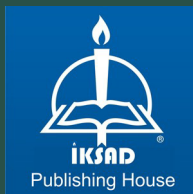
Neoscytalidium dimidiatum [View project](#)



TARIMSAL GELİŞMELER

EDİTÖRLER:

Dr. Öğr. Üyesi Rahime CENGİZ
Dr. Timuçin TAŞ



TARIMSAL GELİŞMELER

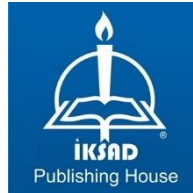
EDİTÖRLER:

Dr. Öğretim Üyesi. Rahime CENGİZ
Dr. Timuçin TAŞ

YAZARLAR:

Dr. Ayçin AKSU
Dr. Öğr.Üyesi Sadık Serkan AYDIN
Dr. Mahmut BAYRAM
Dr. Ayşin BİLGİLİ
Dr. Öğr.Üyesi Rahime CENGİZ
Dr. Müslüm COŞKUN
Prof. Dr. Emine ÇIKMAN
Zir. Yük. Müh. Cemal DENİZ
Prof Dr. Sibel DERVİŞ
Dr. Öğr.Üyesi İnci GÜLER GÜNEY
Dr. Hatice KARA
Prof. Dr. Tahir POLAT
Dr. İslim KOŞAR
Zir. Yük. Müh. Erdal KÜÇÜK
Dr. Öğr.Üyesi Arzu MUTLU

Dr. Sibel SÖYLEMEZ
Zir. Yük. Müh. M. Davut ŞAHİN
Dr. Timuçin TAŞ
Dr. Öğr.Üyesi Ferzat TURAN
Dr. Sadık YETİM



Copyright © 2021 by iksad publishing house
All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, distributed or transmitted in any form or by any means, including photocopying, recording or other electronic or mechanical methods, without the prior written permission of the publisher, except in the case of brief quotations embodied in critical reviews and certain other noncommercial uses permitted by copyright law. Institution of Economic Development and Social

Researches Publications®

(The Licence Number of Publicator: 2014/31220)

TURKEY TR: +90 342 606 06 75

USA: +1 631 685 0 853

E mail: iksadyayinevi@gmail.com

www.iksadyayinevi.com

It is responsibility of the author to abide by the publishing ethics rules.

Iksad Publications – 2021©

ISBN: 978-625-7636-51-3

Cover Design: İbrahim KAYA

May / 2021

Ankara / Turkey

Size = 16 x 24 cm

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ

Dr. Öğr.Üyesi Rahime CENGİZ

Dr. Timuçin TAŞ.....1

BÖLÜM 1

MEYVECİLİKTE TUZ STRESİ VE ETKİLERİ

Dr. Sibel SÖYLEMEZ.....3

BÖLÜM 2

GAP SEBZECİLİĞİNİN GENEL ANALİZİ

Dr. Mahmut BAYRAM

Zir. Yük. Müh. Erdal KÜÇÜK.....57

BÖLÜM 3

Tuta absoluta (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) ‘nın ŞANLIURFA İLİNDEKİ PARAZİTOİT VE PREDATÖR TÜRLERİNİN ETKİNLİKLERİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Dr. Ayçin AKSU

Prof. Dr. Emine ÇIKMAN.....77

BÖLÜM 4

Fusarium spp. FUNGUSLARININ FENOTİPİK - MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE MİKORİZAL FUNGUSLARIN SEBZELERDE TOPRAK PATOJENLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Ayşin BİLGİLİ.....103

BÖLÜM 5

TARIM YÖNÜNDEN ÖNEMLİ FUNGUSLARIN MUHAFAZASI ve KOLEKSİYONLARI

Dr. Öğr. Üyesi İnci GÜLER GÜNEY

Prof. Dr. Sibel DERVİŞ.....133

BÖLÜM 6

GAP BÖLGESİNDE ÇÖREK OTU YETİŞTİRİCİLİĞİ

Dr. İslim KOŞAR.....163

BÖLÜM 7

SÜRDÜRÜLEBİLİR TARIMDA YEM BİTKİSİ YETİŞTİRİCİLİĞİNİN ÖNEMİ

Ziraat Yüksek Mühendisi Cemal DENİZ

Prof. Dr. Tahir POLAT.....187

BÖLÜM 8

SİLAJLIK MISIR ISLAHINA GÜNCEL YAKLAŞIMLAR

Dr. Öğr. Üyesi Rahime CENGİZ

Dr. Timuçin TAŞ.....207

BÖLÜM 9

GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ BİTKİLERDE GEN KLONLAMA TEKNİKLERİ

Dr. Öğr. Üyesi Ferzat TURAN.....233

BÖLÜM 10

ORGANİK TARLA TARIMINA BAŞLARKEN PLANLAMA VE BAZI UYGULAMA KRİTERLERİ

Dr. Müslüm COŞKUN.....257

BÖLÜM 11

GAP BÖLGESİNDE YEMEKLİK TANE BAKLAGİL ÜRETİMİNDE YENİ ARAYIŞLAR

Ziraat Yüksek Mühendisi Davut ŞAHİN.....291

BÖLÜM 12

ABİYOTİK STRES FAKTÖRLERİNDEN KURAKLIĞIN BUĞDAYIN FARKLI GELİŞİM DÖNEMLERİNDEKİ ETKİSİ

Dr. Öğr. Üyesi Arzu MUTLU.....323

BÖLÜM 13

HARRAN OVASI DRENAJ KANALLARINDAKİ SUYUN TUZ, NİTRAT KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ VE TARIMSAL SULAMADA TEKRAR KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Hatice KARA

Dr. Sadık YETİM.....351

BÖLÜM 14

MİKROBİYAL SİLAJ KATKI MADDELERİ

Dr. Öğr. Üyesi Sadık Serkan AYDIN.....375

BÖLÜM 5

TARIMSAL YÖNDEN ÖNEMLİ FUNGUSLARIN MUHAFAZASI ve KOLEKSİYONLARI

İnci GÜLER GÜNEY¹, Sibel DERViş^{1*}

¹ Mardin Artuklu Üniversitesi, Kızıltepe Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Mardin, Türkiye

*Sorumlu yazar: sibeldervis@gmail.com

1. GİRİŞ

Bitki patojenleri ile ilişkili genotipik, fenotipik ve epidemiyolojik verilerin kolayca erişilebilen ve aranabilen bir formatta arşivlenmesi, patojenlerin değişimini ve hareketini izlemeye yardımcı olabilmektedir. Doğada keşfedilmemiş patojen çeşitliliği, patojen kültürlerinin kataloglanmasının önemi daha da artmaktadır. Etkili hastalık kontrolü geliştirmek için patojen genomiklerinin potansiyelinin farkında olmak referans olarak dizilenmiş izolatları ne kadar etkili kullandığımıza da bağlı olmaktadır.

Fungal kültür koleksiyonlarının amacı, izolatları elde etme zamanındaki koşullarındaki şekliyle, kültürün genetik, fizyolojik veya morfolojik özelliklerinin hiçbirinde değişiklik olmaksızın canlılığını muhafaza ettirmek ve streyni sonraki araştırma, öğretim ve biyoteknolojik süreçler için ana materyal kaynağı olarak korumaktır. Biyolojik koleksiyonların oluşturulması ve korunması sürekli bakım gerektirmekte ve bu da araştırmacılar için oldukça zorlayıcı olabilmektedir. Funguslar için koruma yöntemlerinin, mikologlar ve bitki patoloğları için bazı bilimsel çalışmalarda yararlı olan ve önemli bir biyolojik mirası temsil eden ex situ koleksiyonlarda (doğal konumdan uzakta, örneğin bir laboratuvarda, koleksiyonda vb.) büyük öneme sahip olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, farklı fungus gruplarında uygun ve başarılı bir koruma yöntemi tespit etmek için yeterli çalışma bulunmamaktadır. En uygun koruma, uzun süreler sonra bile kültürün orijinal özelliklerini (canlanabilirlik, sporülasyon ve patojenisite gibi) koruyan, mutasyon ve istenmeyen kontaminasyonları

engelleyen yöntemin kullanılmasıdır. Koruma yönteminin seçimi, araştırmacının laboratuvar altyapısına, mikroorganizmasına, amaçlarına, tercihlerine ve bilgisine bağlıdır (Beloti ve ark., 2017).

Tarım ürünlerinde patojenlerin mikroorganizma koleksiyonları, uygulamalı araştırmalar ve özellikle de dayanıklılık ıslahı ve patojen adaptasyonu nedeniyle dayanıklı konukçu genotiplerini araştırmalara yönelik çalışmalarda kullanılmıştır. Bazı durumlarda muhafaza etmek için en iyi metodu bulmaya girmeden önce kültürler üzerinde çalışmak zorunludur. Koleksiyonlar ve kullanılan muhafaza yöntemleri kültürlerin maruz kalacakları zararları minimize etmek için iyileştirilmeli ve geliştirilmelidir. Dünya genelinde fungus kültür koleksiyonları Büyük Britanya’da bulunan Commonwealth Mikoloji Enstitüsü (C.M.I.), Hollanda’da bulunan Westerdijk Fungal Biyoçeşitlilik Enstitüsü (daha önceden ismi C.B.S. kısaltması ile Fungal Biyoçeşitlilik Merkezi idi) ve 1925’te Amerika Birleşik Devletleri’nde Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu ismiyle kurulan ama şu anda 150’den fazla ülkede dağıtım yapan büyük bir kuruluş olan ve ismi Küresel Biyolojik Kaynak Merkezi olarak değiştirilen A.T.C.C. gibi uluslararası enstitü kuruluş ve ya merkezlerde ve diğer pek çok uluslararası laboratuvardaki kültür koleksiyonlarında (CBS, IMI, BCC, IHEM, FGSC, NRRL, UAMH vb) korunmaktadır. Fungal kültürler bu merkez veya kuruluşlardaki koleksiyonlardan parayla temin edilebilmektedir. Fakat bunlar bazı güvenlik önlemleri olmaksızın dağıtılamamakta ve yalnızca deneyimli kişi veya kuruluşlara verilebilmektedir Ayrıca çoğu mikoloji enstitüsü ve üniversite

laboratuvarları kendi kültürlerini uygun şekilde saklamak için küçük çaplı koleksiyonlara sahiptir.

2. Fungusların Muhafaza Yöntemleri ve Güncel Çalışmalar

Fungal kültürlerin kısa süreli (≤ 1 yıl) ve uzun süreli (> 1 yıl) muhafaza edilmesine yönelik bir dizi yöntem açıklanmıştır (Castellani, 1964; Hwang, 1966; Gale ve ark., 1975; De Capriles ve ark., 1989; Nishii ve Nakagiri, 1991; Pasarell ve McGinnis, 1992; Nakasone ve ark., 2004; Baskarathevan ve ark., 2009; Guimarães ve ark., 2014). Kısa süreli koruma, küçük bir kültür koleksiyonu için uygun olan kültürlerin periyodik olarak alt kültüre alınmasıyla (Fennell, 1960) öteden beri gerçekleştirilmektedir (Nakasone ve ark., 2004; Homolka, 2013). Alt kültürlemenin dezavantajlarını ortadan kaldırmak için çeşitli saklama yöntemleri geliştirilmiştir (Heckly, 1978; Smith, 1982; Nakasone ve ark., 2004). Uzun süreli koruma; kültürlerin yağ ile kaplanması, damıtılmış suya daldırılması, odun yongaları, tahıl taneleri veya agar şeritleri gibi organik bir maddede saklama, silika jelde saklama, -80°C 'de veya sıvı nitrojen kullanılarak ultra düşük bir sıcaklık olan -196°C 'de kriyoprezervasyon, liyofilizasyon gibi yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Castellani, 1964; Hwang, 1966; Gale ve ark., 1975; de Capriles ve ark., 1989; Nishii ve Nakagiri, 1991; Pasarell ve McGinnis, 1992; Smith ve Thomas, 1998; Nakasone ve ark., 2004; Borman ve ark., 2006; Baskarathevan et al diğerleri, 2009; Webb ve ark., 2011; Guimarães ve ark., 2014).

Fungus kültürlerinin korunması için ucuz ve az bakım gerektiren suda saklama yönteminde su kültürü hazırlamak için kullanılabilir iki basit teknik vardır. Bunlardan ilki uygun bir ortamda büyütülen fungus kültürlerinden kesilmiş birkaç diskin, birkaç mililitre sterilize su ile doldurulmuş steril, küçük vidalı kapaklı şişelere aktarılmasıdır. Hazırlanan kültürler kapatılarak oda sıcaklığında veya buzdolabında +4 C°'de saklanmaktadır. İkinci yöntemde ise kültürlerin vidalı kapaklı tüplerde hazırlanan agar eğikleri, 6–7 ml steril damıtılmış su ile kaplanmakta ve fungus sporları ve hiflerini suya karıştırmak için hafifçe karıştırılmakta ve bu şekilde elde edilen fungus süspansiyonu, steril cam şişelere aseptik olarak aktarılmakta, şişeler sıkıca kapatılmakta ve etiketlenerek 4 C°'de saklanmaktadır (McGinnis ve ark., 1974). Suda saklamanın değişik versiyonları da vardır. Örneğin mısır tohumları üzerinde steril deiyonize suda saklanan *Phytophthora clandestina* kültürleri için patojenisite kaybı olmaksızın yüksek canlanma oranları bildirilmiştir (Simpfendorfer ve ark., 1996). Ayrıca ortam sıcaklığında steril su içinde agar diskleri halinde saklanan *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* izolatları, 20 yıldan uzun süre canlı kalmıştır (Hornby ve ark., 1998) ve buğday bitkisindeki virülenslikleri 10 yıl sonra bile değişmemiştir (Elliott, 2005).

Fungus kültürleri için ikinci düşük maliyetli ve basit koruma yöntemi mineral yağ kullanımıdır (Sherf, 1943). Bu yöntemde vida kapaklı şişelerdeki eğik kültürlerin üzeri az miktarda steril mineral yağ ile kaplanır. Şişeler saklanmadan önce Parafilm ile de kapatılabilir (Elliott, 2005). Bu yöntemde yağ, uzun saklama süresince ortamın

dehidrasyonunu önler ve bu yöntemin etkinliği birçok bitki patojenik fungus için kanıtlanmıştır.

Silika jelde saklama da ucuz ve basit bir yöntemdir (Perkinsd, 1962). Bu yöntemin öncesinde vidalı kapaklı tüpler 6 ila 22 gözenekli sterilize edilmiş (180°C'de 90 dakika steril edilmiş) silika jel ile doldurulur. Silika jel daha sonra yaklaşık 4°C'ye soğutulur ve bir buzlu su banyosuna yerleştirilir. Fungus sporları kuru toz haline getirilmiş yağsız süt ve distile su (%10) çözeltisi içinde (önceden 4°C'ye soğutulmuş) süspansiyon edilir. Spor süspansiyonu silika jele eklenir ve 30 dakika buz banyosunda bırakılır. Bu tüpler oda sıcaklığında 1–2 hafta tutulur ve fungusların canlılıkları agar ortamlarında değerlendirilir. Kültürler canlıysa, tüpler üzerindeki kapaklar sıkıca kapatılır ve tüpler 4°C'de sıkıca kapatılmış bir kaptaki saklanır. Bu yöntemin dezavantajı bazı fungusların sporlanma yeteneğini kaybetmesi ve saklama süresinin 2–4 yıl arasında oldukça kısa olmasıdır (Onions, 1983; Smith, 1993).

Toprak kökenli fungusların uzun süreler boyunca saklanmasında toprakta saklama metodu geliştirilmiştir (Atkinson, 1954). Bu yöntemde %20 su içerikli toprak veya kum 60 ml'lik cam şişelere konular ve 121°C'de 25 dakika otoklavlanarak sterilize edilir. Bir haftalık fungal bir kültüre uygun hacimde sterilize su eklenerek hazırlanan fungus spor süspansiyonu her şişeye bir mililitre olacak şekilde eklenir. Oda sıcaklığında 2–14 gün inkübasyondan sonra fungus gelişimi olan şişeler 4°C'de saklanır. Tahıl taneleri (arpa, darı, yulaf, çavdar, sorgum, buğday vb.), saman, filtre kağıdı, odun yongaları ve böcekler, fungusların organik madde kullanılarak saklanmasında

kullanılar substratlardan bazılarıdır. Tahıl tohumlarının kullanıldığı yöntemde tohumlar kloramfenikol (50 ng/ml) içeren suda bir gece ıslatılır. Suları uzaklaştırıldıktan sonra taneler vidalı kapaklı şişelere yerleştirilir ve 2 ardışık gün boyunca 121°C'de 1 saat otoklavlanır. Şişeler aktif olarak büyüyen kültürlerle inokule edilir ve 23–27°C'de 7–10 gün inkübe edilir. Kültürler bir kurutma çemberinde iyice kurutulduktan sonra şişelerin üzerindeki kapaklar sıkılarak Parafilm ile sarılır ve şişeler –25°C'de saklanır (Sneh et al. 1991). Ayrıca tahıl tanelerinin 50 ml'lik bir erlene konulduğu, eşit hacimde damıtılmış su ilave edildiği ve şişelerin 121°C'de 30 dakika otoklavlandığı, bu tohumların fungusla inokule edildiği, inkübasyon sonunda fungusla kolonize olmuş tohumların küçük miktarlarının aseptik olarak steril 2 ml eppendorf tüplerine aktarıldığı, bunların etiketlenerek -80°C'de saklandığı farklı hazırlama yöntemleri de kullanılmıştır (Abd-Elsalam ve ark., 2010).

Steril selofan kareler (SSK) ile muhafaza yönteminde fungusların uzun süreli korunması ve hızlı canlandırılması için SSK dayanan yeni, yüksek verimli bir yöntem açıklamıştır (Hu ve ark., 2013). Bu yöntemde selofan (1.0 m²; Shanghai Bio-Tech Co., Ltd.) kareler (40–50 mm²) halinde kesilmiş ve 121°C'de 20 dakika cam Petri kaplarında (90-mm-çaplı) otoklavlanmıştır. Otoklavlamadan sonra, SSK yapışmayı önlemek için steril suya batırılmış ve daha sonra steril pens yardımıyla plastik Petri kaplarında katı agar ortamının (Patates Dekstroz Agar; PDA) yüzeyine düz bir şekilde yerleştirilmiştir. Bu yöntemde bir fungal stok kültüründen alınan 10³ ml⁻¹ spor yoğunluğundaki 20–30 µl

inokulum doğrudan SSK'ye yerleştirilmiştir. Bununla birlikte, SSK'nin üzerine küçük agar-fungus parçaları (5–10 mm²) konulması veya hif ve fungus sporları içeren süspansiyonun öze ile çizilmesi yöntemleri ile de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan tüm streynler için, 28°C'de 4–5 günlük bir inkübasyon süresi SSK kolonizasyonu elde etmek için yeterli olmuştur ancak bu süre seçilen streyne bağlı olarak uzatılabilmektedir. Fungusla üzeri tamamen kaplanmış SSK, steril pens yardımıyla PDA'dan dikkatlice ayrılmış, hemen boş bir steril Petri kabına yerleştirilmiş ve steril makas kullanılarak daha küçük kareler (10 mm²) halinde kesilmiştir. SSK daha sonra 28°C'de inkübatörde 3 gün boyunca tamamen kurumaya bırakıldıktan sonra fungus içeren SSK steril 2.0 ml hacimli kriyoviyallere yerleştirilmiş ve uzun süreli saklama için ultra düşük sıcaklıkta bir dondurucuda –80°C'de dondurulmuştur. Ayrıca, fungus içeren SSK'nin de –196°C'de de saklanabileceği düşünülmüştür. Çünkü birkaç fungus streyninin (örn. *Trichoderma* ve *Aspergillus* türleri) sıvı nitrojende 50 gün saklamadan sonra %100 canlanabilirlik gösterdiği rapor edilmiştir.

Dondurarak muhafaza yöntemi, eğik agar kültürlerinin uygun büyümeye ulaştıktan hemen sonra veya gelişmiş kültürlerden kesilen disklerin kriyoprotektan olarak steril %15 gliserol çözeltisi içeren kriyoviyal tüplerine aseptik olarak aktarılmasından hemen sonra bu tüplerin –20 ila –95°C arasındaki dondurucuya yerleştirilmesiyle uygulanabilir (Carmichael, 1962; Ito ve Yokoyama, 1983).

Tahıl taneleri, bitki parçaları, agar şeritleri, filtre kağıdı ve kürdan gibi organik substratlar üzerinde geliştirilmiş funguslar da donmuş halde kriyotüp, eppendorf tüp, steril zarf vb. içerisinde saklanabilir. Sıvı nitrojende fungusların korunmasında (Loegering ve Harmon, 1961), gelişen kültürlerden kesilen 4 mm çaplı diskler, 0.5-1.0 ml steril %10 (v/v)'luk gliserol solüsyonu ile doldurulmuş steril 2 ml'lik kriyoviyal vidalı kapaklı tüplere yerleştirilir. Alternatif olarak, petri kapaklarının yüzeyindeki fungus kolonisinin yüzeyine %10 (v/v)'luk gliserol veya %5 dimetil sülfoksit gibi hücre zarlarından geçerek fungal hücreyi hem hücre içi hem de hücreler arası koruyan kriyoprotektanlar dökülerek (glikoz, sukroz, laktoz, dekstran, mannitol, sorbitol, polivinil-pirolidon ve hidroksietil nişasta gibi hücre zarına nüfuz etmeyen ve koruyucu etkilerini fungal hücre zarının dışında uygulayan kriyoprotektanlar veya bazı Basidiomycetes için geliştirilen polipropilen ve perlit gibi kriyoprotektanlar da kullanılabilir) ince bir pipet ile hafifçe kazınır ve 0.5 ml'lik kısımlarlar halinde kriyotüplere pipetle aktarılır. Tüpler etiketlendikten sonra ya doğrudan bir sıvı nitrojen tankına (-170°C) ya da programlanmış bir dondurma bölmesine yerleştirilir. Diğer bir seçenek de, kriyotüplerin 10 dakika 4°C 'de tutulması, ardından 4°C 'den -40°C 'ye ($1^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$) ve -40°C 'den -90°C 'ye ($10^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$) ve daha sonra -150°C ila -180°C 'deki sıvı nitrojen tankına aktarılmasıdır. 4 cm uzunluğundaki polipropilen pipetler ucuz oldukları ve sıvı nitrojen kaplarında daha az yer gerektirdiği için kriyoviyallere oranla daha etkin bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu pipetlerin sıvı nitrojene aktarılmadan önce -70°C 'lik

bir dondurucunun üst kısmına en az 4 saat süreyle yerleştirerek soğutulmakta ve uç kısımları ısıyla kapatılmaktadır.

Liyofilizasyon (dondurarak kurutma), birçok büyük kültür koleksiyonunun tercih ettiği uygun bir tekniktir (Onions, 1983; Gallo ve ark. 2008). Bu işlem ile fungal kültürler 20–40 yıl muhafaza edilebilmektedir. Bu yöntemin esası fungal spor süspansiyonunun dondurulması ve daha sonra kurutulmasına dayanmaktadır. Smith ve Onions (1994) tarafından özetlenen prosedüre göre eğik agarda geliştirilen bir fungal kültürün üzerine yaklaşık 1.5–2 ml yağsız süt eklenir ve agarın yüzeyi bir pasteur pipetiyle hafifçe kazınarak bir spor süspansiyonu elde edilir. Spor süspansiyonu liyofilizasyon tüpüne eklenir ve ağızları pamukla kapatılır. Her tüpün içeriği, tüplerin kuru buz ve etilen glikol banyosuna daldırılmasıyla 10 dakikada dondurulur. Cam tüpün açık ucu uygun bir sistem basıncına ulaşılan kadar yaklaşık 30 dakika süreyle bir vakuma tabi tutulurken hint yağı ile yağlanır. Tüpler daha sonra vakum altında oksijen gazı ile kapatılır. Liyofilize kültürler kullanılana kadar kapalı plastik kaplarda 4°C'de saklanabilir.

Fungusun bitki örneğiyle birlikte kurutulmuş muhafaza edilmesini sağlayan herbarium koleksiyonları da gelecekteki araştırmalar için zengin bir DNA kaynağı oluşturmaktadır. Herbarium örnekleri yeni türleri tanımlarken Botanik Kod'un bir gerekliliği olsa da, patojenik bir türü tanımlarken yararlı bilgiler sağlayamamaktadır. Bitki patojenik fungusların sistematüğinde moleküler sekans analizinin artan kullanımı, kültür koleksiyonlarında fungusların tek başına muhafaza edilmesinin gerekli hale geldiğini göstermektedir. Birçok patojen grubu, tür

komplekslerinden oluşmaktadır. Dolayısıyla morfoloji artık tek başına türler arasında ayırım yapamamaktadır. Kültürlerin saklanması da moleküler tekniklerin kullanımını içeren tür karşılaştırmaları için gereklidir. Bu nedenle, herhangi bir yeni patojen türünün eski tip kültürleri, yeni hastalıklar veya patojenik streynleri içeren çalışmalar yayınlandığında incelenen taksonların kültürleri, yaygın olarak bulunan kültür koleksiyonlarında tercihen de Dünya Kültür Koleksiyonları Federasyonu'nun en az üç üyesinde saklanmalıdır (Abd-Elsalam ve ark., 2010).

Fungal kültürlerin farklı muhafaza yöntemlerini içeren güncel çalışmalar incelendiğinde; Lastra ve ark. (2020) Arjantin'de 684 strain kültür koleksiyonunda silika jelde, kağıt kültürlerde ve distile suda ve -20 ve -70°C dondurucuda saklanan ve liyofilize edilen kültürleri canlandırarak moleküler yöntemlerle teşhisini gerçekleştirmişlerdir.

Mancera-López ve ark. (2019) bu çalışmada *Trichoderma harzianum* streynini sodyum aljinat kapsüller (beyaz kapsüller) içinde hareketsiz hale getirerek ve ardından bunları bir sütun kabarcık reaktöründe (yeşil kapsüller) çoğaltarak gerçekleştirilmiştir. Emülsiyon iç jelleştirme ve damlatma yöntemleriyle üretilen üç kapsül çapı (mikro, orta ve büyük kapsüller) test edilmiştir. Orta kapsüllerin (1.5 ± 0.3 mm) daldırılmış kültürde konidilerin çok miktarda salınımına neden olduğu ve kapsül başına konidilerin yoğunluğu ne kadar yüksek olursa, ultraviyole radyasyona karşı korumanın o kadar büyük olduğu sonucuna varılmıştır. Kalsiyum aljinatta konidilerin korumasıyla ilgili olarak, hem beyaz hem de yeşil kapsüllerde oda sıcaklığında depolamadan iki

yıl sonra yaklaşık %30'luk bir canlılık kaybı gözlenmiş; konidilerin canlılığının analiz edildiği iki yıl boyunca formülasyonun saflığı doğrulanmıştır.

Webb ve ark. (2018) bu çalışmada 24 özel tür de dahil olmak üzere Fungal Genetik Stok Merkezi'nden saklanan 374 *Fusarium* streyni koleksiyonu kopyalanarak sıvı nitrojenin üzerindeki buhar fazında saklanmak üzere Ulusal Genetik Kaynakların Korunması Laboratuvarı'na gönderilmiştir. Sonuçlar -165°C 'de sıvı nitrojen saklamasının *Fusarium* spp.'nin 5 yıldan fazla bir süreyle saklanması için güvenilir bir metot olduğunu ve kültür canlılığı verileri ek depolama sırasında daha uzun süreler boyunca canlı kalacağını da göstermiştir.

Lakshman ve ark. (2018) kriyojenik koşullar altında spor oluşturmeyen üç basidiomiset cinsi için *Rhizoctonia solani* (teleomorf: *Thanatephorus cucumeris*), bir *Ceratobasidium* türü ve *Waitea circinata* ve spor oluşturmeyen askomiset *Sclerotinia sclerotiorum*, karşılaştırma için spor oluşturan askomiset funguslardan, *Alternaria alternata*, *Bauveria basiana*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladiolii*, *Trichoderma* spp. ve *Thielaviopsis basicola*'da ticari olarak temin edilebilen gözenekli boncuklarda (Microbank™) kriyoprezerve edilmiştir. Test edilen tüm fungal izolatlar, -80°C 'de beş yıl süreyle saklamadan sonra Microbank boncuklardan tekrar elde edilebilmiştir ki bu süre agar disklerde ve kolonize buğday tohumlarında dondurularak saklanan izolatların canlılıklarından daha uzun bir sürede gerçekleşmiştir.

Ayala-Zermeno ve ark. (2017) entomopatojenik fungusların (EPF) *Beauveria bassiana*, *Metarhizium acridum*, *M. anisopliae*, *M. rileyi*, *Isaria javanica*, *Hirsutella thompsonii*, *H. citrifomis* ve *Lecanicillium lecanii*'yi mineral yağ (MO), steril su (SW), silika jel (SG), liyofilizasyon (L), -70°C 'de ultra-soğuk dondurma ve -196°C 'de kriyoprezervasyonla saklanmıştır. Genetik stabilite 24. ayda amplified fragment length polimorfizmi (AFLP) analizi ile test edilmiştir. 24 aylık saklamada AFLP modellerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. EPF için en etkili koruma yöntemleri SG, L, -70 ve -196°C olmuştur. *Beauveria bassiana*, *M. acridum*, *M. anisopliae*, *M. rileyi* ve *I. javanica* tüm yöntemlerde stabil kalırken, kalan türler daha az stabil kalmıştır.

Beloti ve ark. (2017) fitopatojenik funguslar için daha önce hiç kullanılmayan jelatin koruma yöntemini 17 kültürde değerlendirmek için çalışmalarını Brezilya'nın Uberlândia (MG) şehrinde UFU'da (Universidade Federal de Uberlândia) Mikoloji ve Bitki Koruma Laboratuvarı'nda (LAMIP) gerçekleştirmiştir. Steril toprak (68 kültür), 4°C 'de (10 streyn) dirençli yapılar (*Sclerotinia sclerotiorum*) ve mineral yağ (31 kültür) gibi diğer klasik yöntemler de bu yöntemle birlikte değerlendirilmiştir. Jelatin yöntemi 10 kültürde uygulanabilirlik sağlamıştır. *Colletotrichum* spp., *Septoria* spp., *Fusarium* spp., *F. moniliforme* var. *Subglutinans*, *Macrophomina* spp., *Phomopsis* spp. ve *Verticillium* spp. cins ve türlerin korunması için uygun bulunmuştur.

Sari ve ark. (2017) entomopatojenik fungus *Metarhizium majus*'un 15 günlük kültürlerinin steril su ve kriyoprotektanlarla kazınmasıyla elde edilen solüsyonlarla yaptıkları çalışmada, steril suda -80°C 'de koruma

yöntemi fungusun geri kazanılmasına izin verirken, 10%'luk gliserol ve %5 trehaloz'lü 10%'luk gliserol gibi kriyoprotektanlarda -80° C'de korumanın etkili olmadığı (düşük oranda geri kazanımına neden olduğu) gösterilmiştir.

Crahay ve ark. (2017) araştırmacılar bu çalışmalarında, altı ektomikorizal (ECM) fungus izolatının genetik stabilitesini AFLP kullanarak analiz etmiştir. İzolatlar ya kriyoprezervasyonla (-130° C'de) veya düzenli alt kültüre almayla 4° C'de saklanarak 2 yıl süreyle saklanmıştır. Petri kaplarında $22-23^{\circ}$ C'de 2 yıl (yani herhangi bir alt kültüre alma olmadan) tutulan izolatlardan oluşan üçüncü bir koruma yöntemi de çalışmaya dahil edilmiş ve kontrol olarak kullanılmıştır. Her iki yöntemin de ECM fungal izolatlarının 2 yıllık bir süre boyunca saklanması için kullanılabileceği bildirilmiştir.

Gutierrez ve ark. (2017) 23 entomopatojen cinse ait (16 Ascomycota, 4 Entomophthoromycotina, 2 Glomeromycota ve 1 Oomycota) 421 strainlik entomopatojen kültür koleksiyonunda -20° C ve -70° C'de dondurucuda, kağıt kültürlerde ve distile suda sakalanan ve liyofilize edilen kültürleri canlandırarak moleküler yöntemlerle teşhisini gerçekleştirmişlerdir.

Fraser ve ark. (2016) am ibresi patojeni *Dothistroma septosporum* saklanması için yaygın olarak kullanılan 4° C'deki eğik agar, -20° C'de eğik agar, 4° C'de steril ters ozmoz (RO) suyu altında miselyal diskler, 4° C'de steril mineral yağ altında miselyal diskler, 4° C'de üzeri herhangi bir şeyle örtülmemiş miselyal diskler ve -80° C'de steril %10 gliserol altında miselyal diskler olmak üzere altı yöntemle karşılaştırmışlardır.

Bu çalışmada, kültürlerin yeniden canlanması 12 ve 21 ay sonra değerlendirilmiştir. Miselyal disklerin 4°C'de steril RO suyu altında ve -80°C'de steril %10 gliserol altında saklanması, her iki zaman aralığı için de kültürlerin %100 canlanmasına neden olmuş ve bu nedenle de bu yöntemler bu fungusun saklanması için tavsiye edilmiştir. Kalan dört yöntem kullanıldığında canlanma oranları 12 ayda %70'in altında olmuştur.

Hiruma ve Saijo (2016) bir askomycete cinsi olan, hemibiotrofik bir infeksiyon stratejisi kullanan ve model bitki *Arabidopsis thaliana*'da dahil olmak üzere çeşitli konukçu bitkilerde antraknoz hastalıklarına neden olan *Colletotrichum* türlerinin uzun süreli korunması için kullanılan yöntemleri açıklamaktadır. *Colletotrichum* türlerinin uzun vadeli korunması için gliserol ve filtre kâğıdı stoklarının nasıl hazırlandığını açıklamışlar, her iki yöntemin de kolaylıkla kullanılabilirliğini ve en az birkaç yıl boyunca stabil bir koruma sağladığını belirtmişlerdir.

Thach ve ark. (2015) *Puccinia striiformis*'in genellikle "Stubbs koleksiyonu" olarak anılan bir spor örnekleri koleksiyonunu 18 ile 45 yıl arasında sıvı nitrojende saklanmıştır. Canlanma oranı, ırk tespiti ve önceden belirlenmemiş virülenslik 35 ülkeyi ve 28 yılı temsil eden bir örnek alt kümesinde araştırılmıştır. Konukçu bitkileri inokule ederek izolatların geri kazanımı için, bir pistol püskürtücü ve Novec™ 7100 kullanarak geliştirilen yeni bir yöntem oldukça başarılı olmuştur. Bu yöntemle 231 izolatin %96'sı geri kazanılmıştır. Bu çalışmada çeşitli araştırmalar ve bitki ıslahında kullanılan biyolojik koleksiyonların

değeri, biyotrofik mikroorganizma koleksiyonlarını sürdürmenin zorlukları ile birlikte tartışılmıştır.

Wu ve ark. (2013) dünya çapındaki mikroorganizma kataloğunu (Global Catalogue of Microorganisms-GCM) incelemişlerdir. Bu katalogta 25 ülke ve bölgeden 52 koleksiyonda 43,436 bakteriyel, fungal ve arke türünden oluşan 273,933 streyn yer almıştır. Bu kapsamda mikrobiyologların faaliyetlerini kolaylaştıracak ve dinamik mikrobiyal kaynak veritabanı oluşturulmuştur.

Hu ve ark. (2013) steril selofan kare (SSK) yöntemini, yağlı tohumlarda *Sclerotinia* gövde çürüklüğünün biyokontrol ajanları olarak tanımlanan bir mikoparazitik streyn koleksiyonunun uzun vadeli korunması için test etmiştir: *Aspergillus* sp. ASP-4; *Trichoderma viride* streyni Tv-36; *Trichoderma* sp. TRI-1, filogenetik olarak farklı birkaç başka fungus da test edilmiştir. *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium oxalicum*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor circinelloides* ve *Neurospora crassa* funguslarında SSK yöntemi kullanılarak korunan fungus streynlerinin canlanma oranları tespit edilmiştir. Tüm streynler -80°C 'de bir yıllık saklamadan sonra %100 büyüme ve canlı kaldığını göstermiştir. Ayrıca bitki patojeni *Sclerotinia sclerotiorum*'un (korunmuş tüm mikoparazitik streynlerin örn. *Aspergillus* sp. ASP-4, *Trichoderma viride* Tv-36 ve *Trichoderma* sp. TRI-1) -80°C 'de 10 yıldan fazla bir süre de %100 canlı kaldıkları görülmüştür. Ascomycota ve Zygomycota'nın çeşitli üyelerini içeren funguslarda canlılığı sürdürmek için kullanılabileceğini göstermiştir.

Abd-Elsalam ve ark. (2010) bitki patolojisinde kültür koleksiyonlarının önemini tartışmakta ve bitki patojen kültürlerini saklamada kullanılan yöntemleri gözden geçirmektedir. Bu derlemede araştırmacılar, örnek olarak *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Phyllosticta* ve *Mycosphaerella* ve anamorflarını kullanarak bitki ve hasat sonrası patojenlerin tanımlanmasındaki yönelimleri tartışmış; mümkün olduğunda birkaç farklı koruma yönteminin birarada kullanılması gerekliliğini savunmuşlardır.

Gleason ve ark. (2007), Chytridiomycota kültürlerinde %10 gliserol dimetilsülfoksit gibi kriyoprotentantlar içerisinde aerobik ve anaerobik chytrid'lerin soğukta saklanmasının yüksek oranda canlılık sağladığı bildirilmiştir. Bu çalışmada dondurma ve eritmenin kontrollü koşullarda yapılması gerektiği bildirilmiştir.

Morgan ve ark. (2006) mikroorganizmaların özellikle dondurarak kurutmanın mikroorganizma türlerinin geniş kültür koleksiyonlarının taşınması ve depolanması için tercih edilen bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Kültürler azaltılmış basınç altında su buharının geri çekilmesi ile donmuş durumda kurutulur. Kurumuş kültürler ve spor süspansiyonları kapaklanır ve cam ampuller içinde muhafaza edilir. Bu sağlıklı sporlanan kültürlere uygulanır. *Phytophthora*, *Phytium* spp. gibi miselyal formlar ilk muamelede canlı kalmayabilir. En son kültürler tamamen cam içinde kapaklanır. Böylece çapraz infeksiyon veya akar riski olmaz. Fungus ilk uygulamada canlı kalırsa 10 yıl veya daha fazla bir süre canlılıklarını sürdüreceklerdir.

Borman ve ark. (2006), Bristol'de Birleşik Krallık Mikoloji Referans Laboratuvarı'nda bulunan Birleşik Krallık Ulusal Patojenik Mantarlar Koleksiyonu'nda (NCPF) bulunan ve 'Castellani' yöntemi ile steril suda saklama metodunu değerlendirmiştir. Bu fungusların saklanma süresi 2 aydan 21 yıla kadar değişmiştir. Araştırma sonucunda saklanan organizmaların yüzde doksanının canlı kaldığı tespit edilmiştir. 'Castellani' yönteminin çoğu fungusun uzun vadeli korunması için kolay ve ucuz bir yöntem olmaya devam ettiğini, buna karşın uzun süreler boyunca hem canlılık hem de morfolojik stabiliteyi muhafaza etme şansını artırmak için suda saklamanın ikinci bir saklama yöntemiyle desteklenmesi gerektiğini de göstermiştir.

Elliott (2005), fungal bitki patojeni *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*'i 12 farklı saklama yöntemi ile korumuştur. Saklama uygulamaları 4°C, 28°C ya da ortam sıcaklığında mineral yağ ile ya da mineral yağ olmadan patates-dekstroz agar eğiklerini; -75°C veya -20°C'de gliserol solüsyonuna yerleştirilmiş miselyal agar disklerini; 4°C'de veya ortam sıcaklığında steril deiyonize suya yerleştirilen miselyal agar disklerini; ve kurutulup küçük parçalara kesilmiş (ortam sıcaklığında küçük şişelerde saklanmış) veya kesilmemiş (ortam sıcaklığında ısıyla kapatılmış torbalar içinde saklanmış) filtre kağıtları üzerinde miselyal büyümeyi içermiştir. Canlılık 6., 12., 24., 36., 48. ve 120. aylarda değerlendirilmiştir. İzolatların canlı kalması için en iyi üç uygulama tümü ortam sıcaklığında olmak üzere mineral yağ içeren veya içermeyen PDA eğikleri ve suda saklanan miselyal agar diskleri olmuştur. En kötü uygulamalar ise 4°C'de saklanan agar eğikleri ve

sudaki agar diskleri ve -20°C 'de gliserol içinde saklanan agar diskleri olmuştur. Çalışma sonucunda ortam sıcaklığında suda saklanan miselyal agar disklerinin bu türün uzun süreli sürdürülebilir bir saklama yöntemi olduğu savunulmuştur.

Nagai ve ark. (2005) 14.836 fungus, bakteri, maya ve diğer mikroorganizmalar, kriyoprezervasyon ve dondurarak kurutma dahil olmak üzere çeşitli yöntemlerle korunduğunu belirtmiştir. Test edilen maya, bakteri ve Actinomycetes'in 2.334 streyninden test edilen streynlerin neredeyse tamamı (5 streyn dışında) dondurularak kurutulmuş formda iyi korunmuştur. Bu da dondurarak kurutmanın bunların korunması için uygun olduğunu göstermiştir. Fungusların test edilen 6.681 streyninden 6.578'i (%98,5) ve Oomycetes'lerin 414 streynin 264'ü (%63,8) sıvı nitrojenin buhar fazında bir yıllık korumadan sonra canlanmıştır. Korunan fungus streynlerinin canlı kalmasına ilişkin ayrıntılar şu şekilde olmuştur: Ascomycota'nın %99.0'ı (1.107 streyn/1.118 test edilen streyn), Basidiomycota'nın %96.1'i (1.552/1.615), Zygomycota'nın %98.6'sı (73/74) ve anamorfik fungusların %99.3'ü (3.846/3.874) canlı kalmıştır. Bu nedenle kriyoprezervasyon çoğu fungus streyninin korunması için mükemmel bulunmasına karşın birçok Oomycetes streyninin korunması için uygun bulunmamıştır.

Hoopen ve ark. (2004) bitki patojen araştırmalarında kullanılan üç *Rosellinia* izolatu için uygun koruma tekniklerini bulmayı amaçlamışlardır. *Rosellinia bunodes* mineral yağ ve silika jelde geleneksel saklama yöntemleri kullanılarak altı ila dokuz aya kadar

canlı kalmış ve saklanması en zor olan tür olmuştur. *Rosellinia necatrix* ve *Rosellinia pepo* çeşitli taşıyıcılarda en az 16 aya kadar ve *R. necatrix* silika jel içinde iki yıla kadar başarılı bir şekilde saklanmıştır. *R. necatrix* veya *R. pepo* sıvı nitrojende %100 canlı kalma oranıyla sorun yaratmamış ancak canlandırma sonrası radyal büyüme oranları kriyoprotektan ve çözülme oranlarından etkilenmiştir. Soğutma oranları izolatların hiçbirinde radyal büyümeyi etkilememiştir. Sonuçlar, *Rosellinia* türlerinin saklanması için genelleştirilmiş bir prosedürün geliştirilmesinin mümkün olmadığını ve ayrı ayrı izolatlar için başarılı saklama protokollerinin geliştirilmesi gerektiğini göstermiştir.

Santos ve ark. (2000) Oswaldo Cruz enstitüsünde bulunan 3–44 yıl süreyle steril mineral yağ altındaki PDA kültürlerinde saklanan değişik *Absidia* türlerinde (Zygomycota şubesi) %81 oranında canlılık elde etmişlerdir. Bunlardan %14'ü kontamine olmuş, %5'inin de ölü olduğu sonucuna vararak uzun süre saklama için PDA'da mineral yağ altında saklamanın uygun bir yöntem olduğu saptamıştır.

Ryan ve ark. (2000) değerli fungus kültürlerinin uzun vadeli korunmasının birkaç yolla sağlanabildiğini ve metodoloji seçiminin sorun olabildiğini ve tüm funguslara evrensel olarak hiçbir yöntemin uygulanamayacağını belirtmiştir. Bu çalışmada araştırmacılar bazı türlerin korunmasının oldukça zor ve diğer bazı fungusların ise hemen hemen her yöntemle korunabildiğini belirterek, kültürlerin uzun vadeli korunmasında en uygun yöntemi belirlemek için fungus özellikleri, kullanıcı olanakları ve ekonomiyle ilgili sorunları kullanan karar

temelli bir anahtar geliştirmiştir. Bu anahtar, önemli fungus kültürlerinin korunması düşünüldüğünde mikrobiyologların karar vermesini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca diğer bazı araştırmacılar fungusların korunması için kullanılan tekniklerin tekrarlanabilirliğinin ve kalitesinin nasıl sürdürüldüğünü açıklayan kılavuzlar yayınlamıştır (Smith ve Ryan, 2008; Smith ve Ryan, 2012; Wiest ve ark., 2012).

3. SONUÇ

Bitki patojenik fungusların uzun süreler boyunca hatta mikologların birçok generasyonu boyunca canlı tutulması ve bunların istikrarlı bir durumda korunması ve sürdürülmesi fitopatolojide her zaman önemlidir. Fungusların kültürel özelliklerine uygun, güvenli ve uzun vadeli muhafaza yöntemlerinin kullanılması, kültürlerin tekrarlı transferlerle kontaminasyona, akarlarla infeksiyona ve sıcaklık, ışık ve nem gibi olumsuz koşullara maruz kalmasını, mutant veya sporlanmayan streynler gelişmesini önlemektedir. Morfolojik, fizyolojik veya genetik değişiklik riskini en aza indirmek için koleksiyonu oluşturan cinsler ile bu fungusların korunması düşünülen özellikleri (morfoloji, virülens vb.) göz önünde bulundurularak koşullar elverdiği ölçüde birden çok yöntemle stoklar yedeklenmeli ve laboratuarlarda hijiyene önem verilmelidir. Benimsenen metodlar muhafaza edilecek kültürün sayısına, zamana ve mevcut olanaklara bağlı olarak değişim gösterecektir. Şu anda endüstri, tarım ve araştırmalar için önemli pekçok fungal kültürün güvenilir ve yeniden üretilebilir kaynaklarını sunabilen dünya genelindeki çeşitli koleksiyonlarda, biyolojik kaynaklarını arttırma eğilimi mevcuttur. Bu

koleksiyonlarda kriyoprezervasyon muhafaza yöntemlerinden sıvı nitrojende (-196°C) saklama, liyofilizasyon ve dondurarak saklama genomik ve fenotipik özellikleri koruma becerisi yönleriyle diğer tekniklerden daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlardan en popüler olan sıvı nitrojende saklama, zahmetli koruma adımları gerektirmektedir. Gene kriyoprezervasyonda fungal kültürü soğuğa karşı koruma sağlayan bir ajan (kriyoprotektan) kullanılmakta ve kriyoprotektan seçimi uygulanan organizmaya göre değişmektedir. Kültür koleksiyonunu uzun süreli muhafaza etmek genellikle ekipman ve personel gerektirmekte ve finans bakımından zorluklar oluşturmaktadır. Ayrıca yeterli bir sıvı nitrojen tedariki sağlama ihtiyacı da bir dezavantaj sayılabilmektedir.

4. KAYNAKÇA

- Abd-Elsalam, K.A., Yassin, M.A., Moslem, M.A., Bahkali, A.H., De Wit, P.J., McKenzie, E.H and Hyde, K.D., 2010. Culture collections, the new herbaria for fungal pathogens. *Fungal Diversity*, 45(1): 21–32.
- Atkinson, R.G., 1954. Quantitative studies on the survival of fungi in five-year-old dried soil cultures. *Can. J. Bot.*, 32:673–678.
- Ayala-Zermeño, M.A., Gallou, A., Berlanga-Padilla, A. M., Serna-Domínguez, M.G., Arredondo-Bernal, H.C., and Montesinos-Matías, R., 2015. Characterisation of entomopathogenic fungi used in the biological control programme of *Diaphorina citri* in Mexico. *Biocontrol Science and Technology*, 25(10):1192–1207.
- Baskarathevan, J., Jaspers, M.V., Jones, E.E., and Ridgway, H.J., 2009. Evaluation of different storage methods for rapid and costeffective preservation of *Botryosphaeria* species. *New Zealand Plant Protection*, 62: 234–237.
- Baskarathevan, J., Jaspers, M.V., Jones, E.E and Ridgway, H.J. 2009. Evaluation of different storage methods for rapid and cost-effective preservation of *Botryosphaeria* species. *New Zeal. Plant Prot.*, 62: 234–237.
- Beloti, I. F., Juliatti, B.C.M and Juliatti, F.C., 2017. Evaluation of the gelatin technique for the preservation of phytopathogenic fungi. *Bioscience Journal*, 33(4): 923–932.
- Borman, A. M., Campbell, C. K., Linton, C. J., Bridge, P. D and Johnson, E. M. 2006. *Polycytella hominis* is a mutated form of *Scedosporium apiospermum*. *Sabouraudia*, 44(1): 33–39.
- Carmichael, J.W., 1962. Viability of mold cultures stored at –20°C. *Mycologia*, 54:432–436.
- Castellani, A., 1964. The water cultivation of pathogenic fungi. *Annales des Societes belges de medecine tropicale, de parasitologie, et de mycologie*, 44, 217–219.
- Crahay, C., Munaut, F., Colpaert, J.V., Huret, S and Declerck, S., 2017. Genetic stability of ectomycorrhizal fungi is not affected by cryopreservation at

- 130°C or cold storage with repeated sub-cultivations over a period of 2 years. *Mycorrhiza*, 27: 595–601. DOI 10.1007/s00572-017-0770-3.
- De Capriles, C.H., Mata, S and Middelveen, M. 1989. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia*, 106(2): 73–79.
- Elliott, M.L., 2005. Survival, growth and pathogenicity of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* with different methods of long-term storage. *Mycologia*, 97(4): 901–907.
- Fennell, D.I., 1960. Conservation of fungous cultures. *The Botanical Review*, 26(1): 79–141.
- Fraser, S., Weitz, H.J., Brown, A.V and Woodward, S., 2016. Storage of *Dothistroma septosporum* cultures. *Path.*, 46: 547–550. Doi: 10.1111/efp.12189
- Gale, A.W., AW, G and KR, B., 1975. Cryogenic storage of conidia of *Sclerospora sorghi*.
- Gallo, M.B.C., Guimaraes, D.O., Luciano Da, S.M and Pupo, M.T., 2008. Natural products from endophytic fungi. In: Saikia R, Bezbaruah RL, Bora TC (eds) *Microbial Biotechnology*. New India Publishing Agency, pp.138–168.
- Gleason, F.H., Mozley-Standridge, S.E., Porter, D., Boyle, D.G., Hyatt, A.D., 2007. Preservation of *Chytridiomycota* in culture collections. *Mycological Research*, 111, 129–136.
- Guimarães, L.C., Fernandes, A. P., Chalfoun, S. M., and Batista, L. R., 2014. Methods to preserve potentially toxigenic fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1): 43–47.
- Gutierrez, A.C., Tornesello-Galvan, J., Manfrino, R.G., Hipperdinger, M., Falvo, M., et al. 2017. Organization and preservation of the collection of pathogenic and fungal symbionts of insects and other arthropods from CEPAVE (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina. *Rev Argent Microbiol* 49:183–8.
- Heckly, R.J., 1978. Preservation of microorganisms. *Advanced and Applied Microbiology*, 24: 1–53.
- Hiruma, K., and Saijo, Y., 2016. Methods for Long-Term Stable Storage of *Colletotrichum* Species. Paula Duque (ed.), *Environmental Responses in*

- Plants: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1398, DOI 10.1007/978-1-4939-3356-3_23.
- Homolka, L., 2013. Methods of cryopreservation in fungi. In Laboratory protocols in fungal biology (pp.9–16). Springer, New York, NY.
- Homolka, L., 2014. Preservation of live cultures of *Basidiomycetes*—recent methods. Fungal biology, 118(2): 107–125.
- Hoopen, G.M., Orti' Z, J.L., Aguilar, M.E. and Krauss, U., 2004. Preservation methodology for *Rosellinia* species. Mycol. Res. 108 (3): 274–282. DOI: 10.1017/S0953756204009712.
- Hornby, D., Bateman, G.L., Gutteridge, R.J., Lucas, P., Osbourn, A.E., Ward, E and Yarham, D.J., 1998. Take-all disease of cereals. In: Hornby D (ed) A regional perspective. CAB International, Wallingford, p.384.
- Hu D., Liu B., Dijkshoorn L., Wang L., Reeves P.R., 2013. Diversity in the major polysaccharide antigen of *Acinetobacter baumannii* assessed by DNA sequencing, and development of a molecular serotyping scheme. PLOS One, 8:e70329. 10.1371/journal.pone.0070329.
- Humber, R.H., 2016. Seeking stability for research and applied uses of entomopathogenic fungi as biological control agents. Journal of Asia-Pacific Entomology, 19: 1019–1025.
- Hwang, S.W. 1966. Long-term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. Applied Microbiology, 14(5): 784–788.
- Ito, T. and Yokoyama, T., 1983. Preservation of basidiomycete cultures by freezing. IFO Res Commun, 11:60–70.
- Lakshmana, D.K., Singh, V., and Camacho, M.E., 2018. Long-term cryopreservation of non-spore-forming fungi in Microbank™ beads for plant pathological investigations. Journal of Microbiological Methods, 148: 120–126.
- Lastra, C.C.L., Manfrino, R.G., Rodriguez, M.B., Gutierrez, A., Ordoqui, E and Navone, G.T., 2020. Catalogue of the culture collection of symbionts and pathogenic fungal species of insects and other arthropods from Argentina. Gayana Bot., 77: 23–37.

- Mancera-López, M.E., Izquierdo-Estévez, W.F., Escalante-Sánchez, A., Ibarra and Josefina Barrera-Cortés, J.E., 2019. Encapsulation of *Trichoderma harzianum* conidia as a method of conidia preservation at room temperature and propagation in submerged culture. *Biocontrol Science and Technology*, 29(2): 107–130, Doi: 10.1080/09583157.2018.1535053.
- McGinnis, M.R., Padhye, A.A., Ajello, L., 1974. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. *Appl. Microbiol*, 28: 218–222.
- Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A., and Vesey, G., 2006. Preservation of microorganisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods*, 66, 183–193. Doi:10.1016/j.mimet.2006.02.017.
- Nagai, T., Tomioka, K., Takeuchi, K., Iida, M., Kawada, M., and Sato, T., 2005. Evaluation of preservation techniques of microorganism resources in the MAFF Genebank. *JARQ-Japan Agricultural Research Quarterly*, 39: 19–27.
- Nakasone, K.K., Peterson, S.W., and Jong, S.C., 2004. Preservation and distribution of fungal cultures. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Amsterdam, Elsevier Academic Press, Pages, 3: 37–47.
- Nishii, T., 1991. Cryopreservation of oomycetous fungi in liquid nitrogen. *IFO Research Communications*, 15, 105-118.
- Onions, A.H.S., 1983. Preservation of fungi. In: Smith JE, Berry DR, Kristiansen B (eds) *The Filamentous Fungi*, vol. 4: *Fungal Technology*. Edward Arnold, Great Britain, pp.373–390.
- Pasarell, L and McGinnis, M.R., 1992. Viability of fungal cultures maintained at -70 degrees C. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(4): 1000–1004.
- Perkins, D.D., 1962. Preservation of *Neurospora* stock cultures with anhydrous silica gel. *Can. J. Microbiol.*, 8: 591–594.
- Ryan, M.J., and Smith, D., 2007. Cryopreservation and freeze-drying of fungi employing centrifugal and shelf freeze-drying. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, 3: 127–140.

- Ryan, M.J., and Day, J.G., 2001. The UK National Culture Collection (UKNCC) biological resource: properties, maintenance and management. D. Smith (Ed.). United Kingdom national culture collection.
- Ryan, M.J., Jeffries, P., Bridge, P.D., and Smith, D., 2001. Developing cryopreservation protocols to secure fungal gene function. *CryoLetters*, 22(2): 115–124.
- Ryan, M.J., Smith, D., and Jeffries, P., 2000. A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(2): 183–186.
- Santos, M.J.S., Trufem, S.F.B and De Oliveira, P.C., 2000. Viability and morphological stability of *Absidia* strains during long-term maintenance under mineral oil. *J. Basic Microbiol.*, 40 (2):133–136.
- Sari, D.C.A.F., Oetari, A., and Sjamsuridzal, W., 2017. Viability of *Metarhizium majus* UICC 295 after Preservation by Freezing at -80°C. Proceedings of the 3rd International Symposium on Current Progress in Mathematics and Sciences (ISCPMS2017) AIP Conf. Proc. 2023, 020168–1–020168–4; <https://doi.org/10.1063/1.5064165>.
- Sherf, A.F., 1943. A method for maintaining *Phytophthora sepedonica* in culture for long periods without transfer. *Phytopathol.*, 33: 330–332.
- Simpfendorfer, S., Harden, T.J., Murray, G.M., 1996. Viability and pathogenicity of *Phytophthora clandestina* after storage in water and liquid nitrogen. *Australasian Plant Pathol.*, 25: 234–239.
- Smith, D. and Onions, A.H.S., 1994. The preservation and maintenance of living fungi, 2nd edn. CAB International, Wallingford, p.122.
- Smith, D., 1983. Cryoprotectants and the cryopreservation of fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 80(2): 360–363.
- Smith, D., 1993 Long-term preservation of test strains (fungus). *Int. Biodet. Biodeg.*, 31: 227–230.
- Smith, D., and Ryan, M., 2012. Implementing best practices and validation of cryopreservation techniques for microorganisms. *The Scientific World Journal*, 2012.

- Smith, D., and Ryan, M.J., 2004. Current status of fungal collections and their role in biotechnology. Handbook of Fungal Biotechnology. Marcel Dekker Published, 271.
- Smith, D., and Ryan, M.J., 2008. The impact of OECD best practice on the validation of cryopreservation techniques for microorganisms. *CryoLetters*, 29(1): 63–72.
- Smith, D., and Thomas, V.E., 1997. Cryogenic light microscopy and the development of cooling protocols for the cryopreservation of filamentous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(1): 49–57.
- Smith, D., 2012. Cap 4 Culture Collections. *Adv. Appl. Microbiol.* 7: 73–118.
- Smith, D., Onions, A.H.S., 1994. The preservation and maintenance of living fungi, 2nd edn. CAB International, Wallingford, p.122.
- Sneh, B., Burpee, L., Ogoshi, A., 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. *American Phytopathological Society*, St. Paul.
- Stubbs, R.W. , 1988. Pathogenicity analysis of yellow (Stripe) rust of wheat and its significance in a global context. Chapter 3. In *Breeding Strategies for Resistance to the Rusts of Wheat*. El Batan, Mexico (Mexico). 29 Jun-1 Jul 1987.
- Thach, T., Ali, S., Justesen, A.F., Rodriguez-Algabal, J.and Hovmøller, M.S., 2015. Recovery and virulence phenotyping of the historic ‘Stubbs collection’ of the yellow rust fungus *Puccinia striiformis* from wheat. *Ann. Appl. Biol.*, 167,314–326. doi:10.1111/aab.12227.
- Webb, K. M., et al., 2018. Frozen fungi: cryogenic storage is an effective method to store *Fusarium* cultures for the long-term. *Annals of Applied Biology*, 173(2): 133–140.
- Webb, K.M., Hill, A.L., Laufman, J., Hanson, L.E., and Panella, L., 2011. Long-term preservation of a collection of *Rhizoctonia solani* using cryogenic storage. *Annals of Applied Biology*, 158(3): 297–304.
- Wiest, A., Schnittker, R., Plamann, M., and McCluskey, K., 2012. Best practices for fungal germplasm repositories and perspectives on their implementation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93: 975–982.

Wu, L.H. et al., 2013. "Global catalogue of microorganisms (gcm): a comprehensive database and information retrieval, analysis, and visualization system for microbial resources." *Bmc Genomics* 14.