

SENTETİK TOHUM VE BAĞCILIKTA KULLANIMI

Zeki KARA¹, Kevser YAZAR², Osman DOĞAN³, Sabit YAZICI^{4*}

¹Prof. Dr., Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Konya; ORCID: 0000-0003-1096-8288

²Dr. Öğr. Üyesi, Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Konya; ORCID: 0000-0002-0390-0341

³Dr., Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Konya; ORCID: 0000-0002-3264-5925

⁴Ziraat Müh., Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Konya; ORCID: 0000-0001-8895-3161

ÖZ

Dünyada en önemli kültür bitkilerinden birisi olan asma (*Vitis vinifera* L.) pratikte vejetatif çoğaltılır. Tohumla çoğaltma, sadece ıslah programlarında kullanılır. Hidratlı sentetik tohumlar, somatik dokuların yapay besin ortamı içine yerleştirilmesiyle üretilir ve çoğaltma için bir alternatiftir. Sentetik tohum, tohumla çoğaltmanın pratik olmadığı bitkilerin çoğaltılması, büyük ölçekli klonal çoğaltma, genetik kaynakların muhafazası ve taşınmasında avantajlara sahiptir. Sentetik tohum üretiminde, propagüller olarak somatik embriyolar, aksiller tomurcuk taşıyan boğum çelikleri ve sürgün uçları kullanılabilir. Üretilen sentetik tohumun yapısı, geleneksel tohumun yapısını taklit eder. Hem geleneksel tohumdaki zigotik embriyoyu taklit eden eksplant materyali hem de endospermi taklit eden kapsülden (jel etkeni ve besin maddeleri, büyüme düzenleyiciler, antipatojenler, biyolojik kontrolörler ve biyolojik gübreler gibi ek materyaller) oluşur. Bu teknik, klonal çoğaltma için bitkinin hücrel totipotensini kullanır, üretilen sentetik tohumlar önemli bir depolama sürecinden sonra bile çoğalma yeteneklerini koruyabilir. Bu çalışmada, bağcılıkta sentetik tohum teknolojisiyle ilgili literatür değerlendirilmiştir. Sentetik tohum metodolojisinin ülkemiz pratikleri için geliştirilme gereksinimleri vardır. Aynı zamanda bağcılıkta ülkemiz asma genetik kaynaklarının uzun vadeli muhafazası, ıslah edilen, patojenlerden arındırılan, elit asma materyallerinden üreticiler için çoğaltma materyali üretimi, asma anacı ve aşı kalemi gereksiniminin kısa sürelerde karşılanabilmesi, bağcılık sektörünün rekabet avantajının sürdürülebilirliği için fırsatlar sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Bağcılık, eksplant, kapsüllenmiş mikropropagüller, çoğaltma, germplazm muhafazası

SYNTHETIC SEED AND USAGE IN VITICULTURE

ABSTRACT

Vine (*Vitis vinifera* L.), one of the most important cultivated plants in the world, is practically propagated vegetatively. Propagation by seed is used only in breeding programs. Hydrated synthetic seeds are produced by placing somatic tissues in artificial nutrient media and are an alternative for propagation. Synthetic seed has advantages in propagation of plants where seed propagation is impractical, large-scale clonal propagation, conservation, and transport of genetic resources. In the production of synthetic seeds, somatic embryos, axillary bud-bearing knuckle cuttings and shoot tips can be used as propagules. The structure of the synthetic seed produced mimics the structure of the traditional seed. It consists of both explant materials that mimics the zygotic embryo in the conventional seed and a capsule that mimics the endosperm (gel agent and additional materials such as nutrients, growth regulators, antipathogens, biological controllers, and biological fertilizers). This technique uses the cellular totipotency of the plant for clonal propagation, the synthetic seeds produced can retain their ability to multiply even after a significant storage period. In this study, the literature on synthetic seed technology in viticulture was evaluated. Synthetic seed methodology has needs to be developed for our country's practices. At the same time, the long-term preservation of our country's grapevine genetic resources in viticulture, the production of propagation material for producers from improved, pathogen-free elite vine materials, the availability of vine rootstock and cuttings demand in a short time provide opportunities for the sustainability of the competitive advantage of the viticulture sector.

Keywords: Viticulture, explant, encapsulated micro propagules, propagation, germplasm preservation

GİRİŞ

Üzüm (*Vitis vinifera* L.), bütün dünyada sofralık, kurutmalık, şıralık ve şaraplık gibi kullanım alanlarıyla ekonomik ve kültürel açıdan en önemli ürünler arasındadır. FAO verilerine göre 2020 yılında dünya çapında 6.95 milyon hektarlık bağ alanında

78.03 milyon ton üzüm üretilmiştir [1, 2]. Bağcılığın günümüzdeki en önemli ihtiyaçlarından birisi de kolay yolla virüsten arı çoğaltılmasıdır [3]. Asma pratikte esas olarak çeliklerle olmakla birlikte daldırma, aşı, doku kültürü ve tohumla da çoğaltılabilir. Asma tohumlarından üretilen bitkiler ebeveynlerinden farklılık gösterir bu nedenle pratikte

*Sorumlu yazar / Corresponding author:

tohumla çoğaltılmaz. İslah programlarında kullanılan tohum, döllenmiş zigotik embriyodan oluştuğundan anne ve babadan gelen genleri içerir. Embriyo, polenden gelen sperm hücresi ile yumurta hücresinin döllenmesi sonucu oluşan 2n kromozumlu zigotun ardışık bölünmesiyle oluşur. Günümüz teknolojisinde somatik dokulardan da tohum üretmek mümkündür. Yapay bir besin ortamı içinde bulunan bu yapıya sentetik tohum denir [4].

İlk somatik embriyogenezi, Steward vd. [5], 1958 yılında havuç somatik dokularından üretmiştir. Zigotik embriyolar yüksek totipotensi özellikleri nedeniyle önemli bir eksplant kaynağıdır. Kallus dokusundan ve vejetatif dokulardan gelişen embriyolara somatik embriyo denir. Günümüzde gelişen tekniklerle *in vitro* şartlarda bitki büyüme düzenleyicilerinin desteğiyle bir bitkinin herhangi bir doku veya organındaki somatik hücrelerinden, doğrudan veya kallus yoluyla embriyo elde edilebilir. Somatik embriyoların zigotik embriyolardan önemli farklarından biri, elde edilen bitkilerin genetik klon oluşturmalarıdır. Çünkü zigotik embriyodan elde edilen bitkiler döllenme nedeniyle açılım gösterirler. Somatik embriyoların en büyük eksiği ise zigotik embriyonun sahip olduğu besin dokusundan yoksun olmasıdır. Bu eksikliği gidermek için somatik embriyolar yapay bir besin ortamıyla kaplanarak sentetik tohumlar oluşturulur. Sentetik tohumun yapısı, geleneksel tohumda bulunan zigotik embriyoya benzeyen eksplant materyali ve endospermi taklit eden kapsülden (jel etkeni ve besin maddeleri, büyüme düzenleyiciler, anti-patojenler, biyolojik kontrolörler ve biyolojik gübreler gibi ek materyaller) oluşur [6].

Sentetik tohumlardan bitki elde edilmesi, ilk kez *in vitro* doku kültürü ortamında elde edilen somatik embriyodan suyun uzaklaştırılmasıyla sağlanmıştır. Somatik embriyoların kaplanması sodyum aljinat veya aljinik asit ortamları yaygın kullanılır. Stewards vd. [5] ve Reinert [7] havuçta somatik embriyolar ve somatik embriyogenez prosedürünü geliştirmişlerdir. Sentetik tohum fikrini ilk kez Murashige [8] önermiştir. Araştırmacı, büyük ölçekli çoğaltmada sınırlayıcı faktör olduğunu düşündüğü somatik embriyoların gelişimsel fizyolojisine odaklanarak bu klonlama yönteminin günde birkaç milyon bitki çoğaltabilecek kadar hızlı olabileceğini ve tohumla çoğaltma yöntemiyle ekonomik yönden rekabet edebileceğini öne sürmüştür [8]. Sentetik tohum teknolojisi, canlı tohum üretemeyen bitkilerde, çekirdeksiz meyve oluşturan bitkilerde, tohumla çoğaltılamayan bitkilerde, dormansi dönemi uzun süren bitkilerde, tohumların muhafaza ve kriyoprezervasyonu, gen bankaları arası transferleri mümkün kılmaları ve *in vitro* kolay, hızlı ve düşük

maliyetle üretim gibi nedenlerle öne çıkan bir yöntemdir [6, 9, 10, 11].

Sentetik tohumlar ender bulunan ve nesli tehlike altındaki bitkiler için bir umut olduğu gibi klonal ve virüsten ari çoğaltılacak bitkiler için de önemli bir seçenektir. Pratikte asmada kullanılmayan tohumla çoğaltmaya farklı bir alternatif sunar. Sentetik tohumlar, sürgün tomurcukları, aksiller tomurcuklar, somatik embriyolar, sürgün uçları, hücre yığınları gibi kapsüllenmiş bitki dokularından üretilebilir, *In vitro* veya *ex vitro* koşullarda soğuk depolamadan sonra da canlılıklarını koruyabilirler [12, 13]. Başlangıçta sentetik tohumlar somatik embriyonun kapsüllenmesiyle üretilirken son yıllarda, aksiller tomurcuk içeren boğumlar, apikal sürgün tomurcukları ve sürgün çelikleri gibi çeşitli *in vitro* türevli propagüllerin kapsüllenmesiyle üretilir [14, 15, 16]. Son yıllarda özellikle tohum canlılığı düşük olan bitkilerde, çekirdeksiz meyvelerde ve düşük çimlenme oranlarına sahip bitkilerde, ayrıca mikorizal mantar simbiyozuna bağımlı bitkilerde çoğaltma için sentetik tohum teknolojisine büyük ilgi vardır [17, 18]. Ayrıca sentetik tohum teknolojisi arzu edilen genotiplerle kısır kararsız genotiplerin seleksiyonunda, elit gen kaynaklarının korunmasında ve nesli tükenmekte olan, ender ve ticari açıdan önemli bitkilerin *in vitro* çoğaltılmasında faydalı olabilir [15, 17, 19]. Sentetik tohumdan elde edilen fidelerin kaynak bitkinin gerçek klonları olması ve yıllar boyunca çok büyük miktarlarda üretilebilmesi gibi avantajları vardır [20]. Sentetik tohum teknolojisinde kullanılan kapsülleme tekniği, kolay kullanım, kısa ve uzun vadeli muhafaza kapasitesi, genetik tekdüzelik ve düşük maliyetli kaliteli bitki materyalleri sağlar [9, 10]. Sentetik tohum bağcılıkta Sultani Çekirdeksiz ve Perlette gibi stenospemokarpik çeşitlerde alternatif bir çoğaltım ve muhafaza tekniği sunar [21].

Bu çalışmada, bağcılıkta sentetik tohum teknolojisiyle ilgili literatür değerlendirilerek metodolojinin ülkemiz bağcılık pratikleri için geliştirilme alanları değerlendirilmiştir.

SENTETİK TOHUM ÜRETİM TEKNİĞİ

Sentetik tohumlar, işlevi itibarıyla botanik tohumlara alternatif olarak *in vitro* üretilen, tarımsal iyileştirmeler için umut verici biyoteknolojik araçlarından biri olarak görülür [22]. Sentetik tohum teknolojisinde yapay tohumu oluşturmak için kullanılan birkaç materyal seçeneği vardır. Bunlar somatik embriyolar, boğum segmentleri, sürgün uçları, kallus ve protokorm benzeri yapılar olarak sıralanabilir. Bu teknoloji sayesinde sentetik tohum üretiminde kullanılan vejetatif yapılar sera ve arazi

koşullarında ticari ekim için kullanılabilir hale getirilir [23]. Sentetik tohumlar günümüzde yoğun ilgi alanıdır [24]. Sentetik tohum teknolojisinde kullanılan yapılardan biri olan somatik embriyolar hem sürgün hem de kök kutuplarını içeren çift kutuplu yapılardır. Bipolar yapıları nedeniyle, somatik embriyolar sentetik tohum üretimi için en uygun materyal olarak varsayılır [25, 26]. Ancak, embriyonik kutbun yetersiz ve eş zamansız olgunlaşması, sorunlara neden olabilmektedir [27, 28]. Bunun üstesinden gelmek için besinler, büyüme düzenleyicileri, herbisitler, anti-patojenler, biyogübreler ve biyo-kontrolörler gibi bileşikler önerilmiştir [27, 29]. %2.5 sodyum aljinat ile kapsüllenmiş, Gupta ve Durzan bazal ortamında çözülmüş *Pinus patula* somatik embriyolarında %89'luk bir çimlenme oranı sağlanmıştır [30].

Sentetik tohum teknolojisi, küçük tohum boyutu, azaltılmış endosperm veya tohumun heterozigotluğu nedeniyle tohumla çoğaltılması pratik olmayan bitki türlerinin çoğaltılmasında yeni yollar açmıştır. Çoğaltmak için vejetatif teknikler gerektiren çekirdeksiz bitkiler veya çimlenme için mikorizal mantar birlikteliği gerektiren tohumlar, sentetik tohumlarla kolayca çoğaltılabilir [31]. İki ebeveynin eşeysel üreme kombinasyonundan oluşan zigotik bir embriyo içeren doğal bir tohumdan farklı olarak, sentetik tohum tek bir ebeveynin somatik hücre veya dokusundan oluşturulan somatik embriyodan üretilir. Bu nedenle bu teknik, tohum üretmeyen bitkilerde, elit özelliklere sahip bitkilerin ve poliploidlerin çoğaltılmasında kullanılabilir [32].

Aksiller tomurcuk bulduran boğum segmentleri (mikro çelikler), sentetik tohum üretimi için kullanılan en yaygın propagüllerdir. Bu durum genel olarak mikro çoğaltma sistemi oluşturulduktan sonra boğum eksplantlarının üretilme kolaylığından kaynaklanır [33, 34]. Boğum segmentlerinin yanı sıra sürgün uçları da sentetik tohum teknolojisinde yaygın olarak kullanılır. Hung ve Trueman [35], boğum segmentleri ve sürgün uçlarını kullanarak *Corymbia torelliana* × *C.citriodora*'dan sentetik tohum üretmişlerdir. Tam ve yarı güçlü MS ortamını kullanarak sırasıyla boğum segmentlerinden yaklaşık %76-100 ve kapsüllenmiş sürgün uçlarından %78-100 rejenerasyon sağlanmıştır [21]. Kallusun farklılaşmamış doğası nedeniyle sentetik tohum üretiminde kullanımı sınırlıdır [17]. *Allium sativum* sürgün ucundan *in vitro* üretilen kallus, kalsiyum klorür ve sodyum aljinatla kapsülленerek büyüme düzenleyici olmayan yarı katı ½ MS ortamında %95'lik bir rejenerasyon sağlanmıştır [36]. Orkideler küçük, endospermik olmayan tohum oluşturdıklarından bunlarda sentetik tohum üretiminde protokorm benzeri yapılar kullanılır. Üç

orkide çeşidinde sentetik tohum üretimini optimize etmek için protokorm benzeri yapıların farklı gelişim aşamaları ve sodyum aljinat (NaAlg), kalsiyum klorür (CaCl₂) ve MS tuzlarının çeşitli kombinasyonları denenmiş, %3 NaAlg ve 75 mM CaCl₂ kullanarak 13-15 günlük kültürden sonra fraksiyonel protokorm benzeri yapılar başarıyla kapsüllenmiştir. *Dendrobium*, *Oncidium* ve *Cattleya* orkide çeşitlerinin sentetik tohumları sırasıyla 75, 60 ve 30 gün 4°C'de muhafaza edildikten sonra %88'den fazla rejenerasyon sağlanmıştır [37].

Somatik embriyogenez, sentetik tohum teknolojisine doğru atılan ilk adımdır. Somatik embriyogenezin ilk başarılı uygulaması, *V.vinifera* Cabernet Sauvignon çeşidinde döllenenmemiş ovüllerle sağlanmıştır [38]. Koruyucu bir tohum kabuğu ve embriyoyu çevreleyen bir besi dokusunun olmaması, somatik embriyoların doğrudan depolanmasını zigotik embriyolara kıyasla zorlaştırır. Ayrıca somatik embriyolar eş zamansız bir gelişim gösterir ve zigotik embriyolar gibi dormansiye girmezler [39]. Bu nedenle sentetik tohum araştırmaları, yalnızca somatik embriyoların indüklenmesini optimize etmeye değil aynı zamanda bunların indüksiyonu [40, 41], gelişimi, olgunlaşması [41], kurutulması [42] ve ek besinlerle regene fide üretimine yönelmiştir [43].

Sentetik tohum teknolojisi, taşıma ve nakliyyede kolaylık, yıl boyunca üretim, işçilik ve maliyetten tasarruf [44], büyüme gücü ve kalitesi yüksek klonal bitkilerin çoğaltılması [45] ve uzun süreli muhafazasında [10, 24] avantajlar sağladığından gelecekte botanik tohumlara önemli bir alternatifi oluşturacaktır [25]. Sentetik tohum teknolojisinin gelişimi ile ilgili bazı çalışmalar Çizelge 1'de sunulmuştur.

Sentetik tohum araştırmalarının birincil amacı, somatik embriyoların depolanma ve işlenmesi için gerekli olan endosperm ve koruyucu kaplamanın geliştirilmesidir [46]. Klonal bitkilerin çoğaltılma ve germplazm korunma ünitesinde kullanılabilmesi için üretilen somatik embriyonun tohum embriyosuna benzetilmesi gerekmektedir. Kapsülleme teknolojisi, sentetik tohum üretiminde önemli bir adım olarak gelişmiştir. Sentetik tohumun yapısı iki kısımdan oluşur. Biri eksplant materyali diğeri ise kapsüldür. Eksplant materyali somatik embriyo, tomurcuk, sürgün veya geleneksel tohumun zigotik embriyosunu taklit eden herhangi bir aktif meristematik doku olabilir [27]. Kapsül, geleneksel tohumdaki endospermin yerini alan besinler, büyüme düzenleyicileri, anti-patojenik kimyasallar, biyo-kontrolörler ve biyo-gübreler gibi ek materyallerle birlikte jelleştiricilerden oluşur [32, 47].

Çizelge 1. Sentetik tohum teknolojisinin farklı yıllarda gelişimi
 Table 1. Development of synthetic seed technology in different years

Yıl Year	Araştırmacılar Researchers	Önemli Aşamalar Important Stages
1977	Murashige [8]	Kapsüllemiş tek somatik embriyo, <i>in vitro</i> veya <i>ex vitro</i> olarak bir bitkicik halinde büyüme için kullanıldı. <i>The encapsulated single somatic embryo was used to grow into a plantlet either in vitro or ex vitro.</i>
1979	Drew [48]	Havuç embriyosu karbonhidrat içermeyen sıvı ortama ekildi. <i>Carrot embryos were seeded in carbohydrate-free liquid medium.</i>
1982	Kitto ve Janick [49]	Havuçtan embriyo, kök ve kallus polietilen glikol (PEG) ile kaplanarak ilk hidratlı sentetik tohum üretildi. <i>The first hydrated synthetic seed was produced from carrots by coating the embryo, root and callus with polyethylene glycol (PEG).</i>
1984	Redenbaugh vd. [50]	Hidrojel kapsülleme tekniği kullanılarak yonca sentetik tohumları geliştirildi. <i>Synthetic seeds of alfalfa were developed using the hydrogel encapsulation technique.</i>
1985	Kitto ve Janick [51]	Kapsüllemede toksik olmayan, suda çözünür polioksietilen kullanıldı. <i>Non-toxic, water-soluble polyoxyethylene was used for encapsulation.</i>
1987	Bapat vd. [14]	<i>Morus indica</i> 'nın çoğaltılmasında sürgün tomurcukları kapsülendi. <i>In reproduction of Morus indica, shoot buds are encapsulated.</i>
1991	Gray vd. [39]	Asma germplazmı muhafazası için sentetik tohum teknolojisi kullanımı önerildi. <i>It has been suggested to use synthetic seed technology for grapevine germplasm conservation.</i>
1993	Janick vd. [52]	Havucun somatik embriyolarının kapsüllemesinde PEG bazlı kaplama karışımı kullanıldı. <i>PEG-based coating mixture was used to encapsulate somatic embryos of carrots.</i>
1995	Pattnaik vd. [53]	Duttan <i>in vitro</i> aksiller vejetatif tomurcuk propagüllerle sentetik tohum üretildi. <i>Synthetic seeds were produced from axillary vegetative bud propagules in mulberry in vitro.</i>
1996	Timbert vd. [54]	Kapsülleme matrisi ve dehidrasyon hızının, kapsüllemiş somatik embriyoların hayatta kalma oranını etkilediği belirlendi. <i>It was determined that the encapsulation matrix and the rate of dehydration affected the survival rate of encapsulated somatic embryos.</i>
2006	Das vd. [55]	Pusa Seedless üzüm çeşidi yaprak eksplantlarından üretilen kotiledon evresindeki somatik embriyolar (5-7 mm uzunluğunda), %2 aljinat jel içinde ayrı ayrı kapsülendi, kapsüllemiş somatik embriyolar B5 makro tuzları ve MS mikro tuzları, %3 sakkaroz ve 2.9 µM gibberellik asit içerisinde %0.7 agar ortamında başarıyla çimlendirildi. <i>Somatic embryos at the cotyledon stage (5-7 mm long) produced from leaf explants of the Pusa Seedless grape variety were individually encapsulated in 2% alginate gel. Encapsulated somatic embryos were successfully germinated on 0.7% agar medium in B5 macro salts and MS micro salts, 3% sucrose and 2.9 µM gibberellin acid.</i>
2007	Antonietta vd. [56], Singh vd. [57]	Kapsüllemiş somatik embriyo ve kapsüllememiş somatik embriyoların muhafaza koşulları karşılaştırıldı. <i>Storage conditions of encapsulated somatic embryos and unencapsulated somatic embryos were compared.</i>

Yıl Year	Araştırmacılar Researchers	Önemli Aşamalar Important Stages
2008	Rai vd. [16]	Farklı konsantrasyonlarda absisik asit ve sakkaroz kullanılarak guavanın (<i>Psidium guajava</i>) somatik embriyolarında pasiflik induksiyonu sağlandı. <i>Passivity induction was achieved in somatic embryos of guava (Psidium guajava) using different concentrations of abscisic acid and sucrose.</i>
2012	Banerjee vd. [58]	<i>Curcuma amada</i> filizlenmiş vejetatif mikro sürgünleri ve <i>in vivo</i> rizom parçalarından, sentetik tohumlar üretildi. <i>Synthetic seeds were produced from the sprouted vegetative micro-shoots of Curcuma amada and parts of the rhizome in vivo.</i>
2016	Benelli [59]	Kober 5BB asma anacı <i>in vitro</i> muhafazası için sürgün uçları ve boğum segmentleri kapsülendi. <i>For in vitro preservation of Kober 5BB grapevine rootstock, shoot tips and node segments were encapsulated.</i>
2019	Carra vd. [1]	Asma (<i>Vitis</i> spp.) gen kaynaklarının <i>ex situ</i> muhafazasında, sentetik tohum teknolojisi değerlendirildi. <i>Synthetic seed technology was evaluated in ex situ conservation of grapevine (Vitis spp.) gene sources.</i>
2021	AlMousa ve Hassan [60]	Enkapsülasyon-dehidrasyon tekniğiyle Black Matrouh üzüm çeşidinin kriyojenik muhafazası için sürgün ucu eksplantları sodyum aljinat içinde kapsülendi. <i>Shoot tip explants were encapsulated in sodium alginate for cryogenic preservation of Black Matrouh grape variety by encapsulation-dehydration technique.</i>

Kapsülleme Tekniği

Kapsülleme, eksplantları üretim, taşıma, depolama ve rejenerasyon sürecinde mekanik hasar ve kurumadan korur. Böylece elit diploit ve poliploid gen kaynaklarının klonlanması, muhafazası ve değişiminde kolaylık sağlar.

Kapsülleme ve kriyojenik prosedürler, minimum alan, işçilik ve geleneksel yöntemlere göre daha az bakım maliyetiyle, genetik istikrarsızlık riski oluşturmadan bitki genetik kaynaklarının uzun süreli muhafazası için güvenilir yöntemlerdir [9, 10, 21].

Sentetik tohum teknolojisi, yabancı tozlanan türlerin hızlı çoğaltılması veya mikro çoğaltılması için önemli bir araçtır. Günümüzde hidratlı ve kurutulmuş olarak sentetik tohum üretilmektedir. Hidratlı sentetik tohumlar, somatik embriyolar ve mikro propagüllerin inatçı ve kurumaya duyarlı olduğu bitki türlerinde üretilir. Kapsülleme, mikro propagüllerin NaAlg çözeltisine karıştırılması ve ardından kalsiyum klorür çözeltisine bırakılmasıyla gerçekleştirilir. Sodyum aljinat mikropropagüle damlatıldığında, yüzey kaplanmaya başlar ve CaCl₂ çözeltisiyle temas ettikten hemen sonra sert yuvarlak boncuklar oluşur. Sıkışmış eksplantları içeren boncuklar, CaCl₂ çözeltisinden alınarak steril suyla 2-3 kez yıkanır. Sentetik tohumun sertliği, polimerizasyon süresinin yanı sıra NaAlg ve CaCl₂ gibi kapsülleme çözeltilerinin yoğunluklarıyla düzenlenir. Genellikle %2 NaAlg ve 100 mM CaCl₂ solüsyonları tatmin edici sonuçlar sağlamıştır. Kuru

sentetik tohumlar, mikro propagüllerin polioksietilen glikol içinde kapsüllenip ardından kurutulmasıyla üretilir. Kuru sentetik tohumlar, mikro propagülleri kurumaya toleranslı olan bitki türleri için uygundur. Kurutma, düşük nemli odalarda bir- iki haftalık bir sürede yavaş veya sıcaklık ve nem kontrollü bir inkübatörde gece boyunca bekletilerek hızlı bir şekilde gerçekleştirilebilir [61].

Kaplama için, modifiye MS ortamında NaAlg (%2.5, 3, 4, 5 m/v) ve CaCl₂ (50, 75, 100 ve 200 mM) kullanılarak *in vitro* kültürlerden alınan aksiller tomurcuklar kullanılmıştır. Kapsül sertliği, bitki türlerinin yanı sıra propagüllere göre değişebilen Na ve Ca iyonlarının optimal iyon değişimiyle belirlenir. Kompleks oluşturma için 20 dakika bekletildikten sonra yapay tohumlar oluşur. 1.5 mg L⁻¹ BA (Benzil Adenin) ve 1.0 mg L⁻¹ IAA (Indol Asetik Asit) içeren MS ortamında kültüre alınan 16 farklı kapsülleme uygulamasında %100 hayatta kalma ve rejenerasyon sağlanmıştır. Gençlik dönemleri uzun ve vejetatif çoğaltılan asma, turuncgiller, mango gibi kültür bitkilerinin çoğaltma materyali üretimi, teorik olarak çelikler yerine sentetik tohumların kullanılmasıyla artırılabilir [16, 18]. Mikro sürgünlerden elde edilen boğum segmentlerin NaAlg ile kapsüllemesiyle üretilen sentetik tohumlardan birden fazla sürgünün uyarılması için en uygun ortam kombinasyonunun 4 mg L⁻¹ BA ve 1 mg L⁻¹ GA₃ (Giberellik Asit) ile desteklenen MS ortamı olmuştur [62]. *Citrus jambhiri* Lush bitkiciklerinde *in vitro* çoğaltılan sürgün uçlarına göre boğum segmentleri sentetik tohum üretimi için daha uygun olup %3 CaCl₂ ve %2.5 NaAlg kullanılarak üretilmiştir. Boncuklanmış sürgün uçları 1 ve 2 mg L⁻¹ BAP (Benzil Amino Purin) ile desteklenmiş MS ortamında kültürlendiğinde maksimum (sırasıyla %96.67 ve %100) rejenerasyon kaydedilmiştir [11].

Sentetik tohumlar genellikle damlatma yöntemiyle kapsülendir. Bu yöntemde somatik embriyolar, Alg-NaAlg, agar-agar, tohum zambkı, guar zambkı veya keçiyoynuzu zambkı içeren hidrojel içine daldırılarak kapsülendir. Aljinat boncuklarda kapsülleme, sentetik tohum üretiminde en yaygın kullanılan tekniktir. Bu teknikte, eksplantlar/somatik embriyolar, %1-5 NaAlg çözeltisine batırılır ve sırayla mikropipet yoluyla, embriyo çevresinde iyonik bağ oluşumu nedeniyle koruyucu bir CaAlg kapsülü oluşturan CaCl₂ çözeltisine aktarılır. Kalıplama yöntemi, somatik embriyoların kapsüllemesinin nispeten basit bir yöntemi olup, mikrotitre plaka kuyucuklarında sıcaklığa bağlı jel (jel rite, agar) ile karıştırılarak gerçekleştirilir. Sıcaklık düşer düşmez embriyo jel ile kaplanır. Kaplanmış boncuklar daha sonra sertleştirme için kalsiyum nitrat [Ca(NO₃)₂] çözeltisine eklenir.

Jelleşmiş embriyolar, sentetik tohumları elde etmek için suyla yıkanır [27].

Boncukların su geçirgenliği, sertliği ve kapsülleme yönteminin başarısı, kullanılan Alg ve CaCl₂ konsantrasyonuna ve kurutma süresine, farklı bitki türlerinin propagüllerine bağlıdır. Bu nedenle, ideal bir boncuk oluşumu için bu iki çözeltinin konsantrasyonları ve boncuk renk oluşumu süresi optimize edilebilir. Tek katmanlı bir boncuk, benzer bir konsantrasyonda NaAlg çözeltisi ile kaplanabilir ve CaCl₂ çözeltisine damlatılabilir. Çift katmanlı sentetik tohumlar, ek koruma ile tek katmanlı sentetik tohumlarla benzer. *Dendranthema × grandiflora* (krizantem) sentetik tohumlarında, MS ortamında hazırlanan ikinci katmanın daha yüksek enfeksiyona yol açarken, su veya mannitolde çözünen CaAlg ile hazırlanan ikinci katman kontaminasyonu önemli ölçüde azaltmıştır [32].

Üzüm çeşitlerinde sentetik tohum için kullanılacak stok materyalden eksplantların alınmasından sonra, kapsülleme hayatı öneme sahiptir [39]. Kapsüllemenin için temel gereksinimler: Eksplantlar, kapsülleyiciler (NaAlg en tercih edilen hidrojel) ve sentetik endospermeldir [63, 64]. Kapsülleme işlemi aseptik koşullarda yapılmalıdır [65]. Bazı çekirdeksiz *Vitis vinifera* çeşitlerinin somatik embriyoları, NaAlg içinde kapsüllemiş, sentetik tohumdan yeniden üretilmiş [63, 64, 65], somatik embriyolar GA içeren yapay bir endospermle kapsülendiğinde daha büyük rejenerasyon sergilerken [66] yapay endosperme tiyofosfat-metil eklenmesi bitkicik dönüşümü ve kök gelişimini artırmıştır [65]. Kapsüllemiş somatik embriyo ve kapsüllememiş somatik embriyoların farklı muhafaza koşullarına tepkileri Antonietta vd. [56] ve Singh vd. [57] tarafından incelenmiştir.

Enkapsülasyon-dehidrasyon tekniği kullanılarak Black Matrouh üzüm çeşidinin kriyojenik muhafazası için sürgün uçları NaAlg ile kapsüllemiş, artan sakkaroz konsantrasyonlu ortamda 4 gün süreyle 5°C'de karanlıkta ön kültüre alınarak, 0, 2, 4, 5 ve 6 saat laminer akış altında kurutulmuş, ardından 1 saat sıvı azota daldırılmıştır. Çözöldükten sonra, bir ay boyunca rejenerasyon ortamında post-kültüre alınmış, sıvı azota daldırılmadan önce kapsüllemiş sürgün ucu eksplantları için optimal dehidrasyon süresi 5-6 saat, nem içeriği %20.31-18.39 ve hayatta kalma %26.67-33.33 aralığında olduğu bildirilmiştir [60].

Sentetik tohum teknolojisi, bir dizi bitki türünün çoğaltılması için çeşitli araştırma ekipleri tarafından umut verici olarak bildirilmesine rağmen, bu teknolojinin pratik uygulaması birkaç nedenden dolayı kısıtlı görülmektedir. Birim kültür başına düşük maliyetle kapsülleme için uygun olan mikro

propagüllerin büyük ölçekli üretimi, verimli bir sentetik tohum üretim protokolü için gereklidir. Bazı bitki türlerinde bu tür yöntemler geliştirilse de mikro çoğaltma protokolü, birçok önemli kültür bitkisinde sentetik tohum teknolojisinin geliştirilmesindeki en büyük sınırlamalardan biridir. Sentetik tohum üretimi için çeşitli bitki türlerinde somatik embriyoların kullanımı yaygın olarak rapor edilmiştir. Ancak çözülmesi gereken bazı büyük sorunlar bulunmaktadır. Somatik embriyoların anormal ve asenkron gelişimi, dormansi ve stres toleransı eksikliğinden kaynaklanan sınırlamalar ve sentetik tohumların düşük sıcaklıkta depolandığında canlılığı ve bitki geri kazanımının azaltılması gibi zorlukları vardır. Somaklonal varyasyon, doku ve hücre kültürü yoluyla ortaya çıkabilen genetik varyasyondur. Sentetik tohum üretimi için mikro embriyojenik olmayan propagüllerin kullanılması, somatik embriyogeneze dirençli farklı bitki türlerinde, umut verici bir vejetatif çoğaltma yöntemi olarak ilgi görmektedir. Ayrıca, steril olmayan koşullarda doğrudan toprağa, vermikülit, kokopit veya kompost gibi ticari saksı ortamlarına ekildiğinde sentetik tohumların sağlıklı bitkiye dönüşümündeki problemler, bu tekniğin pratik kullanımının ana sınırlamalarıdır. İlâveten, sentetik tohumların avantajları ve sentetik tohum üretimine yönelik önemli araştırma girdilerine rağmen, sentetik tohum teknolojisinin ticarileştirilmesine ilişkin en önemli sınırlayıcı faktör, yüksek kaliteli mikropropagüllerin büyük ölçekli üretimidir. Zayıf *ex vitro* çimlenme, mikrobiyal istila ve mikropropagüllerin mekanik hasarı, sentetik tohum teknolojisinin diğer sınırlamalardır. Bu teknolojinin ticari ölçekte kullanım için mükemmelleştirmesine yönelik daha fazla araştırmaya gerek duyulmaktadır [61].

BAĞCILIKTA SENTETİK TOHUMLA GENETİK MUHAFAZA

Kapsülleme ve Kriyoprezervasyon Tekniği

Sentetik tohum üretiminde kapsülleme için sürgün uçları, aksiller tomurcuklar veya boğum segmentleri kullanılabilir, *in vitro* veya *ex vitro* koşullarda ekim için kullanılabilirler [8, 26]. Sentetik tohum teknolojisi, klonal çoğaltmanın avantajlarını tohum çoğaltmanın avantajlarıyla (depolanabilirlik, kolay taşınma, hastalık ve zararlılara karşı koruma) birleştirir. Kapsülleme tekniği olarak enkapsülasyon-dehidrasyon ve enkapsülasyon-vitrifikasyon [67] yöntemleri, kriyoprezervasyon prosedürlerinde kullanılmakta ve bitki germplazmının uzun süreli muhafazası için çok umut verici görülmektedir [68, 69]. Çeşitli türlerde sürgün uçları [70, 71], aksiller tomurcuklar ve boğum segmentleri kapsüllenmiş,

orta vadeli muhafaza için yavaş büyüme depolaması uygulanmıştır [72, 73]. Yavaş büyüme depolamasında, sıcaklık veya ışık yoğunluğunu azaltılır, kültür ortamına mannitol veya sakkaroz gibi ozmotik bileşikler eklenir ve büyüme geciktiriciler kullanılarak gelişme sınırlanır [74]. Bunlardan en yaygın kullanılanları sıcaklık ve ışık yoğunluğunun azaltılmasıdır. Bu iki parametre, hücre metabolizması ve sonuç olarak sürgün büyümesini sınırlar. *In vitro* yavaş büyüme depolamasıyla, alt kültürler arasındaki aralıklar uzatılabilir, böylece stok bitki bakım maliyeti ve alt kültürleme sürecindeki kontaminasyon riski azaltılır [64, 75].

Kober 5BB (*V.berlandieri* × *V.riparia*) asma anacının *in vitro* stok kültürden alınan sürgün uçları ve boğum segmentleri, CaAlg boncuklar içinde kapsülленerek muhafazasına, kapsülleme tekniği ve yavaş büyüme depolamasının etkileri incelenmiştir. 30 dakikalık bir iyon değişim süresi, uygun boncuk oluşturmak için optimal olmuştur. Kapsülленmiş ve kapsülленmemiş eksplantlar, karanlık veya aydınlıkta 4°C'de 9 ay muhafazadan sonra, en yüksek rejenerasyon %83.3 ile karanlıkta muhafaza edilen kapsülленmiş sürgün uçlarından sağlanırken kapsülленmiş boğum segmentlerinden rejenerasyon, aynı depolama koşullarında %55.6 olmuştur. Kapsüllenen eksplantlar depolamadan sonra kapsülленmemiş eksplantlardan daha iyi rejenerasyon sağlamıştır [59].

Vitis genetik kaynaklarının muhafazası ve bunlara kolay erişim, ıslah programları için önemlidir [76]. *Vitis* gen bankası koleksiyonları geleneksel olarak açık arazi gen koleksiyonlarında muhafaza edilir. Arazi bakımı maliyetli ve zaman alıcıdır, geniş arazi gerektirir ve bitkiler abiyotik streslere ve biyotik tehditlere karşı savunmasızdır [68, 77, 78]. *In vitro* kültür yedeklemesi, *Vitis* germplazmının kısa süreli muhafazasına bir alternatif sunar [79, 80], ancak doku kültürünün emek yoğun olması, kültürlerin kontamine olması veya somaklonal varyasyona uğraması nedeniyle bazı sınırlamaları vardır [81-83].

Bitki kriyoprezervasyonu, bitki germplazmının uzun süreli muhafazası amacıyla hücrelerin, dokuların veya organların sıvı azot (-196°C) veya sıvı azot buharı (-165°C ila -190°C) içinde saklanmasıdır [84]. *Vitis* germplazmının dondurularak muhafazası cazip ama zorlayıcıdır. Bugüne kadar, *Vitis* için kapsülleme-dehidrasyon, vitrifikasyon, kapsülleme-vitrifikasyon ve damlacık vitrifikasyonu dâhil olmak üzere çeşitli vitrifikasyon tabanlı yöntemler denenmiştir [68, 85, 86, 87]. Hücrelerin ekstra düşük sıcaklıklara maruz bırakılması donma zararına neden olduğundan sıvı azot içinde kriyodepolamadan önce uygun şekilde işlenmesi ve hazırlanması gerekir [84, 88, 89]. Kriyoprezervasyon ana adımlar (1) *in vitro*

stok kültürlerden alınacak eksplantların dehidrasyonu ve ardından sıvı azotta donmaya karşı toleransının uyarılması, (2) bitki vitrifikasyon solüsyonu (BVS) aracılı prosedürlerde eksplantların dondurularak muhafazası, kapsülleme aracılı prosedürlerde enkapsülasyon ve dondurularak muhafaza, (3) BVS aracılı prosedürlerde eksplantların BVS'ye veya dehidrasyon aracılı prosedürlerde fiziksel kurutulması, (4) kriyodepolama için eksplantların sıvı azota doğrudan daldırılması, (5) dehidrasyon aracılı prosedürlerde yeniden ısıtma veya BVS aracılı prosedürlerde kriyoprotektanları çıkarmak için yeniden ısıtma (6) iyileşme için çözülme sonrası kültür olarak sıralanabilir [85, 86, 87, 90, 91].

Genetik kaynakların uzun süreli muhafazası için, seçilmiş üstün genetik hatları muhafaza edebilen sürgün uçları, tohumlar, embriyolar, hücreler ve kalluslara göre tercih edilir, çünkü bunlar ana bitki genotipindedirler [84, 89]. Somatik embriyojenik dokular, mikro çoğaltma, genetik dönüşüm ve asmada yapay tohum üretimi için büyük potansiyele sahiptir [89, 92, 93]. Bitki gen bankası koleksiyonlarında propagüllerin uzun süre, güvenli bir şekilde koruması için kriyoprezervasyon yöntemleri kullanılmıştır. Kriyoprezervasyon koşullarında canlı propagüller, hücre bölünmeleri ve metabolik süreçleri en aza indirilerek korunur [68, 94]. Yinelenecek açık arazi koleksiyonları oluşturmanın maliyeti ile karşılaştırıldığında dondurularak saklanan yedek koleksiyon oluşturma, maliyet açısından uygundur [95]. Klonal olarak çoğaltılmış genetik kaynakları, sürgün uçları veya uyku halindeki tomurcuklar gibi vejetatif propagülleri koruyan birçok yerleşik kriyobanka olmasına rağmen [91, 96], bildiğimiz kadarıyla, *Vitis* kriyo-depolama, gen bankalarında yaygınlaşmamıştır. Dormant *Vitis* tomurcuklarının dondurularak muhafazasında başarı sınırlı [97] kalırken, sürgün ucu kriyoprezervasyonunda başarılı sonuçlar bildirilmiştir [78, 79, 98]. Bununla birlikte genotipe özgü tepkiler, bu prosedürlerin yaygınlaşmasını sınırlamıştır [68, 78, 99]. *Vitis* kriyoprezervasyon araştırmaları genellikle sınırlı sayıda çeşidin kullanıldığı prosedür geliştirilmesine odaklanmıştır [98]. Şimdiye kadar, damlacık vitrifikasyon tekniği, *Vitis* kriyoprezervasyonunda tür ve genotipe özgü yanıtların üstesinden gelmek için umut vericidir [100, 101]. Damlacık vitrifikasyonu, vitrifikasyona dayalı başarılı kriyoprezervasyon protokolleri için önemli bir gereklilik olan ultra hızlı sürgün ucu soğutma ve ısıtma koşullarını kullanır [83, 102, 103].

Asma poleni dondurularak başarılı bir şekilde muhafaza edilebilmektedir Sürgün uçlarının dondurularak saklanması ilk olarak Ezawa vd. [104], ardından Esensee vd. [97] ve Plessis vd. [105], Plessis

vd. [106] tarafından çalışılmıştır. Birkaç yıl sonra Dussert vd. [107], Dussert vd. [108] somatik embriyojenik hücre süspansiyonlarını dondurularak başarıyla saklamıştır. 1990'ların başında geliştirilen ve numunelerin doğrudan sıvı azota daldırılmasına izin veren ve programlanabilir bir dondurucunun kullanılmasından kaçınan vitrifikasyon tabanlı kriyoteknolojiler [84], asma dâhil olmak üzere bitkilerin dondurularak saklanmasına ilişkin çalışmaları büyük ölçüde hızlandırmıştır. 1990'lardan beri asma gibi bitkiler için en sık kullanılan vitrifikasyon bazlı kriyoprosedürler arasında yer alan kapsülleme-dehidrasyon, vitrifikasyon, kapsülleme-vitrifikasyon ve damlacık-vitrifikasyon dâhil olmak üzere yeni kriyojenik prosedürler tanımlanmıştır [84, 90].

Viral hastalıklar, asma da dahil olmak üzere tarımsal üretimin sürdürülebilir gelişimini uzun süredir tehdit etmektedir [109, 110]. Çoğu meyve türü gibi, üzüm çeşitlerin benzersiz doğasını korumak için vejetatif olarak çoğaltılır, ancak bu onu virüs enfeksiyonuna karşı savunmasız hale getirmektedir. Virüsler, nesiller boyunca çoğaltılan bitki materyallerine bulaşabilir ve birikebilir. Pratikte, patojenden ari bitkilerin kullanımı, virüs hastalıklarını kontrol etmek için etkili bir araç olup basit, verimli tekniklerin geliştirilmesi, sağlıklı bitkilerin çoğaltılması için bir ön koşul olarak kabul edilmektedir. Dondurularak muhafazaya dayalı bir biyoteknoloji olan kriyoterapi, enfekte olmuş bitkileri iyileştirmek için enfekte olmuş materyalin sıvı azotta kısa bir süre için işlenmesi anlamına gelir ve asma virüsleri dahil bitki patojenlerini yok etmek için etkili bir araç olduğu kanıtlanmıştır [85, 97, 104, 105, 106, 108, 111, 112, 116, 117, 118, 119].

Kapsülleme-Dehidrasyon

Wang vd. [120], LN33 melez anacı (Courderc 1613 × *V.vinifera* Thompson Seedless) ve Superior Seedless çeşidinin (*V.vinifera*) sürgün uçlarının dondurularak muhafazası için bir kapsülleme-dehidrasyon protokolü bildirmiştir. Sürgün uçları (1 mm) 4 haftalık *in vitro* stok bitki sürgünlerinden alınmış ve NaAlg solüsyonu (%3 Na-Alg, 2 M gliserol ve 0.4 M sakkaroz) ve bir CaCl₂ solüsyonu (0.1 M CaCl₂, 2 M gliserol ve 0.4 M sakkaroz) kullanılarak boncuklar (4-5 mm çapında) halinde kapsülendirilmiştir. Her biri tek bir sürgün ucu içeren boncuklar, her adım için 1 gün olacak şekilde 4 gün süreyle 0.25, 0.50, 0.75 ve 1.0 M artan sakkaroz konsantrasyonlarıyla adım adım ön kültürlenmiştir. Ön kültürün ardından, kapsülendirilen sürgün uçları, 1 saat sıvı azota doğrudan daldırılmadan önce, LN33 melez anacı ve Superior Seedless çeşidi için sırasıyla %15.6 ve %17.6 su içeriğine kadar laminer bir hava

akımı altında kurutulmuştur. 40°C’lik bir su banyosunda 3 dakika süreyle hızla eritildikten sonra, dondurularak muhafaza edilen sürgün uçları, 1 mg L⁻¹ 6-Benzil adenin (BA) ve 0.1 mg L⁻¹ 1-Naftaline asetik asit (NAA) ile desteklenmiş ½ MS ortamında geri kazanım için kültürlenmiştir. Bu optimize edilmiş parametrelerle, sırasıyla LN33 melez asma anacı ve Superior Seedless üzüm çeşidi için kriyoprezerve edilmiş sürgün uçlarında %60 ve %40 sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır (Çizelge 2).

Kapsülleme-Vitrifikasyon

Matsumoto ve Sakai [121, 122] yaptıkları çalışmalarda, asma kriyoprezervasyonu için bir vitrifikasyon protokolü geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu protokolda, 4-5 aylık *in vitro* stok bitkiciklerden alınan aksiller sürgün uçları, 3 gün süreyle 0.3 M

sakkaroz ile ön kültüre alınmış ve daha sonra 25°C’de 20 dakika süreyle 2 M gliserol ve 0.4 M sakkaroz içeren bir yükleme solüsyonu (LS) ile yüklenmiş, ardından 30 dakika süreyle 0°C’de ½ BVS2’ye ve 50 dakika süreyle 0°C’de BVS2’ye maruz bırakılmıştır. BVS2 [ağırlık (a) hacim (h)⁻¹]: 0.4 M sakkaroz içinde %30 gliserol, %15 DMSO ve %15 etilen glikol içermektedir [123]. Kurutulmuş sürgün uçları, kriyodepolama için doğrudan sıvı azota daldırılmıştır. Dondurularak saklanan sürgün uçları, 40°C’de suda hızla ısıtılmış ve 1 mg L⁻¹ BA ile takviye edilmiş ½ MS rejenerasyon ortamında sürgünlerin yeniden büyümesi için çözündürme sonrası kültüre alınmıştır. Bu kriyoprosedür, elde edilen ortalama %64’lük bir geri kazanımla *Vitis*’in diğer on tür veya çeşidinde uygulanmıştır (Çizelge 2) [86, 121, 122, 123].

Çizelge 2. Asmanın (*Vitis*) dondurularak muhafaza edildiği çalışmalar

Table 2. Studies in which the vine (*Vitis*) was preserved by cryopreservation

Eksplant tipi <i>Explant type</i>	Kriyojenik prosedür <i>Cryogenic procedure</i>	Türlere göre test edilen genotip sayıları <i>Number of genotypes tested by species</i>	Canlanma, canlılık veya çimlenme (%) ^a <i>Revival, vitality or germination (%)^a</i>	Kaynak <i>Source</i>	
Polen <i>Pollen</i>	İki aşamalı soğutma <i>Two-stage cooling</i>	<i>V.vinifera</i> , 21	24.8 (7.4-53.9)	[118]	
		<i>V.vinifera</i> , 5	54.7-77.3	[116]	
		<i>V.vinifera</i> , 2	Belirtilmemiş / <i>Unspecified</i>	[117]	
Sürgün uçları <i>Shoot tips</i>	İki aşamalı soğutma / <i>Two-stage cooling</i>	<i>V.labrusca</i> , 3	96.7 (90-100)	[104]	
		<i>V.vinifera</i> , 1	0	[97]	
	Kurutma (doğrudan sıvı azota daldırılmış) <i>Drying (directly immersed in liquid nitrogen)</i>	<i>V.riparia</i> , 2	Bazıları (belirtilmemiş)-100 <i>Some (Unspecified)</i>	[97]	
		<i>V.amurensis</i> × <i>V.riparia</i> , 1	Bazıları (belirtilmemiş) <i>Some (Unspecified)</i>	[97]	
		<i>V.vinifera</i> , 4	29 (15-40)	[126]	
	Enkapsülasyon-Dehidrasyon + iki aşamalı soğutma <i>Encapsulation-Dehydration + two-stage cooling</i>	<i>V.vinifera</i> , 4	36	[127]	
		Veri mevcut değildir / <i>Data not available</i>	Veri mevcut değildir / <i>Data not available</i>	[105]	
		<i>V.vinifera</i> , 1	30	[106]	
	Enkapsülasyon - Dehidrasyon <i>Encapsulation-Dehydration</i>	<i>V.vinifera</i> , 2	49 (40-58)	[120]	
		<i>V.vinifera</i> , 1	63	[113]	
		<i>V.vinifera</i> , 1	62	[119]	
		<i>V.vinifera</i> , 1	59	[128]	
		<i>V.vinifera</i> , 1	37	[77]	
		<i>V.vinifera</i> , 1	33	[60]	
		<i>V.vinifera</i> , 1	59	[128]	
		<i>V.vinifera</i> , 7; <i>V.labrusca</i> , 1; <i>V.riparia</i> , 1; <i>V.berlandieri</i> × <i>V.rupestris</i> , 2; <i>V.berlandieri</i> × <i>V.riparia</i> , 1	0-9	[129]	
		Enkapsülasyon-Vitrifikasyon <i>Encapsulation-Vitrification</i>	<i>V.berlandieri</i> × <i>V.riparia</i> , 1	Düşük (belirtilmemiş) <i>Low (unspecified)</i>	[124]
			<i>V.vinifera</i> , 7	65.5 (33.3-86.7)	[122]
	Vitrifikasyon <i>Vitrification</i>	<i>V.berlandi</i> × <i>V.riparia</i> , 2	46.7 (30.0-63.3)	[122]	
		<i>V.mourvedre</i> × <i>V.rupestris</i> , 1	75	[122]	
		<i>V.coignea</i> , 1	75	[122]	
		<i>V.vinifera</i> , 1	45	[113]	
		<i>V.vinifera</i> , 1	50	[119]	
		<i>V.vinifera</i> , 1	55	[130]	
		<i>V.berlandieri</i> × <i>V.riparia</i> , 1	0	[99]	
		<i>V.vinifera</i> , 2	43 (40-46)	[79]	
		<i>V.vinifera</i> , 1	57	[131]	
<i>V.vinifera</i> , 1		55	[130]		
<i>V.vinifera</i> , 1		47-55	[130]		
<i>V.vinifera</i> , 3		Belirtilmemiş / <i>Unspecified</i>	[132]		
<i>V.berlandieri</i> × <i>V.riparia</i> , 1		Sürgün rejenerasyonu görülmedi. <i>No shoot regrowth</i>	[99]		
<i>V.berlandieri</i> × <i>V.riparia</i> , 1		Sürgün rejenerasyonu görülmedi. <i>No shoot regrowth</i>	[133]		
<i>V.vinifera</i> , 1	Belirtilmemiş / <i>Unspecified</i>	[131]			

Eksplant tipi <i>Explant type</i>	Kriyojenik prosedür <i>Cryogenic procedure</i>	Türlere göre test edilen genotip sayıları <i>Number of genotypes tested by species</i>	Canlanma, canlılık veya çimlenme (%) ^a <i>Revival, vitality or germination (%)^a</i>	Kaynak <i>Source</i>	
	Damlacık-vitrifikasyon <i>Droplet-vitrification</i>	<i>V.vinifera</i> , 1	70	[134]	
		<i>V.vinifera</i> , 1	45	[135]	
		<i>V.vinifera</i> , 1	50	[77]	
		<i>V.vinifera</i> , 1	30	[136]	
		<i>V.vinifera</i> , 1	46	[137, 138]	
		<i>V.vinifera</i> , 12	Belirtilmemiş / <i>Unspecified</i>	[111, 139]	
		<i>V.vinifera</i> , 9	23.1 (0-70)		
		<i>V.vinifera</i> , 4	34.8 (24-45)	[78]	
		<i>V.riparia</i> × <i>V.rupestris</i> , 1	26	[78]	
		<i>V.vinifera</i> × <i>V.berlandieri</i> , 1	6	[78]	
Sürgün uçları <i>Shoot tips</i>	Damlacık-vitrifikasyon <i>Droplet-vitrification</i>	<i>V.vinifera</i> , 6	50 (40-76)	[86]	
		<i>V.pseudoreticulata</i> , 2	30 (10-50)	[86]	
		<i>V.vinifera</i> , 1	68	[140]	
		<i>V.vinifera</i> , 1	43	[140]	
		<i>V.aestivalis</i> , 1; <i>V.jacquemontii</i> , 1	53-70	[141]	
		<i>V.vinifera</i> , 2; <i>V.berlandieri</i> × <i>V.riparia</i> , 1	43-64	[142]	
		<i>V.champinii</i> × 1613 Couderc, 1; <i>V.berlandieri</i> × <i>V.riparia</i> , 1; <i>V.shampinii</i> , 1	27-47	[143]	
		<i>V.vinifera</i> , 2; <i>V.vinifera</i> × <i>V.labrusca</i> , 1; <i>V.pseudoreticulata</i> , 1	43-59	[144]	
		<i>V.vinifera</i> , 6; <i>V.pseudoreticulata</i> , 2	24-72	[100]	
		<i>V.vinifera</i> , 4; <i>V.riparia</i> × <i>V.rupestris</i> , 1; <i>V.vinifera</i> Chasselas × <i>V.berlandieri</i> , 1	7-45	[78]	
		<i>V.vinifera</i> , 5	13-30	[145]	
		Damlacık-vitrifikasyon <i>Droplet-vitrification</i>	<i>V.vinifera</i> , 1	44	[146]
			<i>V.vinifera</i> , 1	41.6	[146]
			<i>V.vinifera</i> , 2	40-46	[147]
			<i>V.vinifera</i> , 9	0-70	[111]
Embriyogenik hücre süsp. & Somatik embr. doku <i>Embryogenic cell susp. & Somatic Embryonic tissue</i>	İki aşamalı soğutma <i>Two-stage cooling</i>	<i>V.vinifera</i> × <i>V.berlandieri</i> , 1	60	[107]	
		<i>V.vinifera</i> × <i>V.berlandieri</i> , 1	58	[108]	
		<i>V.vinifera</i> , 1	50	[108]	
	Enkapsülasyon - Dehidrasyon+ İki aşamalı soğutma <i>Encapsulation-Dehydration + two-stage cooling</i>	<i>V.berlandieri</i> × <i>V.rupestris</i> , 1	25	[148]	
		<i>V.vinifera</i> , 2	17.5 (5-20)	[148]	
	Enkapsülasyon - Dehidrasyon <i>Encapsulation- Dehydration</i>	<i>V.vinifera</i> , 1	78	[149]	
		<i>V.vinifera</i> , 2	23 (19-27)	[150]	
		<i>V.berlandieri</i> × <i>V.rupestris</i> , 1	78	[148]	
		<i>V.vinifera</i> , 2	51.5 (43-60)	[148]	
		<i>V.berlandieri</i> × <i>V.rupestris</i> , 1	76	[151]	
<i>V.vinifera</i> , 4		61.8 (46-82)	[151]		
<i>V.vinifera</i> × <i>V.berlandieri</i> , 1		42	[151]		
Enkapsülasyon-Vitrifikasyon <i>Encapsulation-Vitrification</i>	<i>V.vinifera</i> , 3	48 (44-52)	[41]		
	<i>V.vinifera</i> , 2	60 (41-79)	[152]		
	<i>V.vinifera</i> , 2	55 (52-58)	[152]		
Somatik embriyolar <i>Somatic embryos</i>	Vitrifikasyon / <i>Vitrification</i>	<i>V.vinifera</i> , 2	60 (41-79)	[152]	
Tohumlar <i>Seeds</i>	Kurutma (doğrudan sıvı azota daldırılmış) <i>Drying (directly immersed in liquid nitrogen)</i>	<i>V.vinifera</i> , 3	60 (50-70)	[147]	

(%)^a: Rakamsal değerler, elde edilen verilerin ortalamaları olarak sunulmuştur.

(%)^a: The numerical values are presented as the averages of the obtained data.

Kober 5BB anacının sürgün uçları, enkapsülasyon-vitrifikasyon ile dondurularak muhafaza edilmiştir [124]. Bu protokolda, *in vitro* stok sürgünler 3 hafta süreyle 4°C soğukta pişkinleştirilmiş stok sürgünlerden alınan sürgün uçları (1-2 mm boyutunda), Wang vd. [120] göre %3 (a h⁻¹) NaAlg içinde kapsüllenmiş, ardından 0°C'de 90 dakika BVS2'ye maruz bırakılmış, kriyodepolamadan sonra, boncuklarda bulunan sürgün uçları 40°C'lik bir su banyosunda eritilerek geri kazanım için çözdürme sonrası kültüre alınmıştır. Dondurulmuş sürgün uçları sürgünlere dönüşebilse

de sürgün yeniden büyüme oranlarının düşük kalmıştır [124]. Yüksek sürgün büyütme oranlarının elde edilmesi için sürgün uçlarının dehidrasyona ve ardından sıvı azotta donmaya karşı toleransının artırılmasının incelenmesi önerilmiştir [59, 120, 124].

Damlacık-Vitrifikasyon

Damlacık protokollerinin avantajlarını vitrifikasyonla birleştiren damlacık-vitrifikasyon, belirli bir türün çeşitli genotiplerine en uygun olduğu ve genellikle kriyo bankalarının kurulması için bir darboğaz olan türler veya genotiplere özel

sınırlamaların üstesinden gelebilmede en umut verici çözüm olarak sunulmuştur [89, 90, 125]. Asma sürgün uçlarının dondurularak muhafaza edilmesine yönelik bir damlacık vitrifikasyon çalışmasında, serada yetiştirilen bitkilerden alınan sürgün uçları, yüzey dezenfeksiyonun ardından sağlık durumlarını belirlemek için *in vitro* karanlıkta 25°C'de 3 gün kültüre alınmıştır [79]. Sürgün uçları 22°C'de 20 dakika süreyle 0.4 M sakkaroz ve 2 M gliserol içeren sıvı azota, ardından 0°C'de 10-15 dakika süreyle ½ BVS2 ve ardından 10-20 dakika tam güçte BVS2'ye maruz bırakılmıştır. BVS2 ile dehidrasyondan sonra, sürgün uçları alüminyum folyo şeritler üzerinde 5 µL BVS2 damlacıklarına aktarılmış ve ardından doğrudan sıvı azota yerleştirilmiştir. Sürgün uçlarını içeren donmuş folyo şeritler, oda sıcaklığında 20 dakika süreyle 1.2 M sakkaroz içeren bir dehidrasyon çözeltisine aktarılarak yeniden ısıtılmış ve sürgünün rejenerasyonu için çözülme sonrası kültürlenmiştir. Bugüne kadar, asmada bir dizi sofralık çeşitlerde, anaçlarda ve yabani asma germplazmına damlacık-vitrifikasyon [77, 78, 86, 111, 136, 138] uygulanmış ve bunlardan 'Baihe 35-1', 'Hunan-1' gibi bazıları asma mantar hastalıklarına dirençli Çin yabani asma germplazmlarıdır (Çizelge 2) [78, 86, 125].

SONUÇ

Sentetik tohum teknolojisinin bitkisel üretim ve özellikle bağcılık sektörü için önemi virüs ve diğer patojenlerden arındırılmış, sağlıklı asma anacı ve üzüm çeşidi materyallerinin, kitlesel çoğaltılması, genetik stokunun oluşturulması, ülkesel ve global asma genetik stokunun uzun süreli sağlıklı bir şekilde korunmasına katkıda bulunabilecek modern bir yaklaşım sunmaktadır. Bu teknik ülkesel asma genetik kaynaklarımızın patojenlerden arındırılmasında da kullanılabilir. Çarpan etkisiyle tüm bitkisel üretimde sağlıklı ve kitlesel çoğaltmaya önemli bir alternatiftir. Sentetik tohum üretiminde kullanılacak asma propagüllerinin seçimi ve seçilen propagüllere uygulanan kapsülleme, dehidrasyon, vitrifikasyon tekniklerine türler ve genotipler düzeyinde tepki farkları nedeniyle daha geniş kabul görecektir. Ayrıca üretilen sentetik tohumların muhafaza ve rejenerasyon süreçlerinin de iyileştirilmesi için uygun protokollerin geliştirilmesi gerekmektedir. Tekniğin endüstriyel düzeyde kullanıma sunulmasıyla farklı bölgelerdeki araştırmacı ve fidan üreticisi kurum ve kişiler arasında asma çoğaltma materyalinin değişimi ve ticareti için de önemli fırsatlar sunmaktadır. Geliştirilmiş prosedürlerin sektör fidan üreticileri düzeyinde kullanıma sunulması, ülkesel düzeyde bağ

alanlarında sağlıklı, elit materyallerden fidan üretimi ve bağ tesislerini mümkün kılacaktır. Bu sayede bağcılık sektöründe verimlilik ve karlılık artırılabilir, üretilecek çoğaltma materyallerimiz ülke sınırları dışındaki pazarlarda da rekabetçi bir üstünlüğe kavuşacaktır.

KAYNAKLAR

1. Ahmad, N., Faisal, M., Fatima, N., Anis, M. 2012. Encapsulation of microcuttings for propagation and short-term preservation in *Ruta graveolens* L.: a plant with high medicinal value. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(6):2303-2310.
2. AlMousa, R.N., Hassan, N.A.F. 2021. Cryopreservation of grape (*Vitis vinifera* L.) using encapsulation-dehydration technique. *J. of Genetic and Environmental Resources Conservation* 9(1):153-156.
3. Alston, J.M., Sambucci, O. 2019. Grapes in the world economy. In: *The grape genome*, Eds: Springer, pp:1-24.
4. Ananthan, R., Mohanraj, R., Narmatha Bai, V. 2018. *In vitro* regeneration, production, and storage of artificial seeds in *Ceropegia barnesii*, an endangered plant. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 54(5):553-563.
5. Anis, M., Ahmad, N. 2016. *Plant tissue culture: propagation, conservation and crop improvement*, Springer.
6. Antonietta, G.M., Ahmad, H.I., Maurizio, M. Alvaro, S. 2007. Preliminary research on conversion of encapsulated somatic embryos of *Citrus reticulata* Blanco, cv. Mandarin Tardivo di Ciaculli, *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 88(1):117-120.
7. Antonietta, G.M., Emanuele, P., Alvaro, S. 1999. Effects of encapsulation on *Citrus reticulata* Blanco somatic embryo conversion. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 55(3):235-238.
8. Ara, H., Jaiswal, U., Jaiswal, V. 2000. Synthetic seed: prospects and limitations. *Current Sci.* 1438-1444.
9. Babaoglu, M., Gurel, E., Ozcan, S. 2001. Bitki biyoteknolojisi, doku kültürü ve uygulamaları. Selçuk Üniversitesi, Konya.
10. Banerjee, S., Singh, S., Pandey, H., Pandey, P. ur Rahman, L. 2012. Conservation and storage of *Curcuma amada* Roxb. *synseeds* on Luffa sponge matrix and RAPD analysis of the converted plantlets. *Industrial Crops and Products*, 36(1):383-388.
11. Bapat, V., Mhatre, M. 2005. Bio encapsulation of somatic embryos in woody plants. In: *Protocol*

- for somatic embryogenesis in woody plants, Eds: Springer, pp:539-552.
12. Bapat, V., Mhatre, M., Rao, P. 1987. Propagation of *Morus indica* L. (mulberry) by encapsulated shoot buds. Plant cell reports, 6(5):393-395.
 13. Bayati, S., Shams-Bakhsh, M., Moini, A. 2011. Elimination of grapevine virus a (GVA) by cryotherapy and electrotherapy. J. Agricultural Sci. and Technology, 13(3):442-450.
 14. Ben-Amar, A., Daldoul, S., Allel, D., Reustle, G., Mliki, A. 2013. Reliable encapsulation-based cryopreservation protocol for safe storage and recovery of grapevine embryogenic cell cultures. Scientia Horticulturae, 157:32-38.
 15. Benelli, C. 2016. Encapsulation of shoot tips and nodal segments for *in vitro* storage of Kober 5BB grapevine rootstock. Horticulturae, 2(3):10.
 16. Benelli, C., De Carlo, A., Engelmann, F. 2013. Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of *Actinidia*, *Diospyros*, *Malus*, *Olea*, *Prunus*, *Pyrus* and *Vitis*, biotechnology advances. 31(2):175-185.
 17. Benelli, C., Lambardi, M., Fabbri, A. 2003. Low Temperature Storage and Cryopreservation of the Grape Rootstock Kober 5bb', Acta Horticulturae, pp:249-254.
 18. Benelli, C., Ozudogru, E., Lambardi, M., Dradi, G. 2012. *In vitro* conservation of ornamental plants by slow growth storage. 7. International Symposium on *in vitro* Culture and Horticultural Breeding 961:89-93.
 19. Benson, E.E., Harding, K. 2012. Cryopreservation of shoot tips and meristems: an overview of contemporary methodologies. Plant Cell Culture Protocols, pp:191-226.
 20. Benson, E.E. 2008. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. Critical Reviews in Plant Sci. 27(3):141-219.
 21. Bettoni, J.C., R. Bonnart, A.N. Shepherd, A.A. Kretschmar, G.M. Volk, 2019. Modifications to a *Vitis* shoot tip cryopreservation procedure: effect of shoot tip size and use of cryoplates, CryoLetters, 40(2):103-112.
 22. Bettoni, J.C., R. Bonnart, AN. Shepherd, A.A. Kretschmar, G. Volk, 2019. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) shoot tips from growth chamber-sourced plants and histological observations, *Vitis*, 58(2):71-78.
 23. Bettoni, J.C., M.D. Costa, J.P.P. Gardin, A.A. Kretschmar, R. Pathirana, 2016. Cryotherapy: a new technique to obtain grapevine plants free of viruses. Revista Brasileira de Fruticultura, 38.
 24. Bettoni, J., R. Bonnart, A. Shepherd, A. Kretschmar, G. Volk, 2018. Successful cryopreservation of *Vitis vinifera* 'Chardonnay' from both *in vitro* and growth chamber source plants. 3. International Symposium on Plant Cryopreservation 1234:211-218.
 25. Bi, W.L., Hao, X.Y., Cui, Z.H., Pathirana, R., Volk, G.M., Wang, Q.C. 2018. Shoot tip cryotherapy for efficient eradication of grapevine leafroll-associated virus-3 from diseased grapevine *in vitro* plants. Annals of Applied Biology, 173(3):261-270.
 26. Bi, W. 2017. Cryopreservation of shoot tips of grapevine (*Vitis* spp.) and cryotherapy for eradication of grapevine leafroll-associated virus 3. PhD. thesis, Northwest A&F University, Yangling, China.
 27. Bi, W.L., Hao, X.Y., Cui, Z.H., Volk, G.M. Wang, Q.C. 2018. Droplet-vitrification cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of grapevine (*Vitis* spp.). *In vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 54(6):590-599.
 28. Bi, W.L., Pan, C., Hao, X.Y., Cui, Z.H., Kher, M.M., Marković, Z., Wang, Q.C. Teixeira da Silva, J.A. 2017. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) a review. *In vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 53(5):449-460.
 29. Carra, A., Carimi, F., Bettoni, J.C., Pathirana, R. 2019. Progress and challenges in the application of synthetic seed technology for *ex situ* germplasm conservation in grapevine (*Vitis* spp.). In: Synthetic Seeds, Eds: Springer, pp:439-467.
 30. Carra, A., Panis, B., Pathirana, R. Carimi, F. 2016. Strategies for conservation of endangered wild grapevine (*Vitis vinifera* L. subsp. *sylvestris* (CC Gmel.) Hegi). 29 International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014): IV 1115:81-86.
 31. Cartes, P., Castellanos, H., Ríos, D., Sáez, K., Spierccolli, S., Sánchez, M. 2009. Encapsulated somatic embryos and zygotic embryos for obtaining artificial seeds of rauli-beech (*Nothofagus alpina* (Poepp.&Endl.) oerst.). Chil J. Agric. Res. 69(1):112-118.
 32. Chandra, K., Pandey, A., Kumar, P. 2018. Synthetic seed future prospects in crop improvement. Int. J. Agr. Innov. Res. 6:120-125.
 33. Cordeiro, S.Z., N.K. Simas, A.B. Henriques, A. Sato, 2014. *In vitro* conservation of *Mandevilla moricandiana* (Apocynaceae): short-term storage and encapsulation-dehydration of nodal segments. *In vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 50(3):326-336.

34. Dal Bosco, D., Sinski, I., Comachio, V., Maia, J., Ritschel, P., Quecini, V. 2014. *In vitro* techniques for grapevine germplasm conservation. 11. International Conference on Grapevine Breeding and Genetics 1082:201-205.
35. Danso, K., Ford-Lloyd, B. 2003. Encapsulation of nodal cuttings and shoot tips for storage and exchange of cassava germplasm. *Plant Cell Reports*, 21(8):718-725.
36. Das, D., Nirala, N., Redoy, M., Sopory, S., Upadhyaya, K. 2006. Encapsulated somatic embryos of grape (*Vitis vinifera* L.): an efficient way for storage and propagation of pathogen-free plant material. *Vitis-Geilweilerhof*, 45(4):179.
37. Dereuddre, J., Blandin, S., Hassen, N. 1991. Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen. 1. Effects of Preculture, *Cryo Letters*.
38. Dohadwala, M.M., Vita, J.A. 2009. Grapes and cardiovascular disease. *The J. of Nutrition*, 139(9):1788S-1793S.
39. Drew, R. 1979. The development of carrot (*Daucus carota* L.) embryoids (derived from cell suspension culture) into plantlets on a sugar-free basal medium. *Horticultural Research*.
40. Dussert, S., Mauro, M., Engelmann, F. 1991. Cryopreservation of grape embryogenic cell suspensions. 1: influence of post-thaw culture conditions and application to different strains. *Cryo-Letters*, 13:15-22.
41. Dussert, S., Mauro, M., Engelmann, F. 1992. Cryopreservation of grape embryogenic cell suspensions 2: influence of post culture conditions and application to different strains. *Cryo-Letters*, 13:15-22.
42. El-Homosany, A., El-Wagab, A., Samaan, M. 2019. Regeneration of some grape rootstock shoot tips after cryopreservation by droplet-vitrification. *Middle East. J. Agric. Res.* 8:1025-1030.
43. Engelmann, F. 1997. *In vitro* conservation methods. In: Callow, J.A., Ford-Lloyd, B.V., Newbury, H.J., eds, *Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use*. Wallingford, UK: CAB International, pp:19-161.
44. Esensee, V., Stushnoff, C., Forsline, P.L. 1990. Cryopreservation of dormant grape (*Vitis* sp.) buds. *HortScience* 25(9):1090e-1090.
45. Ezawa, T., Harada, T., Yakuwa, T. 1989. Studies on freeze-preservation of fruit tree germplasm: 3 Freeze-preservation of grape shoot tips. *J. of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University*, 64(1):51-55.
46. Fabbri, A., T. Ganino, M. Lombardi, R. Nisi, 2007. Crioconservazione di gemme di portinnesto Kober 5BB *V.berlandieri*×*V.riparia*: Aspetti Anatomici, *Italus Hortus*, 3:82-86.
47. Faltus, M., Bilavčík, A. Zámečník, J. 2015. Thermal analysis of grapevine shoot tips during dehydration and vitrification. *Vitis J. of Grapevine Research*, 54:243-245.
48. FAOSTAT, 2022. www.fao.org/faostat/en/#data/qcl (Erişim: 17.03.2022).
49. Ganeshan, S. Alexander, M. 1990. Fertilizing ability of cryopreserved grape (*Vitis vinifera* L.) pollen. *Vitis*, 29(3):145-150.
50. Ganeshan, S. 1985. Cryogenic preservation of grape (*Vitis vinifera* L.) pollen. *Vitis* 24(3):169-173.
51. Ganino, T., Silvanini, A., Beghé, D., Benelli, C., Lambardi, M., Fabbri, A. 2012. Anatomy and osmotic potential of the *Vitis* rootstock shoot tips recalcitrant to cryopreservation. *Biologia Plantarum*, 56(1):78-82.
52. Gantait, S., Kundu, S., Ali, N., Sahu, N.C. 2015. Synthetic seed production of medicinal plants: a review on influence of explants, encapsulation agent and matrix. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(5):1-12.
53. Ghosh, B., Sen, S. 1994. Plant regeneration from alginate encapsulated somatic embryos of *Asparagus cooperi* Baker. *Plant Cell Reports*, 13(7):381-385.
54. Ghosh, B., Haque, S.M. 2019. Synthetic seeds: An alternative approach for clonal propagation to avoiding the heterozygosity problem of natural botanical seeds. In: *Synthetic Seeds*, Eds. Springer, pp:77-112.
55. Gonzalez-Arno, M.T., J. Juárez, C. Ortega, L. Navarro, N. Durán-Vila, 2003. Cryopreservation of ovules and somatic embryos of citrus using the encapsulation dehydration technique. *Cryo Letters* 24(2):85-94.
56. González-Benito, M., Martín, C., Vidal, J. 2009. Cryopreservation of embryogenic cell suspensions of the Spanish grapevine cultivars ‘Albariño’ and ‘Tempranillo’. *Vitis* 48(3):131-136.
57. Gray, D.J., A. Purohit, R. Trigiano, 1991. Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology, *Critical Reviews in Plant Sciences* 10(1):33-61.
58. Grout, B.W. 1990. *In vitro* conservation of germplasm. *Plant Tissue Culture. Application and Limitations*, pp:394-411.
59. Haque, S.M., B. Ghosh, 2014. Somatic Embryogenesis and synthetic seed production a biotechnological approach for true-to-type

- propagation and *in vitro* conservation of an ornamental bulbaceous plant *Drimiopsis kirkii* baker. Applied biochemistry and biotechnology, 172(8):4013-4024.
60. Harada, J.J., R.W. Kwong, M. Belmonte, 2010. Plant embryogenesis (zygotic and somatic). In: eLS.
 61. Hassan, N.A., A.M. Haggag, 2013. Cryopreservation of two Egyptian grapes (*Vitis vinifera*) cultivars using two steps vitrification protocol. World Applied Sci. J. 28(2):254-258.
 62. Hassan, N.A., Gomaa, A.H., Shahin, M.A. El Homosany, A.A. 2013. *In vitro* storage and cryopreservation of some grape varieties. J. of Hort. Sci. & Ornamental Plants 5(3):183-193.
 63. Hegde, V., A. Koundinya, K. Senthilkumar, C. Visalakshi Chandra, H. Vijaya, 2020. Synthetic seeds: An alternative to the clonal propagation, Everyman's Science, 123.
 64. Hung, C.D., Trueman, S.J. 2012. Alginate encapsulation of shoot tips and nodal segments for short-term storage and distribution of the eucalypt *Corymbia torelliana* × *C.citriodora*. Acta Physiologiae Plantarum, 34(1):117-128.
 65. Ikhlaq, M., I.A. Hafiz, M. Micheli, T. Ahmad, N.A. Abbasi, A. Standardi, 2010. *In vitro* storage of synthetic seeds: effect of different storage conditions and intervals on their conversion ability. African J. Biotechnology 9(35).
 66. Janick, J., Y.H. Kim, S. Kitto, Y. Saranga, 1993. Desiccated synthetic seed. Synseeds, pp:11-33.
 67. Jayasankar, S., Gray, D., Litz, R. 1999. High-efficiency somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of grapevine. Plant Cell Reports, 18(7):533-537.
 68. Kaur, R., Sharma, S. Kaur, S. 2019. Synthetic Seeds: Imminent Technology for Plant Propagation, Nueva Delhi: Akinik Publications.
 69. Kaya, E., Souza, F.V.D., 2017. Comparison of two PVS2-based procedures for cryopreservation of commercial sugarcane (*Saccharum* spp.) germplasm and confirmation of genetic stability after cryopreservation using ISSR markers. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 53(4):410-417.
 70. Kaya, E., Alves, A., Rodrigues, L., Jenderek, M., Hernandez-Ellis, M., Ozudogru, A. Ellis, D., 2013. Cryopreservation of Eucalyptus genetic resources, *CryoLetters*, 34(6):608-618.
 71. Kim, M.A., Park, J.K. 2002. High frequency plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) calli immobilized in calcium alginate gel. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 7(4):206-211.
 72. Kitto, S., Janick, J. 1982. Polyox as an artificial seed coat for asexual embryos. *HortScience* pp:488-488.
 73. Kitto, S., Janick, J., 1985. Hardening treatments increase survival of synthetically-coated asexual embryos of carrot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110:283-286.
 74. Kulus, D. Zalewska, M. 2014. *In vitro* plant recovery from alginate encapsulated *Chrysanthemum* × *grandiflorum* Ramat. *Kitam. shoot tips. Propagation of Ornamental Plants* 14(1):3-12.
 75. Kumar, M., Vakeswaran, V., Krishnasamy, V. 2005. Enhancement of synthetic seed conversion to seedlings in hybrid rice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81(1):97-100.
 76. Lambardi, M., Benelli, C., Ozudogru, E.A., Ozden-Tokatli, Y. 2006. Synthetic seed technology in ornamental plants. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, 347-354.
 77. Lazo-Javalera, M.F., Tiznado-Hernández, M.E., Vargas-Arispuro, I., Valenzuela-Soto, E., del Carmen Rocha-Granados, M., Martínez-Montero, M.E., Rivera-Domínguez, M. 2015. Data on antioxidant activity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) following cryopreservation by vitrification, *Data in brief*, 5:549-555.
 78. Magray, M., Wani, K., Chatto, M. 2017. Synthetic seed technology. *J. Cur. Microbiol. Appl. Sci.* 6(11):662-674.
 79. Malabadi, R.B., Staden, J.V. 2005. Storability and germination of sodium alginate encapsulated somatic embryos derived from the vegetative shoot apices of mature *Pinus patula* trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(3):259-265.
 80. Markovic, Z., Chatelet, P., Peyrière, A., Preiner, D., Engelmann-Sylvestre, I., Karoglan-Kontić, J., Engelmann, F. 2013-a. Effect of proline pretreatment on grapevine shoot-tip response to a droplet-vitrification protocol. *American J. of Plant Sciences*, 4:2414-2417.
 81. Marković, Z., Chatelet, P., Preiner, D., Sylvestre, I., Kontić, J.K., Engelmann, F. 2014-a. Effect of shooting medium and source of material on grapevine (*Vitis vinifera* L.) shoot tip recovery after cryopreservation. *CryoLetters*, 35(1):40-47.
 82. Marković, Z., Chatelet, P., Preiner, D., Sylvestre, I., Kontić, J.K., Engelmann, F. 2014. Effect of shooting medium and source of material on grapevine (*Vitis vinifera* L.) shoot tip recovery after cryopreservation. *CryoLetters* 35(1):40-47.
 83. Marković, Z., Chatelet, P., Sylvestre, I., Karoglan Kontić, J., Engelmann, F. 2012. Duration of culture of grapevine (*Vitis vinifera*) microcuttings on medium with zeatin riboside

- affects shoot tip recovery after cryopreservation, Cryopreservation of crop species in Europe, Proceedings of the final meeting, (8-11 Feb. 2011, Agrocampus Ouest INPH, Angers, France), COST Office, Brussels, pp:145-147.
84. Marković, Z., Chatelet, P., Sylvestre, I., Kontić, J.K., Engelmann, F. 2013-b. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) *in vitro* shoot tips. Central European J. of Biology 8(10):993-1000.
 85. Marković, Z., Preiner, D., Bošnjak, A.M., Safner, T., Stupić, D., Andabaka, Ž., Maletić, E., Chatelet, P., Engelmann, F., Kontić, J.K. 2014-b. *In vitro* introduction of healthy and virus-infected genotypes of native Croatian grapevine cultivars. Central European J. of Biology 9(11):1087-1098.
 86. Marković, Z., Preiner, D., Stupić, D., Andabaka, Ž., Šimon, S., Vončina, D., Maletić, E., Kontić, J.K., Chatelet, P., Engelmann, F. 2015. Cryopreservation and cryotherapy of grapevine (*Vitis vinifera* L.). Vitis-J. of Grapevine Research, 54:247-251.
 87. Martinelli, L., Gribaudo, I. 2009. Strategies for effective somatic embryogenesis in grapevine: an appraisal. Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology, pp:461-493.
 88. Mathew, L., McLachlan, A., Jibrán, R., Burritt, D.J., Pathirana, R. 2018. Cold, antioxidant and osmotic pre-treatments maintain the structural integrity of meristematic cells and improve plant regeneration in cryopreserved kiwifruit shoot tips. Protoplasma 255(4):1065-1077.
 89. Matsumoto, T. Sakai, A. 2000. Cryopreservation of *in vitro*-cultured axillary shoot tips of *Vitis* by vitrification. Acta Hort. 538:177-181.
 90. Matsumoto, T., A. Sakai 2003. Cryopreservation of axillary shoot tips of *in vitro*-grown grape (*Vitis*) by a two-step vitrification protocol. Euphytica 131(3):299-304.
 91. McKersie, B., Senaratna, T., Bowley, S., Brown, D., Krochko, J., Bewley, J. 1989. Application of artificial seed technology in the production of hybrid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *In vitro* Cellular and Developmental Biology 25(12):1183-1188.
 92. Miaja, M., Gambino, G., Vallania, R., Gribaudo, I. 2004. Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. somatic embryos by vitrification or encapsulation-dehydration, Acta Horticulturae.
 93. Mullins, M., Srinivasan, C. 1976. Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv. Cabernet-Sauvignon) by apomixis *in vitro*. J. of Experimental Botany 27(5):1022-1030.
 94. Murashige, T. 1977. Plant cell and organ cultures as horticultural practices. Symposium on Tissue Culture for Hort. Purposes 78:17-30.
 95. Naidu, R., Rowhani, A., Fuchs, M., Golino, D. Martelli, G.P. 2014. Grapevine leafroll: A complex viral disease affecting a high-value fruit crop. Plant Disease 98(9):1172-1185.
 96. Naik, S.K., Chand, P.K. 2006. Nutrient-alginate encapsulation of *in vitro* nodal segments of pomegranate (*Punica granatum* L.) for germplasm distribution and exchange. Scientia Horticulturae, 108(3):247-252.
 97. Nower, A.A., Ali, E., Rizkalla, A. 2007. Synthetic seeds of pear (*Pyrus communis* L.) rootstock storage *in vitro*. Aust J. Basic Appl. Sci. 1(3):262-270.
 98. Panis, B., Piette, B. Swennen, R. 2005. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. Plant Science 168(1):45-55.
 99. Parfitt, D.E., Almeheidi, A.A. 1983. Cryogenic storage of grape pollen. American J. of Enology and Viticulture 34(4):227-228.
 100. Parveen, S., Shahzad, A. 2014. Encapsulation of nodal segments of *Cassia angustifolia* Vahl. for short-term storage and germplasm exchange. Acta Physiologiae Plantarum 36(3):635-640.
 101. Pathirana, R., McLachlan, A., Hedderley, D., Carra, A., Carimi, F., Panis, B. 2015. Removal of leafroll viruses from infected grapevine plants by droplet vitrification. 8. International Symposium on *in vitro* Culture and Horticultural Breeding 1083:491-498.
 102. Pathirana, R., McLachlan, A., Hedderley, D., Panis, B. Carimi, F. 2016. Pre-treatment with salicylic acid improves plant regeneration after cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) by droplet vitrification. Acta Physiologiae Plantarum 38(1):1-11.
 103. Pathirana, R., McLachlan, A., Hedderley, D., Panis, B., Carimi, F. 2015. Pre-treatment with salicylic acid improves plant regeneration after cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) by droplet vitrification. Acta Physiologiae Plantarum 38(1):1-11.
 104. Pattnaik, S., Sahoo, Y., Chand, P. 1995. Efficient plant retrieval from alginate-encapsulated vegetative buds of mature mulberry trees. Scientia Horticulturae, 61(3-4):227-239.
 105. Piccioni, E., Standardi, A. 1995. Encapsulation of micropropagated buds of six woody species, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 42(3):221-226.
 106. Plessis, P., Leddet, C. Dereudde, J. 1991. Resistance to dehydration and to freezing in

- liquid nitrogen of alginate-coated shoot-tips of grape vine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay), Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie 3 Sciences de la Vie (France).
107. Plessis, P., Leddet, C., Collas, A. Dereuddre, J. 1993. Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv Chardonnay shoot tips by encapsulation-dehydration: effects of pretreatment, cooling and postculture conditions, Cryo-Letters.
 108. Postman, J., Hummer, K., Stover, E., Krueger, R., Forsline, P., Grauke, L., Zee, F., Ayala-Silva, T., Irish, B. 2006. Fruit and nut genebanks in the US National Plant Germplasm System, HortScience, 41(5):1188-1194.
 109. Qahtan, A.A., Abdel-Salam, E.M., Alatar, A.A., Wang, Q.C., Faisal, M. 2019. An introduction to synthetic seeds: Production, techniques, and applications. In: Synthetic Seeds, Eds: Springer, pp:1-20.
 110. Rai, M.K., Asthana, P., Singh, S.K., Jaiswal, V., Jaiswal, U. 2009. The encapsulation technology in fruit plants a review. Biotechnology Advances 27(6):671-679.
 111. Rai, M.K., Jaiswal, V.S., Jaiswal, U. 2008. Alginate-encapsulation of nodal segments of guava (*Psidium guajava* L.) for germplasm exchange and distribution. The J. of Horticultural Science and Biotechnology 83(5):569-573.
 112. Rai, M.K., Jaiswal, V., Jaiswal, U. 2008. Encapsulation of shoot tips of guava (*Psidium guajava* L.) for short-term storage and germplasm exchange. Sci. Hort. 118(1):33-38.
 113. Redenbaugh, K., Nichol, J., Kossler, M., Paasch, B. 1984. Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production. pp:256-257.
 114. Redenbaugh, K., Nichol, J., Kossler, M., Paasch, B. 1984. Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production. *In vitro* J. of the Tissue Culture Association, pp:256-257.
 115. Reed, B.M. 2008. Plant cryopreservation: a practical guide. Springer.
 116. Reinert, J. 1958. Untersuchungen uber die Morphogenese an Gewebekulturen, Ber Dtsch Bot Ges, 71, 15.
 117. Rihan, H.Z., Kareem, F., El-Mahrouk, M.E., Fuller, M.P. 2017. Artificial seeds (principle, aspects and applications), Agronomy, 7(4):71.
 118. Roy, B. 2013. Synthetic seed: a challenging technology in plant propagation, transportation and conservation, Lambert Academic, Berlin. ISBN-13, 978-3838333427.
 119. Saiprasad, G., Polisetty, R. 2003. Propagation of three orchid genera using encapsulated protocorm-like bodies, *In vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 39(1):42-48.
 120. Sakai, A. Engelmann, F. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. CryoLetters 28(3):151-172.
 121. Sakai, A., Kobayashi, S. Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification, Plant Cell Reports, 9(1):30-33.
 122. Senaratna, T. 1992. Artificial seeds. Biotechnology Advances, 10(3):379-392.
 123. Sharma, P., Roy, B., Roy, M., Sundarrao, G.S. 2021. Synthetic Seed Technology in Horticultural Crops for Conservation and Utilisation of Germplasm.
 124. Sharma, S., Shahzad, A., da Silva, J.A.T. 2013. Synseed technology a complete synthesis, Biotechnology advances. 31(2):186-207.
 125. Shatnawi, M., Anfoka, G., Shibli, R., Al-Mazra'awi, M., Shahrour, W. Arebiat, A. 2011. Clonal propagation and cryogenic storage of virus-free grapevine (*Vitis vinifera* L.) via meristem culture, Turkish J. of Agriculture and Forestry, 35(2):173-184.
 126. Singh, B., Sharma, S., Rani, G., Virk, G., Zaidi, A., Nagpal, A. 2007. *In vitro* response of encapsulated and non-encapsulated somatic embryos of Kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour× *C. deliciosa* Tenora), Plant Biotechnology Reports, 1(2):101-107.
 127. Souza, F.V.D., Kaya, E., de Jesus Vieira, L., de Souza, E.H., de Oliveira Amorim, V.B., Skogerboe, D., Matsumoto, T., Alves, A.A.C., da Silva Ledo, C.A., Jenderek, M.M., 2016. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 124(2):351-360.
 128. Standardi, A., Piccioni, E. 1998. Recent perspectives on synthetic seed technology using nonembryogenic *in vitro*-derived explants, International J. of Plant Sci. 159(6):968-978.
 129. Stewards, F., Mapbs, M. Mears, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. 2. Organization in cultures grown from freely suspended cells, Am. J. Bot, 45:705-708.
 130. Suhasini, S., Hipparagi, K., Pattepur, S., Gollagi, S. Reddy, S.G. 2022. Cryobiotechnological Tool: cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Fantasy Seedless, Int. J. of Agriculture, Environment and Biotechnology, 579.
 131. Teixeira da Silva, J.A., Malabadi, R.B. 2012. Factors affecting somatic embryogenesis in conifers, J. of Forestry Research 23(4):503-515.

132. Timbert, R., J. Barbotin, D. Thomas, 1996. Enhancing carrot somatic embryos survival during slow dehydration, by encapsulation and control of dehydration. *Plant Sci.* 120(2):215-222.
133. Toprak, F.C., Kayhan, F., Alan, A. 2014. *In vitro* propagation and cryopreservation of important grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) and rootstocks. *International J. of Secondary Metabolite* 1(1):75.
134. Towill, L.E., Forsline, P.L., Walters, C., Waddell, J.W., Laufmann, J. 2004. Cryopreservation of *Malus* germplasm using a winter vegetative bud method: results from 1915 accessions. *CryoLetters* 25(5):323-334.
135. Vasanth, K., Vivier, M. 2011. Improved cryopreservation procedure for long term storage of synchronised culture of grapevine. *Biologia Plantarum* 55(2):365-369.
136. Volk, G.M., Shepherd, A.N. Bonnart, R. 2018. Successful cryopreservation of *Vitis* shoot tips: novel pre-treatment combinations applied to nine species. *CryoLetters* 39(5):322-330.
137. Wang, B., Li, J.W., Zhang, Z.B., Wang, R.R., Ma, Y.L., Blystad, D.R., Keller, E.J. Wang, Q.C. 2014-a. Three vitrification based cryopreservation procedures cause different cryo-injuries to potato shoot tips while all maintain genetic integrity in regenerates. *J. of Biotechnology* 184:47-55.
138. Wang, B., Ma, Y., Zhang, Z., Wu, Z., Wu, Y., Wang, Q., Li, M. 2011. Potato viruses in China. *Crop Protection* 30(9):1117-1123.
139. Wang, B., Wang, R.R., Cui, Z.H., Bi, W.L., Li, J.W., Li, B.Q., Ozudogru, E.A., Volk, G.M. Wang, Q.C. 2014-b. Potential applications of cryogenic technologies to plant genetic improvement and pathogen eradication. *Biotechnology Advances* 32(3):583-595.
140. Wang, B., Wang, R.R., Cui, Z.H., Bi, W.L., Li, J.W., Li, B.Q., Ozudogru, E.A., Volk, G.M. Wang, Q.C. 2014. Potential applications of cryogenic technologies to plant genetic improvement and pathogen eradication, *Biotechnology Advances* 32(3):583-595.
141. Wang, M.R., Chen, L., Teixeira da Silva, J.A., Volk, G.M., Wang, Q.C. 2018. Cryobio technology of apple (*Malus* spp.): development, progress and future prospects. *Plant Cell Reports* 37(5):689-709.
142. Wang, Q., Valkonen, J.P., 2009. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends in Plant Science*, 14(3):119-122.
143. Wang, Q., R. Gafny, N. Sahar, I. Sela, M. Mawassi, E. Tanne, A. Perl, 2002. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-dehydration and subsequent plant regeneration. *Plant Science*, 162(4):551-558.
144. Wang, Q., Li, P., Batuman, Ö., Gafny, R. Mawassi, M. 2003-a. Effect of benzyladenine on recovery of cryopreserved shoot tips of grapevine and citrus cultured *in vitro*. *CryoLetters*, 24(5):293-302.
145. Wang, Q., Li, P., Hanania, U., Sahar, N., Mawassi, M., Gafny, R., Sela, I., Tanne, E. Perl, A. 2005. Improvement of agrobacterium-mediated transformation efficiency and transgenic plant regeneration of *Vitis vinifera* L. by optimizing selection regimes and utilizing cryopreserved cell suspensions. *Plant Science* 168(2):565-571.
146. Wang, Q., Mawassi, M., Li, P., Gafny, R., Sela, I. Tanne, E. 2003-b. Elimination of grapevine virus a (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. *Plant Science*, 165(2):321-327.
147. Wang, Q., Mawassi, M., Sahar, N., Li, P., Violeta, C.T., Gafny, R., Sela, I., Tanne, E. Perl, A. 2004. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77(3):267-275.
148. Wang, Q., Panis, B., Engelmann, F., Lambardi, M., Valkonen, J. 2009. Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation, *Annals of Applied Biology*, 154(3):351-363.
149. Wang, Q., Tanne, E., Arav, A. Gafny, R. 2000. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63(1):41-46.
150. Yin, Z., L. Chen, B. Zhao, Y. Zhu, Q. Wang, 2012. Cryopreservation of embryogenic cell suspensions by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. In: *Plant cell culture protocols*. Eds: Springer, pp:81-93.
151. Zhai, Z., Y. Wu, F. Engelmann, R. Chen, Y. Zhao, 2003. Genetic stability assessments of plantlets regenerated from cryopreserved *in vitro* cultured grape and kiwi shoot-tips using RAPD. *CryoLetters* 24(5):315-322.
152. Zhao, C., Y. Wu, F. Engelmann, M. Zhou, 2001. Cryopreservation of axillary buds of grape (*Vitis vinifera*) *in vitro* plantlets. *CryoLetters* 22(5):321-328.