

**BİTKİ GENETİK KAYNAKLARIN KORUNMASINDA
DONDURARAK MUHAFAZA (CRYOPRESERVATION)
TEKNİKLERİ VE UYGULAMALARI**

Tuncer TAŞKIN

**Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü
P.K. 9 35661 Menemen-İzmir/TURKEY**

ÖZ: Sahip olduğumuz bitki genetik kaynakları, çevresel ve diğer baskılarla genetik erozyona uğramakta ve yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kalmaktadır. Özellikle, tarımı yapılan türlere ait bitki genetik kaynaklarındaki çeşitliliğin korunması, bitkisel üretimin sürdürülebilirliği bakımından zorunludur. Türkiye orijinli türler ulusal gen bankasında ve arazi gen bankalarında muhafaza edilmektedir. Tohumlarında çimlenme sorunu olan yada vejetatif olarak muhafaza edilmelerinde zorluklar yaşanan bazı kültür bitkilerinin dondurularak muhafaza edilme imkanlarının araştırılması büyük önem arz etmektedir. Son yıllarda dondurarak muhafaza konusunda yoğun çalışmalar sürdürülmekte ve en son tekniklerle genetik kaynakların korunmasına ve muhafaza altına alınmasına çalışılmaktadır. Bu derlemede, biyolojik materyalin canlı olarak ultra düşük ısılarda uzun süre muhafaza edilmesi olarak tanımlanan kryoprezervasyon tekniği ile ilgili yöntem, teknik ve uygulamalara ilişkin bilgi verilmeye çalışılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Bitki genetik kaynakları, muhafaza, kryoprezervasyon.

**APPLICATIONS OF CRYOPRESERVATION TECHNIQUES
IN CONSERVATION OF PLANT GENETIC RESOURCES**

ABSTRACT: Plant genetic resources of Turkey are exposed to treat and genetic erosion resulting from the environmental factors and other reasons. Therefore, conservation of diversity of cultivated species is necessary for sustainable production. The species originated and found in Turkey are conserved at national gene bank and field gene banks. The cryopreservation is very essential for some cultivated plant species with germination problem or problems for seed conservation in gene banks and under ecological treat at field gene banks. In the last two decades research on cryopreservation techniques are carried out intensively. Many techniques are developed and well applied for the conservation of plant genetic resources. In this article, the long-term conservation of biological material at ultra-low temperatures which is called cryopreservation, is given with methods techniques applications.

Keywords: Plant genetic resources, conservation, cryopreservation.

GİRİŞ

Dünya nüfusunun artışına paralel olarak artan beslenme sorunu, gelecekte insanlığı tehdit edecek en büyük sorunlardan biri olarak görülmektedir. Dünyadaki insanların üçte birlik bir bölümünün beslenmesi pirinç, buğday, mısır ve patates gibi bitkilere bağlıdır ve dolayısıyla bu bitkilerin üretimlerinin artırılması bir

zorunluluktur. Klasik bitki ıslah yöntemleri ile geliştirilen verimli ve kaliteli çeşitlerle insanların beslenme ihtiyaçları karşılanmaktadır ve çalışmalar günümüzde de hızla devam etmektedir. Buna karşılık dünya tarımı değişen çevre koşulları nedeniyle ciddi sorunlarla karşı karşıyadır. Gelecekte değişen çevre koşulları ile bunların bitkilere olan etkilerini önceden kesin olarak bilmek zordur. Kültür bitkileri ilkel formlara ve yabancı akrabalarına oranla daha az genetik çeşitlilik içermektedir. Yabancı türler ise geniş bir genetik tabana sahip oldukları için kültür bitkilerinin gelecekte çıkabilecek sorunlarının giderilmesinde ya da yeni özellikler kazandırılmasında birer gen kaynağı oluşturacaklardır. Yüksek verimli hastalık ve zararlılara dayanıklı kültür bitkisi çeşitlerinin geliştirilebilmesi için ıslah programlarında kullanılacak genetik materyalin [(a) Üretimde olan ya da üretimden kalkmış çeşitler, (b) Yerel çeşitler, (c) Geçiş formları ve (d) Yakın akrabalar ya da yabancı türler] toplanması ve bunların uygun bir şekilde muhafaza edilerek, ihtiyaç duyulduğunda kullanıma hazır halde bulundurulması gerekir.

Ülkemizde 11 bine yakın bitki çeşidi doğal olarak yetişmektedir. Bunlardan 3708 tanesi sadece ülkemiz sınırları içerisinde yayılış göstermektedir (Anonim 2007). Ülkemizin sahip olduğu bu zenginlik; kirlenme, kuraklık, aşırı toplama, insan faktörleri gibi birçok olumsuz etkenlerce tehdit altındadır. Ayrıca genetik kaynaklarımızın kanuni ya da kanun dışı yollarla yurtdışına çıkartılması da bu zenginliğimizin kıymetini bilmediğimizi göstermektedir. Bu nedenle genetik materyalin korunması, kullanımı ve ekonomik değere dönüştürülmesi Türkiye için büyük önem taşımaktadır. Dünya üzerinde birçok bölgede yapılan araştırmalarda primitif varyetelerin hızlı bir şekilde yok olduğu gözlenmiştir. Çeşitli hastalıklar ve zararlılar, çevresel ve insani birçok faktör buna etki etmektedir.

Genetik kaynak materyali olarak muhafaza edilecek olan yabancı ve kültür bitkileri üç ana grupta toplanabilir.

- I- Tohumları düşük ısı ve nem içeren ortamlarda uzun süre saklanan bitkiler. Orthodox tip denilen bu tohumlar – 20 °C veya daha düşük ısılarda ve % 5-7 nem içeren ortamlarda uzun süre saklanabilirler.
- II- Nem miktarları düştüğü zaman canlılıkları azalan dolayısıyla depolanamayan ve kısa ömürlü tohumlara sahip bitkiler. Bu tip tohumlara da Recalsitrant tip tohum adı verilmektedir.
- III- Heterozigot yapıda olan ve tohumla üretilmeleri istenmeyip vejetatif olarak üretilen bitkiler.

Son iki gruba giren bitkilerin, vejetatif formda saklanması zorunludur ve bu materyallerin muhafazası şu şekilde yapılmaktadır:

Arazide (koleksiyon bahçesi) muhafaza,

Seralarda muhafaza,
Aşı kalemi ya da çelik şeklinde,
Polen muhafaza,
Doğada muhafaza (*In situ*),
In vitro şartlarda muhafaza.

Genetik materyalin uzun süre muhafaza edilmesi amacı ile ilgili yoğun araştırmalar sürmektedir. *In vitro* kültür teknikleri de bu araştırmaların sürdüğü bir alandır. *In vitro* tekniklerden yararlanarak meristem, sürgün ucu ve tomurcuk gibi bitkisel genetik materyalin muhafazasında genel olarak iki yol mevcuttur.

- I-Kültürün gelişimini yavaşlatarak muhafaza. Bunun için;
- Bitki materyalinin mineral yağ içinde muhafazası,
 - Düşük basınç ve oksijenli ortamlarda muhafaza,
 - Şekerin besin ortamından çıkartılması,
 - Dehidratasyon (suyun azaltılması),
 - Besin ortamına absisik asit (5-10 mg/l) katılması,
 - Besin ortamına mannitol (% 3-5) katılması,
 - Besin ortamına suksinik asit (50 mg/l) katılması,
 - Düşük sıcaklık ortamında muhafaza.

II- Sıvı azot içerisinde çok düşük sıcaklıklarda dondurarak muhafaza olarak adlandırılan Kryoprezervasyon (Cryopreservation) gibi teknikler uygulanmaktadır (Endress, 1994).

Sıvı Azot İçerisinde Çok Düşük Sıcaklıklarda Dondurarak Muhafaza

Kryoprezervasyon, biyolojik materyalin canlı olarak dondurulup ultra düşük ısılarda (- 196 °C'de sıvı azot içerisinde) uzun süre muhafaza edilmesi olarak tanımlanır. Teorik olarak bu düşük sıcaklıklarda bütün metabolik faaliyetler durur ve genetik yönden bir değişiklik meydana gelmez. 1949 yılında ilk defa gliserolün sperma hücrelerinin dondurulmasında koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Kryoprotektant adı verilen soğuğa karşı koruyucu maddelerin keşfinden sonra canlı organizmaların çok düşük ısılarda muhafaza edilmesi konusunda yoğun araştırmalar başlamıştır. Bitki hücre ve organlarının kryoprezervasyon tekniği ile muhafaza edilmesine, memeli hücrelerinin bu yöntemle muhafaza edilmesi sağlandıktan sonra başlamıştır. Bu yöndeki çalışmalar 1960'lı yıllardan sonra hızlanmıştır. Quatrano 1968' de keten bitkisinde yaptığı çalışmada, hücre kültürlerini dimetil sülf oksid (DMSO) ile muamele ederek - 50 °C'ye kadar dondurarak muhafaza etmeyi başarmıştır. Bu çalışmayı daha sonra diğer araştırmacıların patatest (Grout ve Henshaw, 1980; Towill, 1983; Westcott, ve ark. 1977), havuçta (Withers ve King

1979, 1980), çilekte (Kantha ve ark. 1980; Mullin ve Schlegel, 1976; Sakai ve ark. 1978) ve daha pek çok bitki türünde yaptıkları çalışmalar izlemiştir. Sarımsak bitkisinde apikal meristemler vitrifikasyonla başarılı bir şekilde dondurularak yeniden rejenere edilmiştir (Niwata ve ark. 2000). Yine sarımsakta sürgün uçlarının dondurularak muhafazası ve yeniden bitki rejenerasyonunda vitrifikasyon metodu araştırılmıştır (Kim ve ark. 2004). *Musa* and *Ensete* bitkilerinde uygulanan droplet freezing dondurma yönteminde meristemler başarılı bir şekilde dondurularak rejenere edilmiştir (Panis, ve ark. 2005).

Bitki genetik kaynaklarının kryoprezervasyon tekniği ile muhafazasında bitkisel materyal olarak;

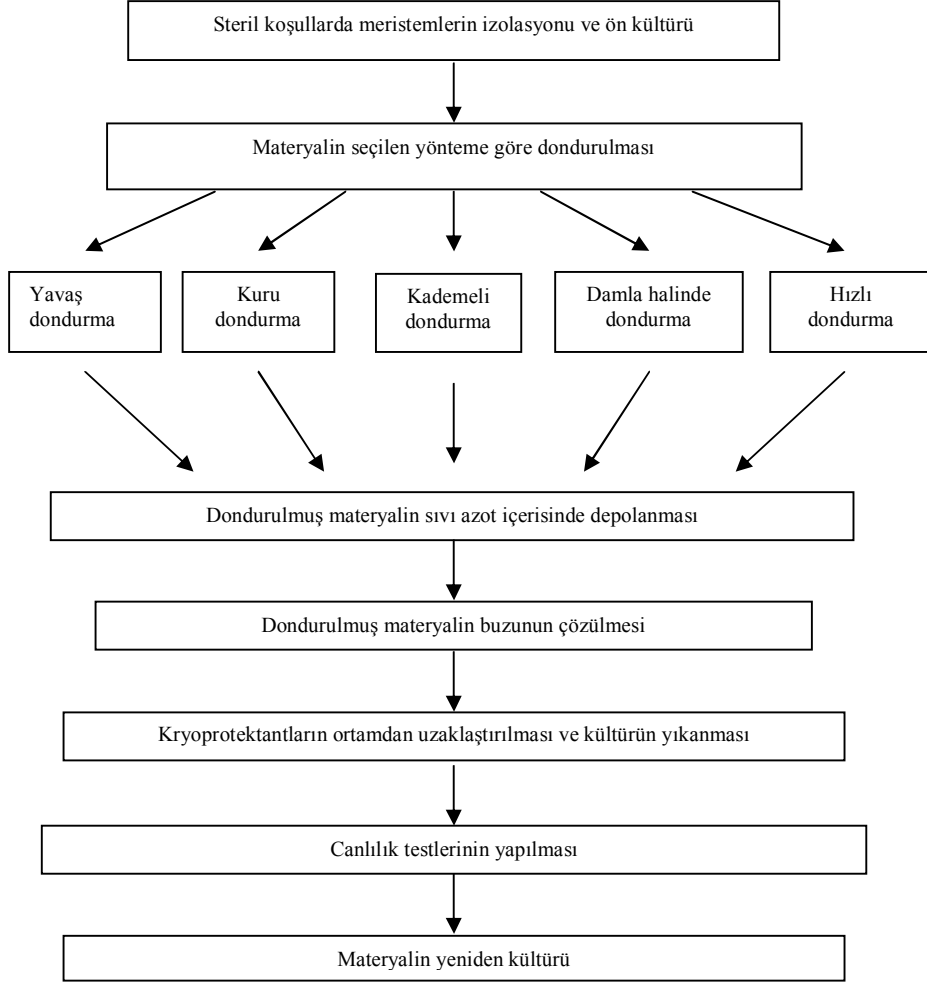
- sürgün uçları ve meristemler
- kültüre alınmış hücreler
- somatik embriyolar
- protoplastlar
- embriyo, endosperm
- polen, anter, ovul, tohum

gibi bitki organ ve organelleri kullanılabilir.

Çizelge 1’de çeşitli eksplantları dondurularak muhafaza edilebilmiş bitki türleri görülmektedir.

Kryoprezervasyon Teknikleri ve Uygulamaları

- Kryoprezervasyon tekniğinde daha önce belirttiğimiz bitki materyalinin muhafazasında uygulanan işlemler aşağı yukarı benzerdir. Hücre ve meristem kültürlerinde genel olarak şu yollar izlenir:



Steril Koşullarda Meristemlerin İzolasyonu ve Ön Kültürü

Meristemler çimlenmiş tohumlardan veya *in vitro* da ya da serada yetişen bitkilerden izole edilir. İzole edilen 0,4-0,5 mm uzunluğundaki meristemler DMSO (dimetil sülfü oksid) içeren sürgün oluşturma ortamlarında kültüre alınır ve uygun şartlarda inkube edilirler. Örneğin çilek sürgünlerinden izole edilen meristemler 1µM BAP, 1µM IBA, 0,1µM GA₃ ve % 5 DMSO içeren MS ortamında 2 gün süre ile kültür edilirler (Kartha, 1984).

Kryoprotektant (soğuktan koruyucu) kimyasallarının uygulanması

Bitkisel materyalin kryoprezervasyon tekniği ile başarılı bir şekilde muhafaza edilebilmesi için hücreleri dondururken ve muhafaza sonunda çözerken hücrelerin don etkisinden zarar görmelerini önleyen kimyasallarla muamele edilmesi gerekir. Bu kimyasallardan bazıları dimetilsülfoksit (DMSO), etilen glikol, dietilen glikol polietilen glikol, propilen glikol, rezkzametilen tetraim, polivinil pirolidon, dimetil asetamid, sorbitol, mannitol ve farklı şekerlerdir (Bajaj ve Reinert 1977; Endress, 1994).

Soğuktan koruyucu olarak kullanılan maddenin şu özelliklerinin olması gerekir:

- Düşük bir molekül ağırlığı,,
- Toksik olmaması,
- Hücrelerden kolaylıkla yıkanabilmesi,
- Hücrelere kolaylıkla nüfuz edebilmesi.

DMSO bu özellikleri içerir ve en sık kullanılan kryoprotektanttır. Genellikle % 5-10 konsantrasyonlarda kullanılır.

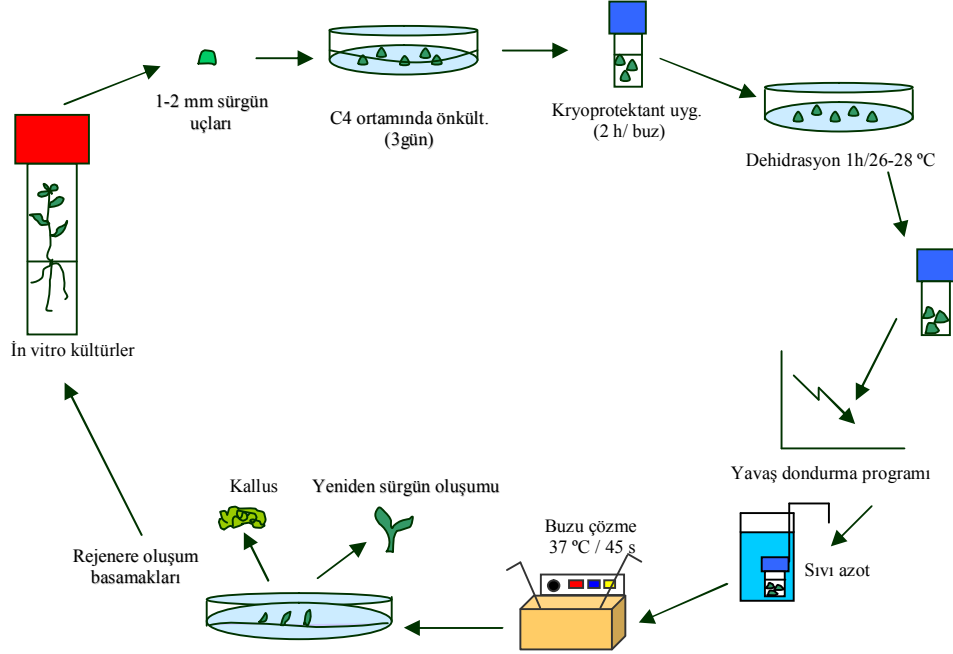
Nag ve Street 1975 yılında soğuktan koruyucu madde olarak *Atropa belladonna*'da (Dulavrat otu) % 5 DMSO ve *Platanus* (Çınar) hücreleri için ise % 10 gliserinin iyi sonuç verdiğini bulmuşlardır. Bazı araştırmacılar ise birden çok maddenin kombinasyonunun etkisini araştırmış ve olumlu sonuç almışlardır. 1971 yılında Latta *Ipomea* hücrelerinde % 2,5 DMSO, % 2,5 gliserin ve % 0,5 sakkaroz kombinasyonunun yalnız % 5 DMSO kullanımına göre canlılık açısından daha olumlu olduğunu saptamışlardır (Hatipoğlu, 1997).

Soğuktan koruyucu maddelerin, buz kristallerinin büyüme derecesini, iriliğini ve miktarını azalttığı, hücre içindeki suyun donma derecesini düşürdüğü ve böylece donmanın erken safhalarında hücre suyunun çıkışını kolaylaştırdığı

(dehidratasyon) ve hücre zarı geçirgenliğini artırdığı kabul edilmektedir (Whitters 1980a, b).

Materyali Dondurma Yöntemleri

Yavaş dondurma (slow freezing): Bu yöntem genellikle hücre süspansiyon, protoplast kültürleri ve meristem kültürleri için kullanılır. Kültürün sıcaklığı yavaş yavaş 0,5-2 °C/dak olacak şekilde 30- 40 °C' ye kadar soğutulur ve sıvı azot içerisine aktarılır. Bu işlemler şöyle yapılır: Canlılık testi yapılan uygun kültürlerden belirli miktar erlen içerisine alınır ve soğuması için buz içeren bir kaba bırakılır. Bu arada iki kat hacimde kryoprotektant solüsyonu hazırlanarak buz içerisine soğutulur. Daha sonra bu solüsyon kültürü içeren erlene aktarılır. Dondurucu solüsyonun tip ve konsantrasyonu bitki türüne göre değişebilir. Kryoprotektantın toksik etki yapmadığını anlamak için bu devrede canlılık testi yapılmalıdır. Koruyucu madde içeren hücre solüsyonu, düşük sıcaklıklara dayanıklı ve kryotüp (Cryotube) olarak adlandırılan özel tüplere aktarılarak belirli bir programa göre soğutulacak cihaza yerleştirilir. Soğutma programı bitki türüne göre değişmekle birlikte 0,5-2 °C/dak da eksi 40-60 °C' ye kadar düşürülür. Bazen soğutma hızı 10 °C/dak.'ya kadar hızlanabilir. Bu ön dondurma işleminde hücre dışı doğru su kaybederek büzülür ve hücre içi buz oluşumu önlenir. Daha sonra kültür sıvı azot içerisine yani -196 °C'ye aktarılır. Muhafaza işlemi sonunda hızlı çözündürme işlemi yapılır. Bu işlem 35-40 °C sıcaklıkta su banyosunda 2-3 dakikada gerçekleştirilir. Buzu çözülen kültür birkaç kez kryoprotektantlardan arındırmak için yıkanıp sıvı ya da katı ortama aktarılır. Bazen kültürler yıkanmaksızın direkt olarak bir filtre kağıdı üzerine alınır ve agar ortamı üzerine transfer edilir. Birkaç saat sonra da bir başka taze ortama aktarılır. Ayrıca canlılık testi uygulanır. Cassava bitkisinde yavaş dondurma ile kryoprezervasyon yöntemi şematik olarak Şekil 1'de görülmektedir.



Şekil 1. Cassava (*Manihot esculenta*) bitkisinde yavaş dondurma ile kryoperezervasyon (Escobar ve ark. 1997'den değiştirilerek).
Figure 1. Cryopreservation through slow freezing on Cassava plant (*Manihot esculenta*).

Kuru dondurma: Bu yöntemde materyal kurutma işlemlerine tabi tutuldukları için tohum gibi düşünülebilir ve tohumların muhafaza yöntemleri uygulanabilir. Yalnız bu yöntem kurutmaya karşı toleranslı türlere uygulanabilir. Uygulamada aşağıdaki yollar izlenir;

- Somatik embriyolar yaklaşık 2-3 mm boyunda ve embriyonik kalluslar uygun gelişme döneminde seçilir. Meristem gelişme için uygun büyüklükte olmalıdır.

- 10 ppm ABA içeren ortamda 2-3 gün ön kültür yapılarak ya da materyal 0,3→0,5→0,7→0,9→1 M sakkaroz içeren ortamların her birinde 2'şer gün bekletilmek suretiyle yüksek osmotik değere sahip ortamlarda ön kültür yapılır.

- Kurutma iki yolla uygulanır:

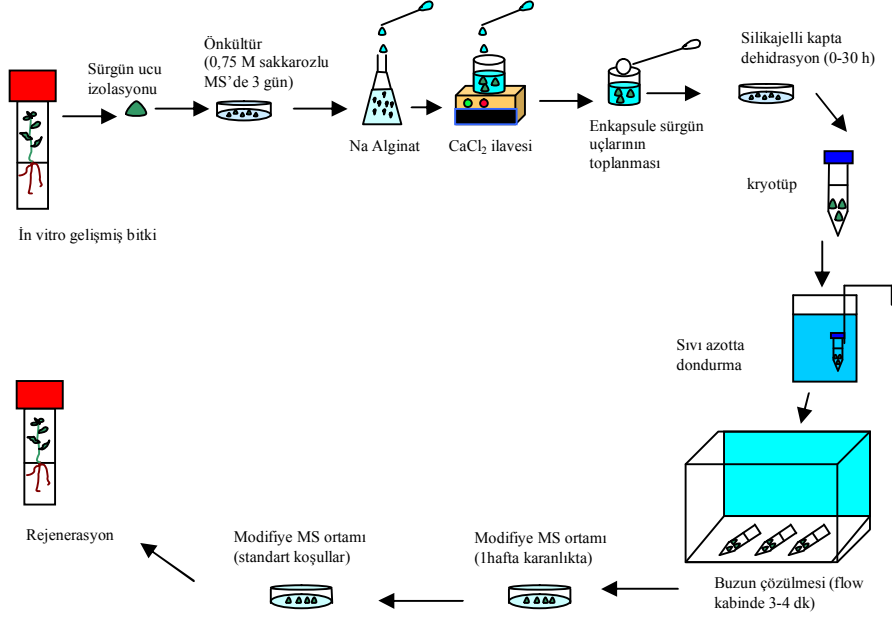
Hızlı kurutma: %3 sakkaroz ve 10 ppm ABA ilave edilmiş yarı katı ortam üzerinde bulunan materyal içinde bulunduğu petri kutusunun kapağı steril kabin içerisinde açılarak birkaç saat kurutmaya bırakılır.

Yavaş kurutma: Materyal filtre kağıdının üzerine çıkarılarak % 3 sakkaroz ve 10 ppm ABA ilave edilmiş 0,5 ml MS sıvı ortamla özel bir kültür kabı içerisine yerleştirilir. Bu kültür kaplarının kapağında geçirgen zarla kaplı iki delik yer alır. Daha sonra bu kap, içerisinde % 37,6-35,6 lık H₂SO₄ çözeltisi bulunan ve % 60-65 nispi nem içeren özel bir kaptan 4-5 gün süreyle bekletilir. Burada H₂SO₄ nem düzeyini dengeli bir şekilde düşürür.

Kurutma işlemleri bittikten sonra somatik embriyo veya embriyonik kallus parçaları ya da meristem içeren nodyumlar enkapsülasyon yöntemi ile yapay tohum haline getirilir. Enkapsülasyondan sonra yüksek osmotikli ortamlarda (0,3→0,5→ 0,7 M sakkaroz) 2'şer gün süreyle karanlıkta ön kültür yapılır. Daha sonra materyal steril kabin içerisinde 0-12 saat sabit nem içeriğine kadar hızla ya da soğuk bir ortamda % 70-80 nispi nemde 2-3 günde kurutulur.

- Uygun nem oranı içeren kurutulmuş materyal kriotüplere transfer edilir.
- Daha sonra kriotüpler sıvı azotun sıvı ya da buhar fazına maruz bırakılarak muhafazaya alınır.
- Çözündürme, tüpler direkt olarak 40 °C sıcaklıktaki suya daldırılarak hızlı ya da 20-25 °C oda sıcaklığında yavaş olarak yapılır.
- Kültürler yeniden kültüre alma işlemine tabi tutularak rejenerasyon işlemleri başlatılır (Emeklier, 2001).

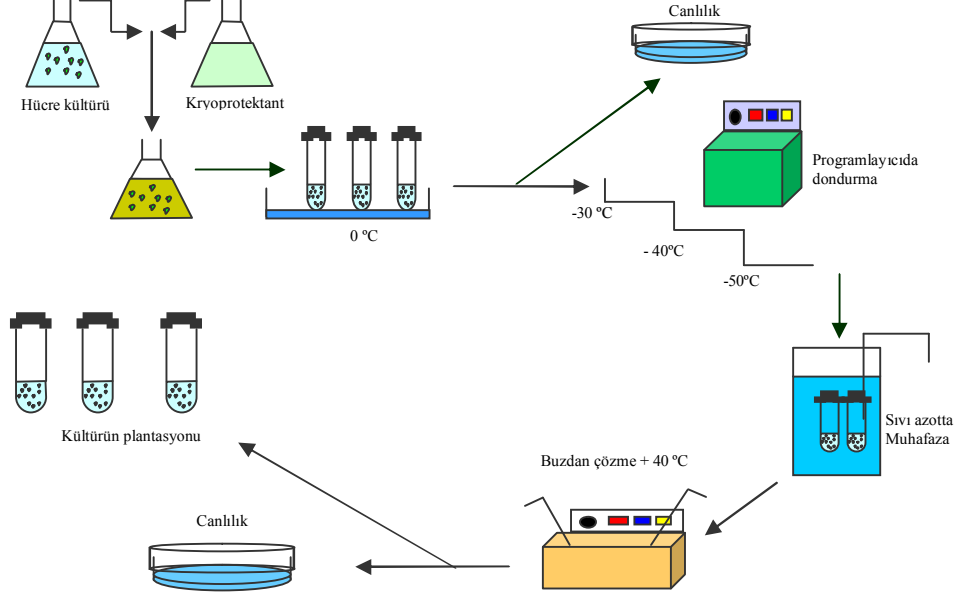
In vitro'da gelişen bitkilerde, kuru dondurma metoduyla sürgün ucu kryoprezervasyonu basamakları Şekil 2'de görülmektedir.



Şekil 2. *In vitro*'da gelişen bitkilerde kuru dondurma metodu ile sürgün ucu kryoprezervasyonu.

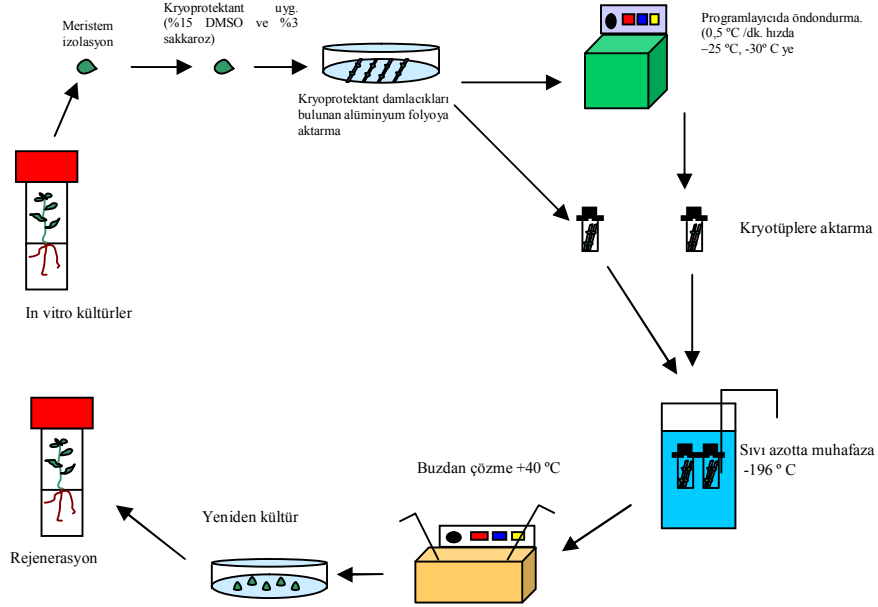
Figure 2. Cryopreservation of shoot apices by dry-freezing.

Kademeli dondurma (stepwise freezing): Bu yöntemde yavaş dondurmada olduğu gibi kryoprotektant madde ile muamele edilen kültür sabit hız yerine kademeli olarak donma noktasının altındaki sıcaklıklarda (örn. -10 , -15 , -30 , -40 °C ler de 3 er dakika) tutularak ısıları düşürülür ve daha sonra sıvı azot ortamına aktarılır. Muhafaza süresi sonunda çözülme işlemleri yavaş dondurmada olduğu gibi yapılır. Kademeli dondurma metodu ile hücre kültürü kryoprezervasyonu şematik olarak Şekil 3 de görülmektedir.



Şekil 3. Kademeli dondurma metodu ile hücre kültürü kryo­prezervasyonu.
Figure 3. Cryopreservation of cell cultures by stepwise freezing.

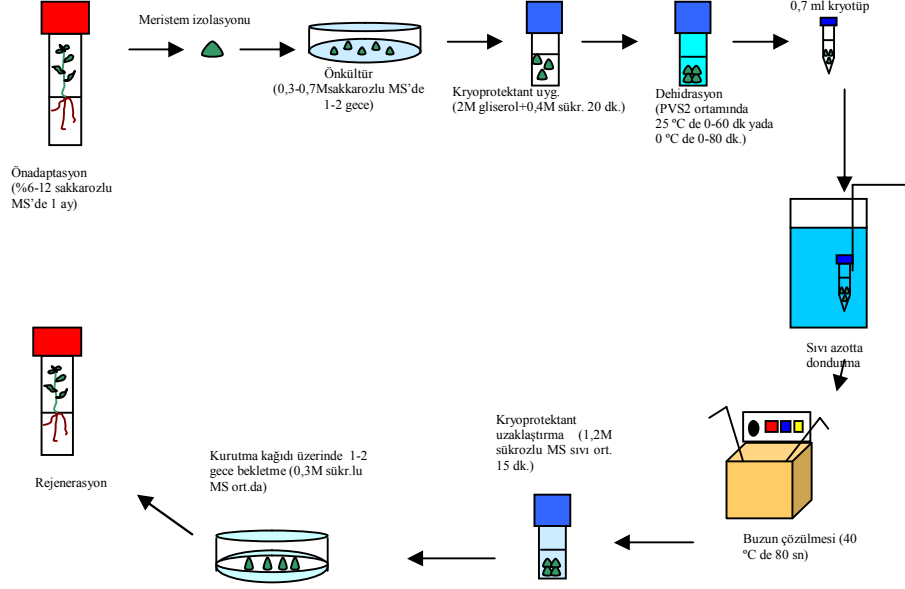
Damla halinde dondurma (droplet freezing) Meristem dokularının dondurulması için kullanılan bu yöntemde meristemler kryoprotektant içeren ortamda ön kültür yapılmaz. Kryoprotektant çözeltisi ile muamele edilen meristemler, steril petri kutusu içerisine yerleştirilen alüminyum folyolar üzerine bırakılan kryoprotektant damlacıkları üzerine yerleştirilerek ya patates meristemlerinde olduğu gibi sıvı azot içerisine daldırılarak direkt olarak dondurulur (Schäfer-Menuhr 1996) ya da Cassava (*Manihot esculenta*) meristemlerinde olduğu gibi 0,5 °C/dak soğutma hızı ile -25 °C – 30 °C ye kadar soğutucu içerisine bırakılır (Escobar ve ark. 1997). Aynı metod *Musa spp.* ve *Ensete spp.* bitkilerinde yapılmış olup çözme sonrası ortalama % 52,9 oranında yeniden rejenere edilmişlerdir (Panis ve ark. 2005). Daha sonra sıvı azot içerisine aktarılır. Meristemlerin Damla Halinde Dondurma (droplet freezing) yöntemi ile kryo­prezervasyonu şematik olarak Şekil 4’ de görülmektedir.



Şekil 4. Meristemlerin damla halinde dondurma (droplet freezing) yöntemi ile kryoprezervasyonu.

Figure 4. Cryopreservation of meristems by droplet freezing).

Hızlı dondurma (Rapid Freezing): Hızlı dondurma yönteminde soğutma hızı çok yüksektir (50-1000 °C/dak). Kryoprotektant çözeltisi ile muamele edilen materyal ya çıplak olarak ya da kryotüpler içinde sıvı azot içine daldırılır ve hücre suyu osmotik basınçla dışarı çıkarılır. Bu uygulama **vitrifikasyon tekniği** olarak adlandırılır. Hızlı dondurmada hücre içinde buz oluşumu engellenerek hücrelerdeki fiziksel zararın önüne geçilmiş ve hücrelerin canlı kalması sağlanmış olur. İlk defa Seibert 1976' da karanfil meristemlerini 0,1 mg/l IAA ve 0,5 mg/l Kinetin içeren agarlı MS ortamında karanlık şartlarda 4 gün süre ile inkube etmiş, ardından 0,5 ml % 5 lik DMSO içeren sıvı besin ortamı içinde 4 ml'lik kryotüplere aktarmış ve sıvı azot içinde - 196 °C de muhafaza etmiş ve başarılı sonuç almıştır. Vitrifikasyon tekniği patates ve çileklerde başarı ile uygulanmaya devam etmektedir. Şekil 5' de *In vitro*' da gelişen tropik monokotillerde hızlı kryoprezervasyon metodunun safhaları görülmektedir.



Şekil 5. *In vitro*'da gelişen tropik monokotillerde hızlı kryoprezervasyon metodunun uygulanması (Thin ve ark. 2000'den değiştirilerek).

Figure 5. Application of cryopreservation by rapid freezing (vitrification) on *in vitro* tropic monocotyles.

SONUÇ

Gelişmiş ülkelerde dondurarak muhafaza konusunda yoğun çalışmalar sürdürülmekte ve en son tekniklerle genetik kaynakların korunmasına ve muhafaza altına alınmasına çalışılmaktadır. Sahip olduğumuz bitki genetik kaynakları, çevresel ve diğer baskılarla genetik erozyona uğramakta ve yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kalmaktadır. Özellikle, tarımı yapılan türlere ait bitki genetik kaynaklarındaki çeşitliliğin korunması, bitkisel üretimin sürdürülebilirliği bakımından son derece önemlidir. Değişen çevre koşulları, hastalıklar ve insan tahribatı gibi birçok nedenlerden dolayı bitkisel genetik kaynaklar, özellikle rekalsitrant tohumlu türler, yabancı dölenen ve tohum miktarı az olan ya da tohum yoluyla çoğaltılmayan türler

yani vejetatif olarak üretilebilen materyal yok olmaktadır. Öncelikli olarak tarımı yapılan bitkisel genetik kaynakları, aynı zamanda kültür bitkilerinin de ıslahında kullanılabilecek yabancı materyali bu yöntemle muhafaza etmek zorunlu hale gelmiştir. Yurtdışında birçok araştırmacımız bu konuda eğitim almalarına rağmen dönüşlerinde bilgilerini genetik kaynaklarımız üzerinde uygulamaya aktarma konusunda yeterince destek bulamamışlardır. Ülkemizde zaman kaybedilmeden bu çalışmalara başlanması gerekmektedir.

LİTERATÜR LİSTESİ

- Anonim 2007. Ankara Üniversitesi, Ünihaber, Sayı 79: 15-31 Ocak, 4-5 (<http://www.ankara.edu.tr/gorsel/dosya/uni79.pdf>).
- Babaoğlu, M., E. Gürel ve S. Özcan. 2001. Bitki Biyoteknolojisi. Doku kültürü ve uygulamaları. Selç. Üniv. Vakf. Yay. Tak no:975-6652-03-9, 374 s.
- Bajaj, Y. P. S. and J. Reinert. 1977. Cryobiology of plant cell cultures and establishment of gene- banks. P.757-777. In J. Reinert and Y.P.S Bajaj (eds.), Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer-Verlag.
- Emeklier, H. Y. 2001 Germplazm Muhafazası. 282-323. In: Babaoğlu, ve ark. 2001. Bitki Biyoteknolojisi. Doku kültürü ve uygulamaları-I. Selç. Üniv. Vakf. Yay. Tak no:975-6652-03-9, 374 s.
- Endress, R. 1994. Plant Cell Biotechnology, p. 353, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Escobar, R. H., G. Mafla and W. M. Roca. 1997. A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. Plant Cell Rep., 16: 474-478.
- Gönülşen, N. 1987. Bitki Doku Kültürleri ve Uygulama Alanları. Ege Tarm. Araşt. Enst. Müd. Yay. no: 78, 140 s, Menemen-İzmir.
- Grout, B. W. W. and G. G. Henshaw. 1980. Structural observations on the growth of potato shoot-tip cultures after thawing from liquid nitrogen. Ann. Bot. 46: 243-248.

- Hatipoğlu, R. 1997. Bitki Biyoteknolojisi. Ç.Ü. Zir. Fak. Yay. No:190, Ders Kit. Yay. No: 58, Adana.
- Kartha, K. K., N. L. Leung, and K. Pahl. 1980. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105: 481-484.
- Kartha, K. K. 1984. Freeze preservation of Meristems. In: Cell cultures and Somatic Cell Genetics of Plants, I. K. Vasil (ed), pp: 621-628, Academic press Inc. Orlando/San Diego/New York/London.
- Kim H. H., E. G. Cho, H. J. Baek, C. Y. Kim, E. R. J. Keller, and F. Engelmann. 2004. Cryopreservation of garlic shoot tips by vitrification: Effects of dehydration, rewarming, unloading and regrowth conditions. CryoLetters 25: 59-70.
- Mullin. R. H. and D. H. Schlegel. 1976. Cold storage maintenance of strawberry meristems plantlets. Hort. Science. 11(2): 100-101.
- Niwata E., M. Suzuki, and M. Ishikawa 2000. Cryopreservation of garlic apical meristems by vitrification. p. 429-430. IPGRI, Cryopreserv. plant germpl., Curr. res. prog. and appl., Florent Engelmann and Hiroko Takagi (eds).
- Quatrano, R. S. 1968. Freeze preservation of cultured flax cells utilizing dimethylsulfoxide. Pl. Physiol. 43. 2057-2061.
- Panis B., B. Piette, R. Swennen. 2005. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. Plant Sci. 168: 45-55.
- Sakai, A., M. Yamakawa, D. Sakata, T. Harado, and T. Yakawa. 1978. Development of a whole plant from excised strawberry runner apex frozen to -196 °C. Low. Temp. Sci. Ser. B. 36: 31-38.
- Seibert, M. 1976. Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to -196 °C. Science: 1178-1179.
- Schäfer-Menuhr, A. 1996. Refinement cryopreservation techniques for potato. Final report for the period 1 Sept. 1991-31 Aug. 1996. International Plant genetic Resources Institute, Rome.

- Thin, N. T., H. Takagi, and A. Sakai. 2000. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of some vegetatively propagated tropical monocots by vitrification. p. 227-232. IPGRI, Cryopreserv. plant germpl., Curr. res. prog. and appl., Florent Engelmann and Hiroko Takagi (eds).
- Towill, L. E. 1983. Improved survival after cryogenic exposure of shoot tip derived from in vitro plantlet cultures of potato. *Cryobiology* 20: 567-573.
- Westcott, R. J., G. G. Henshaw, and V. M. Roca. 1977. Tissue culture storage of potato germplasm: Culture initiation and plant regeneration. *Plant science letters* 9: 309-315.
- Withers, L. A. and P. J. King. 1979. A novel cryoprotectant for the freeze preservation of cultured cells of *Zea Mays* L. *Pl. Physiol.* 64: 675-678.
- Withers, L. A. and P. J. King. 1980. A simple freezing unit and routine cryopreservation method for plant cell cultures. *Cryo-Letters.* 1: 213-220.
- Withers, L. A. 1980a. Tissue Culture Storage for Genetic Conservation. IBPGR Techn. Rpt. IBPGR Secretariat, Rome Italy.
- Withers, L. A. 1980b. Low temperature Storage of Plant Tissue Culture.p. 102-145. In A. Fiechter (ed), *Advances in Biochemical Engineering. Volume 18, Plant Cell Cultures II.* Springer-Verlag.