

Bitki Biyoçeşitliliğinin Kısa, Orta ve Uzun Süreli Korunması: Biyoteknoloji ve Kriyoprezervasyon

Emel YILMAZ-GÖKDOĞAN Ergun KAYA

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fak. Moleküler Biyoloji ve Genetik Böl., 48000, Muğla

Özet

Türkiye, bitki biyoçeşitliliği ve endemizm açısından oldukça zengin bir ülkedir. Ancak son yıllarda dünyada olduğu gibi Türkiye’de de biyoçeşitlilik ve bitki germplazmı ciddi tehdit altındadır. Hem beslenme hem de tıbbi amaçlı kullanılan kültür bitkileri ve yabancı ırklara ait genetik çeşitliliğin *in situ* veya *ex situ* germplazm koleksiyonları olarak korunması büyük önem arz etmektedir. Bitki biyoteknolojisinin kullanıldığı ve temelleri *in vitro* doku kültürü tekniklerine dayanan muhafaza stratejileri tükenme riski taşıyan türlerde başarı ile uygulanmaktadır. Bu derleme çalışmasında bitki germplazmının kısa, orta ve özellikle kriyoprezervasyon tekniği ile uzun süreli muhafazası, kriyoprezervasyonun klasik ve yeni teknikleri ile kriyoterapi gibi farklı kullanım alanları belirtilmiş ve yeni tekniklere ait çalışmalar özetlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Biyoçeşitlilik, koruma, biyoteknoloji, kriyoprezervasyon

Short, Medium and Long-Term Conservation of Plant Biodiversity: Biotechnology and Cryopreservation

Abstract

Turkey is a very rich country in terms of plant biodiversity and endemism. In the recent years, However, as in the World, biodiversity and plant germplasm have been under serious threatening in Turkey. As *in situ* or *ex situ* protection of genetic diversity of culture plants and their wild types used both food and medicinal is great important. Protection strategies based on *in vitro* tissue culture techniques and use plant biotechnology are successfully implemented to species at risk of extinction. In this review were pointed out short, mid- and especially long-term conservation via cryopreservation techniques of plant germplasm, new and classic techniques and different usage of cryopreservation such as cryotherapy, and were summarized works on new techniques.

Key words: Biodiversity, conservation, biotechnology, cryopreservation

Giriş

1. Biyoçeşitlilik Nedir?

Biyoçeşitlilik genellikle mevcut türlerin sayısı olarak ifade edilmektedir (Wilson, 1988). Daha geniş kapsamda çeşitlilik, her bir türe ait populasyonun büyüklüğü ve türlerin dağılımını kapsayan bilgiler bütünü olarak kabul edilmektedir. Son zamanlarda biyoçeşitlilik, sadece tür zenginliği ile sınırlandırılmamakta, varyete, ırk, yaşam formu ve genotiplerin bulunduğu çevre

bileşenleri, habitat tipleri, yapısal elementlerle de ilişkilendirilmektedir. Biyoçeşitlilik, farklı büyüklüklerdeki birimler (tür, populasyon, biyosenöz, habitat, çevre), farklı kompozisyonlar (genom, tür, populasyon, ekosistem ve çevre elementlerinin bütünü) ve fonksiyonlar (hiyerarşik sistemin farklı seviyelerinde gerçekleşen olaylar) ile ilgili olarak bir aşama sırası göstermektedir (Noss, 1990).

Biyoçeşitliliğin önemli bir parçasını bitki çeşitliliği oluşturmakta ve bitkiler

insanoğlunun yaşamında önemli bir rol oynamaktadır (Dülger ve ark., 1997). Ancak, son yıllarda bitki çeşitliliği ciddi anlamda tehlike altındadır ve dünyadaki tüm bitki türlerinin 1/3'i olan yaklaşık 100.000 tür kaybolma riski taşımaktadır (Tan, 1996). 6.000'den fazla endemik türle büyük bir bitki zenginliğe sahip Akdeniz havzasında da ciddi bir genetik erozyon yaşanmaktadır (Tan, 1996; Dağcı ve ark., 2002). Vavilov'un orijin merkezlerinden ikisine (Vavilov, 1992), ayrıca ekonomik olarak önemli çok sayıda doğal yayılışı olan ve kültüre alınmış türe ev sahipliği yapan Türkiye'de yer alan 2.600'den fazla endemik türün %22'den fazlası yok olma tehdidi altındadır (Vural, 2003). Oysaki hem beslenme hem de tedavi amaçlı kullanılan bitkilerin korunması ve gelecek nesillere devamlılığın sağlanması büyük önem arz etmektedir. Bu bağlamda kültür bitkileri ve yabancı ırklarına ait genetik çeşitliliğin *in situ* veya *ex situ* germplazm koleksiyonları olarak korunması bir zorunluluktur (Benson, 1999).

2. Biyoçeşitliliğin Korunmasında Kullanılan Biyoteknolojik Yöntemler

Bitki koruma biyolojisi, modern biyoteknolojik uygulamaları içeren interdisiplinler bir kavramdır. Günümüzde bitki doku kültürü teknikleri, kriyoprezervasyon, moleküler genom analizleri gibi yaklaşımlardan, (i) *in situ* ve/veya *ex situ* germplazm koleksiyonlarının oluşturulması, (ii) kısa, orta ve uzun süreli muhafaza, (iii) mikroçoğaltım, (iv) moleküler karakterizasyon, (v) hastalıkların tanı ve tedavisi, (vi) patent altına alma, (vii) belgeleme, (viii) bitki genetik kaynaklarının değiştirilmesi gibi amaçlara hizmet etmektedir (Benson, 1999).

2.1. *In situ* ve *Ex situ* Koruma

Bitki çeşitliliğinin korunması, *in situ* veya *ex situ* olarak gerçekleştirilmektedir. *In situ* ve *ex situ* koruma stratejileri, birbirlerini tamamlayıcı metotlar olarak kullanılmaktadır. Doğal çevredeki transformasyonlar ve habitatlardaki yıkım nedenleri ile biyoçeşitliliğin kaybına sebep olan tür, popülasyon ve ekosistem kompozisyonundaki

değişimler, türlerin korunmasında tek başına yetersizdir. Kültüre alınmış veya ıslah edilmiş bitkilerin çiftliklerde korunmasının yanı sıra doğal yayılış gösteren bitki türlerinin kendi habitatlarında devamlılığı *in situ* koruma stratejisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna karşılık tohum bankası, tarla gen koleksiyonları, *in vitro* koleksiyonlar ve botanik bahçeleri gibi yaklaşımlar bitki çeşitliliği için koruma programlarına alternatif olmaktadır. *Ex situ* koruma stratejisi, biyolojik materyalin kendi doğal habitatları dışında devamlılığı üzerine kurulmuştur ve tükenme riski taşıyan belirli bitkileri korumada kullanılan elverişli bir yoldur (Cruz-Cruz ve ark., 2013). *Ex situ* koruma ile bankalarda tohumların muhafazası, etkili ve ekonomik bir şekilde yapılmaktadır (Gonzalez-Benito ve ark., 2004).

2.2. Kısa süreli koruma ve *in vitro* doku kültürü

Geçmiş 1900'lü yıllara dayanan bitki doku kültürü, aseptik şartlarda, yapay bir besi ortamında hücre, doku veya organ gibi çeşitli bitki kısımlarından kontrollü sıcaklık ve ışık koşullarında yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin elde edilmesini kapsamaktadır (Thorpe, 2007). Hedef bitkinin çok kısa sürede ve yüksek miktarlarda çoğaltılmasını sağlayan yöntem günümüzde germplazmın korunmasında, bitki fizyolojisi ve gen mühendisliği çalışmalarında yaygın şekilde kullanılmaktadır (Wang ve Ha, 2007). Kısa süreli korumada muhafaza edilecek materyal, düzenli aralıklarla alt kültüre alınmaktadır. Alt kültürler arasındaki süre, genetik kararsızlık sonucu genotipteki değişimler, teknik hatalar, kontaminasyon riski ve masrafı nedeni ile mümkün olduğunca genetik kaynakları tehlikeye atmayacak uzunlukta olmalıdır (3 ile 9 ay). Kısa süreli korumada, eksplantlar normal büyüme koşulları veya gelişimi sınırlandıran koşullarda kültüre alınmaktadır (Villalobos ve Engelmann, 1995).

Yeni çeşitlerin geliştirilmesi, mevcut çeşitlerde genetik farklılığın oluşturulması, kaybolma tehlikesi altındaki türlerin korunması ve geleneksel yöntemlerle üretilmesi zor olan türlerin rutin şekilde

çoğaltılmasında kullanılan *in vitro* çoğaltım yöntemlerinden olan organogenezis, çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak meristematik bölge içermeyen eksplantlardan doğrudan (direkt organogenez) veya kallus (doku organizasyonu göstermeyen hücresel kitleler) oluşumunu takiben dolaylı (indirekt organogenez) şekilde meydana gelmektedir (Gürel, 1997). Buna ilaveten, mikroçoğaltım yönteminde ise, tam bir bitkiyi oluşturabilecek meristematik bölgelere sahip tomurcuk ve gövde ucu eksplantlarından çeşitli büyüme düzenleyicileri kullanılarak genetik kararlılıkları yüksek olan çoklu gövde gelişimi teşvik edilerek kısa sürede yüzlerce klon bitki elde edilmektedir (Gürel ve Uçar-Türker, 2001). Uygun *in vitro* kültür koşullarında somatik hücre, doku ya da organlardan somatik embriyolar elde edilmektedir. Somatik embriyogenezis, bitkilerin hızlı çoğaltılmasında, sentetik tohum üretiminde ve transformasyon çalışmalarında yaygın şekilde kullanılmaktadır (Bournman, 1994).

Bitki doku kültürü, *in vitro* çoğaltımın yanı sıra pek çok farklı uygulama alanında önemli potansiyele sahiptir. Örneğin, saf hatları elde etmek amacı ile uzun zaman gerektiren klasik bitki ıslahı ile melezleme yerine anter (polen) ve yumurtalık (ovül) kültürü ile haploid bitkilerden %100 homozigot bireyler elde edilmektedir (Maheswari ve ark., 1995). *In vivo* melezlemelerde özellikle türler arası melezlemelerden sonra ortaya çıkabilecek embriyo oluşumunu veya gelişimini engelleyen uyumsuzluklar embriyo kültürü ile aşılabilmektedir. *In vitro* seleksiyon yöntemi ile tuzluluk, kuraklık, herbisit, patojenler gibi çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı dayanıklı hücreler seçilmekte ve ilgili stres faktörlerine karşı toleranslı bitkiler elde edilebilmektedir. Ayrıca, totipotent hücrelerin *in vitro* kültürü ile kallus veya süspansiyon şeklinde belli aralıklarla yeniden oluşturularak uzun süreli saklanabilmekte ya da ihtiyaç dahilinde bu hücrelerden yeni bitkiler elde edilebilmektedir. Böylelikle farklı *in vitro* doku kültürü teknikleri ile bitki germplazmalarının

korunması sağlanmış olmaktadır (Lamb ve Beachy, 1989).

2.3. Orta süreli koruma

Orta süreli korumanın temelini düşük sıcaklık ya da ozmotik basınç altında büyümenin indirgenmesi oluşturmaktadır. Orta süreli saklamada amaç, kültür ortamında (besiyeri içeriği) ve kültür şartlarında (sıcaklık, ışık) yapılan bazı optimizasyonlarla kültürlerin canlılık ve genetik kararlılıklarında herhangi bir değişiklik olmadan besiyeri gereksinimlerini azaltarak alt kültür sürelerini uzatmaktır ve bitkileri yavaş büyümeye teşvik etmektir (Lambardi ve ark., 2009).

Besiyeri içeriğindeki tuz konsantrasyonunu azaltmak (White, 1934), besiyerindeki mikro ve makroelement konsantrasyonlarını da düşürerek indirgenmiş besiyeri kullanılması ve şeker miktarında yapılan değişiklikler, özellikle sukroz yerine mannitol gibi ozmotik olarak aktif şeker alkollerinin kullanımı (Staritsky ve Zandvoort, 1985), bitki büyüme düzenleyicisi miktarının azaltılması (Dussert ve ark., 1997) kültürdeki bitkilerin büyümesini yavaşlatan farklı yaklaşımlardır. Besiyerinde yapılan bu değişikliklerin dışında kültür sıcaklığını düşürmek de orta süreli korumada sıklıkla kullanılmaktadır.

Orta süreli korumaya yönelik olarak eksplantların sentetik tohum oluşturularak saklanması kullanılan diğer yöntemlerden biridir. İlk kez 1977 yılında Murashige, doğal tohumların yerine geçebilecek bir sistem olarak somatik embriyoların sodyum aljinat gibi maddelerden oluşan bir matris içinde enkapsüle etmesi ile sentetik tohum teknolojisinin temelini atmıştır. Teknoloji, klonal çoğaltım ve tohumla çoğaltımın avantajlarını birleştiren bir yaklaşım olmuştur. Sentetik tohum, kısır ya da kararsız genotipe sahip, genetik yapısı değiştirilmiş, tohum verimliliği indirgenmiş, elle tozlaştırılan hibritlerde ve elit gen kaynaklarının kurtarılması gibi pek çok alanda etkin şekilde kullanılmaktadır (Redenbaugh ve ark., 1988). Enkapsülasyon teknolojisi germplazmanın muhafazası ve laboratuvarlar arasında bitkisel materyalin değişimi gibi yaklaşımların yanı

sıra fidanlıklarda yeni ve etkin bir araç olarak da rol oynamaktadır (Sharma ve Shazad, 2012).

Sentetik tohum, *in vitro* veya *ex vitro* koşullarda bir bitkiye dönüşebilme yeteneğine sahip ve muhafazadan sonra bile bu özelliğini koruyan, toprağa ekimde fonksiyonel olarak mimik (kopya) tohum olarak kullanılabilen somatik embriyo, sürgün tomurcuğu veya diğer meristematik dokuların yapay şekilde enkapsülasyonudur (Özüdoğru ve ark., 2011a,b). Önceleri sentetik tohum teknolojisi, transport, muhafaza ve ekim için gerçek bir tohum gibi kullanılabilen somatik embriyoların enkapsülasyonu üzerine kurulu olmasına karşın son yıllarda somatik embriyoya alternatif olabilecek apikal sürgün tomurcuğu, aksillar tomurcuk ve nodal segment gibi embriyonik olmayan vejetatif propagüllerin enkapsülasyonuna dönüşmüştür. Sentetik tohum teknolojisi, hidrate (hidrojel içerisinde) edilmiş ve kurutulmuş olmak üzere sentetik tohumun iki tipini içermektedir. En çok çalışılmış olan metot sentetik tohum üretimi için hidrojelde propagüllerin enkapsülasyonunu gerektirmektedir. Sodyum aljinat, potasyum aljinat, karragen, jelatin, sodyum pektat, karboksimetil selüloz gibi kaplama ajanları enkapsülasyon için kullanılmaktadır ve bunlar

arasından sodyum aljinat yoğun şekilde tercih edilmektedir (Rai ve ark., 2009). *Photinia fraseri* ve *Nerium oleander* türlerine ait sentetik tohumlar 3 ay +4 °C'de saklanmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır (Özden-Tokatlı ve ark., 2008).

Orta süreli saklamada kullanılan diğer bir yöntem de farklı kültür kaplarının kullanılmasıdır. Kültür kaplarının farklı gaz geçirgenlik oranı, kültürlerin hava ile teması ve alt kültür periyodunda açığa çıkan gaz miktarı orta süreli saklamayı etkileyen faktörlerdendir. İki farklı gül varyetesinin kullanıldığı bir çalışmada hava geçirgenliği farklı olan 3 kültür kabı (gaz geçirmeyen 500 ml'lik cam kültür kabı, yarı geçirgen 80 ml'lik plastik silindir ve gaz geçiren Starpac plastik torbalar) kullanılmış ve 6 ay +4 °C'de orta süreli saklama sonrasında en yüksek kazanım (% 80) cam kültür kaplardan elde edilmiştir. Ayrıca cam kaplarda biriken CO₂ düzeylerinin % 0,4'ün üzerine çıkmadığı gözlenmiş ve solunum belirtici olan CO₂'in gövde kültürlerinde büyüme hızını yavaşlatıcı bir faktör olduğu belirlenmiştir (Previati ve ark., 2008). Kısa ve orta süreli koruma tekniği ile muhafaza altına alınan bitki türleri ve eksplant tiplerine göre son 10 yıla ait çalışmalar Çizelge 1'de özetlenmiştir.

Çizelge 1. Kısa ve orta süreli koruma tekniklerinin uygulandığı son 10 yıla ait çalışmalar

Table 1. Works of short and mid-term conservation techniques treatments in the last ten years

Latince İsmi	Eksplant Tipi	Teknik	Referans
<i>Rauwolfia tetraphylla</i> L.	Enkapsüle edilmiş nodal segment	Kısa süreli koruma	Faisal ve ark., 2006
<i>Drosophyllum lusitanicum</i> (L.) Link.	Nodal segment	Kısa ve orta süreli koruma	Gonçalves ve Romano, 2007
<i>Cineraria maritima</i> L.	Enkapsüle edilmiş mikrosürgün	Orta süreli koruma	Srivastava ve ark., 2009
<i>Photinia x fraseri</i> Dress	Sürgün ucu	Kısa ve orta süreli koruma	Akdemir ve ark., 2010
<i>Fraxinus excelsior</i> L.	Embriyogenik kallus	Yavaşlatılmış soğutma	Özüdoğru ve ark., 2010
<i>Eclipta alba</i> (L.) Hassk	Enkapsüle edilmiş nodal segment	Kısa süreli koruma	Singh ve ark., 2010
<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	Sürgün ucu	Kısa süreli koruma	Sundararaj ve ark., 2010
<i>Sequoia sempervirens</i> (D. Don) Endl.	Sürgün ucu Enkapsüle edilmiş tomurcuk	Orta süreli koruma	Özüdoğru ve ark., 2011c
<i>Decalepis hamiltonii</i> Wight and Arn.	Enkapsüle edilmiş nodal segment	Kısa süreli koruma	Sharma ve Shahzad, 2012

2.3.1. Somaklonal Varyasyon

Sürdürülen alt kültürlemeler, bitki büyüme düzenleyicilerinin kullanımı, ortama eklenen diğer maddeler ve bitkilerde genetik değişikliklere neden olabilen kallus fazındaki değişimler, somaklonal varyasyon olarak adlandırılan bir takım değişikliklere neden olabilmektedir. Somaklonal varyasyon, doğada önceden bilinmemektedir ve kalıtsal (genetik) veya non-kalıtsal (epigenetik) olabilmektedir. Genetik varyasyon, nokta mutasyonlara ilaveten sitolojik ya da kromozomal anomalileri içermektedir. Bu durum *in vitro*'da gelişen tüm bitkiler için problem olsa da klonal materyalin üretildiği muhafaza koleksiyonları ile kısmen ilgilidir. Bitkilerdeki somaklonal varyasyonu belirlemek üzere fenotip analizi, flow sitometri, izozim sistemler ve moleküler markörlerin kullanımı gibi farklı metotlar kullanılmaktadır (Sarasan ve ark., 2006).

2.4. Uzun süreli koruma (Kriyoprezervasyon)

Bitki çeşitliliğinin korunması, genetik erozyon veya kaybolma riski taşıyan bitki tür, form ve çeşitlerinin güvence altına alınmasıdır. Kısa süreli koruma sağlayan *in vitro* tekniklerin kullanımının ekonomik olmaması, geniş alanlar gerektirmesi, kontaminasyon ve somaklonal varyasyon riski gibi çeşitli dezavantajlara sahip olması nedeni ile 1900'lü yılların sonlarında bitki parçalarının ultra düşük sıcaklıklarda (-196 °C), sıvı azot içinde uzun süreli saklanması temeline dayanan kriyoprezervasyon tekniği geliştirilmiştir. Kriyoprezervasyon tekniği, -196 °C'lik sıvı azotta biyolojik materyallerin hemen hemen tüm metabolik faaliyetlerinin yavaşlatılması temeline dayanmakta ve bitki materyali olarak gövde ucu, nodal tomurcuk, dormant tomurcuk, meristem, polen, tohum, sentetik tohum, somatik ve zigotik embriyolar, hücre süspansiyonu, kallus gibi çok farklı doku ve organ tipleri kullanılabilir (Lambardi ve De Carlo, 2003; Gonzalez-Benito ve ark., 2004; Taşkın,

2008; Tagipur ve ark., 2016). İlk kriyoprezervasyon çalışmaları 1977 yılında Bajaj tarafından patates bitkisinde iki aşamalı soğutma tekniği kullanılarak uygulanmıştır. Metotta, hücre su içeriği, dondurma ile indüklenen dehidratasyon ile azaltılmıştır. İlk olarak, tuber sürgünü ve aksillar tomurcuklar, farklı gliserol ve/veya sukroz çözeltilerinde muamele edilmiş ve akabinde buhar fazda sıvı azota (likit nitrojen: LN) ve sonra direk LN'e batırılarak soğutulmuştur. Kriyoprezervasyon tekniğinin uygulanabilirliği, donör kültürü, sürgün uçları, sürgün uçlarının ön kültürü, ozmoproteksiyon ve kriyoproteksiyon, soğutma ve çözme, devam eden sonraki kültürler gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Kaczmarczyk ve ark., 2011). Kriyoprezervasyonun avantajları arasında küçük alanlarda uygulanabilir olması, kontaminasyondan materyalin korunabilmesi ve ekonomik olması gelmektedir (Rao, 2004). Kriyoprezervasyon tekniğinin ekonomikliği ve güvenilirliği, alternatif muhafaza stratejisi olarak ortadoks tohumlara da uygulanabilir olmasıdır. Patates, tatlı patates, muz ve şeker kamışı gibi ortadoks tohum üreten bitkiler genellikle heterozigot yapılı ve steril genotiplidirler. Bu bitkilerin orta dereceli muhafazası ancak vejetatif olarak çoğaltılan belirli genotiplerde mümkün olabilmektedir. (Engelmann, 2004). Ortadoks tohumlara sahip pek çok tarımsal ürün, düşük nem içeriğinde dehidrate olabilmektedirler ve bu yüzden uzun periyotlarda ve düşük sıcaklıklarda muhafaza edilebilmektedir (Gonzalez-Arno ve Engelmann, 2006). Tropik orjinli meyve ve orman ağaçları ise kriyoprezervasyon için yeteri kadar düşük nem düzeyinde kurutulamayan rekalsitrant tohum üretmektedirler. Dolayısı ile yüksek nem içeriğine sahip olmaları ve kurutmaya karşı direnç gösterememeleri nedeni ile rekalsitrant tohumların kriyoprezervasyonu için, daha fazla gereksinime ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüzden bu tohumlar, ortadoks tohumlara uygulanan prosedürler

kullanılarak rutin şekilde muhafaza edilememekte ve böylece bu türlerin kriyoprezervasyonunda sorunlar yaşanmaktadır (Blakesley ve ark., 1996). Rekalsitran tohum üreten ceviz, meşe gibi bitkiler, nispeten yüksek kritik su içeriğinin altındaki kurutmaya karşı dayanıksızdırlar (Gonzalez-Benito ve ark., 2004). Bununla birlikte genel olarak farklı türler için geliştirilecek kriyoprezervasyon tekniğinin başarısı, denenecek her yeni bitki türü, çeşidi ve hatta genotipi için optimizasyonunun yapılmasından geçmektedir (Charoensub ve ark., 2004).

Kriyoprezervasyon ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda pahalı, karmaşık ve kontrollü soğutma cihazlarının kullanımını gerektiren iki aşamalı dondurma teknikleri kullanılmıştır. Örnekler bu teknikte hücre içi homojen buz oluşumunun gözlemlendiği -35/-40 °C'a kadar dakikada yaklaşık olarak 0,5-1 °C soğutmayı takiben sıvı azota aktarımı yapılmıştır (Reed ve Uchendu, 2008). Son yıllarda kolay uygulanabilen, dondurmaya sağlayan pahalı cihazları gerektirmeyen ve vitrifikasyona dayanan tek aşamalı dondurma teknikleri başarı ile uygulanmaktadır (Engelmann, 2004). Yöntemin temelini sıvı azota örneklerin doğrudan aktarılması ile sıcaklığın birden düşmesi esnasında hücre vitrifikasyonunun teşvik edilmesi yani bitki hücresi için ölümcül olabilecek hücre içi buz oluşumunu engellenmek için sitozolün camsı ve amorf hale dönüştürülmesi oluşturmaktadır.

Tek aşamalı dondurma yönteminde vitrifikasyon iki şekilde gerçekleştirilmektedir. Bunlar (i) kimyasal olarak örnekleri yüksek konsantrasyonlu kriyokoruyucu çözeltilerde (Plant vitrification solution2: PVS2) bekletmek ve (ii) dehidratasyon olarak adlandırılan fiziksel olarak çıplak ya da enkapsüle edilmiş bitki parçalarının laminar akımlı kabin içerisinde hava akımına maruz bırakmak veya silikajel üzerinde kurutmaktır (Fabre ve Dereuddre, 1990). İki yöntemden biri ile su içeriği azaltılan bitki örnekleri sıvı azota direk aktarılmakta ve en az 24 saat bekletilmektedir. Çünkü 24 saatin üzerindeki tüm süreler aynı kabul edilmekte ve

hücredeki tüm metabolik olayların hemen hemen tamamen baskılandığı kabul edilmektedir (Kaya ve ark., 2013). Sıvı azottan çıkarılan örnekler, önceden ısıtılmış 40 °C su banyosunda hızla çözüldükten sonra gelişimin sağlanması amacı ile rejenerasyonu teşvik eden besiyerine aktarılmaktadır.

Bitki germplazmasının korunması üzerine çalışmalar ekonomik olarak önem arz eden bitkilerin yanı sıra tıbbi amaçlı kullanılan bitkiler ile nadir bulunan ve nesli tükenme tehlikesi altındaki bitki türlerini de kapsamaktadır. Kriyoprezervasyon için kullanılan yöntemin başarısı kullanılan bitkisel materyalin özelliği, laboratuvar imkanları, personelin deneyimi gibi çok farklı faktörlere bağlı olarak değişiklik arz etmektedir (Reed, 2002).

2.4.1. Geleneksel kriyoprezervasyon tekniği (yavaş soğutma veya kontrollü soğutma)

Yavaş soğutma, bitkisel dokuların kriyoprezervasyonu için geliştirilmiş ilk yöntemdir. Klasik prosedür, ön uygulama, yavaş soğutma, ultra düşük sıcaklıkta muhafaza, hızlı çözme ve son uygulamayı gerektirmektedir (Villalobos ve Engelmann, 1995). Ön uygulamada DMSO (dimetilsülfoksit), sukroz, sorbitol, mannitol ve polietilenglikol gibi koligatif kriyokoruyucular ile muamele edilen bitkisel materyalin yavaş soğutulması sağlanmaktadır. Böylece hem kriyokoruyucuların toksik etkileri azaltılmakta hem de hücre içinde ölümcül buz kristallerinin oluşumu engellenmektedir. Sıcaklık kontrollü bir şekilde düşürülürken hücre içindeki suyun hücre dışına çıkışı gerçekleşmekte ve etkin bir kriyokoruyucu mekanizma olarak buz kristalleri hücre dışında oluşmaktadır (Benson, 2004).

Yöntemde soğutma iyi kontrol edilmeli ve sıcaklık programlanmış bir soğutucu ile dakikada 0,5-1 °C azaltılarak homojen buz oluşumunun gerçekleşeceği -40 °C'ye indirilmektedir. Hücre dışına doğru suyun çıkışı ile sitoplazmanın konsantrasyonu artmaktadır. Buz çekirdekleşmesinin oluşmaya başladığı yaklaşık -9 °C'de,

sitoplazma yoğunluğu yüksek olduğundan hücrede buz oluşumu meydana gelmemektedir. Ancak, su oranı yüksek olan hücre dışında buz çekirdekleşmesi başlamaktadır. Yapılacak çok hızlı bir soğutma ile hücreler hızlı şekilde yüksek miktarda su kaybetmekte ve kriyokoruyucuların hasarına maruz kalmaktadırlar. Çok yavaş soğutmada ise yeterli dehidrate olmayan hücrelerde buz kristalleri oluşmaktadır. Bundan dolayı soğutma oranının iyi optimize edilmesi hücrelerin canlı kalması açısından büyük önem arz etmektedir. Yavaş soğutma tekniği gövde ucu, kallus, embriyonik dokular gibi farklı bitki eksplantlarında uygulanmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır (Benson, 2004; Özüdoğru ve ark., 2009; Reed ve Uchendu, 2008; Sakai, 1986).

Yavaş soğutma tekniğinde ilk adım ön koşullandırma. Ön koşullandırma hem eksplantların kriyoprezervasyon işlemlerine hazırlanmasını sağlamak hem de sıvı azot sonrası canlılığı arttırmaktadır. Kriyodehidratasyona hazırlıkta, eksplantların soğuğa alıştırılması, trehaloz gibi ozmotik olarak aktif bileşikler ve prolin, absisik asit gibi anti-stres ajanlarla muamelesi yapılmaktadır (Sakai, 1960; Sakai ve Nishiyama, 1978; Bravo ve ark., 1998). Özellikle absisik asitin hücre içi su dengesinin kurulması (Tanino ve ark., 1990) ve donmayı engelleyici kimyasalların salınımını indüklediği (Lee ve ark., 1991) bilinmektedir.

Ön koşullandırmadan sonra eksplantlar, kriyoprezervasyondan sonra eksplantların canlılığını sağlamak için kriyokoruyucu çözeltilerle muamele edilmektedir. Bunun için DMSO sıklıkla tercih edilmekte ve genellikle besiyeri miktarının %10-15'i kullanılmaktadır. DMSO ilk olarak *Linum usitatissimum* bitkisinde kullanılmış ve -50 °C'de %14 canlılık elde edilmiştir (Lovelock ve Bishop, 1959). %10 DMSO + %10 PEG + %8 glikoz karışımı ise *Saccharum* sp.'nin kallus kültürlerinde başarılı sonuçlar vermiştir (Ulrich ve ark., 1979). PVS2 (Sakai ve ark., 1990) kriyoçözeltisi, *Prunus* sp.'nin kriyoprezervasyonunda başarılı şekilde kullanılmıştır (Brison ve ark., 1995).

Son aşama olan sıvı azottaki örneklerin çözme işlemi oldukça kritiktir. Buz

kristallerinin yeniden oluşumunu önlemek için çözme işlemi olabildiğince hızlı şekilde yapılmalı ve optimum çözme sıcaklığı iyi şekilde belirlenmelidir. Bu faktörler canlılığı etkileyen önemli faktörler arasında yer almaktadır (Plessis ve ark., 1993).

2.4.2. Geliştirilmiş kriyokoruma teknikleri (Hızlı soğutma-tek aşamalı dondurma)

Tek aşamalı dondurma yönteminin temeli hücre vitrifikasyonu üzerine kurulmuştur (vitrifikasyon hücre içi sıvısının yüksek konsantrasyonlu kriyokoruyucular kullanımı ile buz kristalleri olmadan sitozolün camsı, amorf bir yapıda olmasıdır) ve fiziksel dehidratasyon, enkapsülasyon-dehidratasyon, vitrifikasyon, enkapsülasyon-vitrifikasyon ve damlacık dondurma teknikleri başarı ile uygulanmaktadır. Tek aşamalı dondurma yönteminde, dokular vitrifikasyon çözeltilerinde yeterince dehidrate olması ve hücre içi ölümcül buz oluşumunun engellenmesi önemlidir. Bu amaç için etilen glikol ve gliserol içeren vitrifikasyon çözeltileri (PVS2: plant vitrification solution2 ve PVS3: plant vitrification solution3) sıklıkla kullanılmaktadır. PVS2 (%30 gliserol + %15 etilen glikol + %15 DMSO, büyüme düzenleyicisi içermeyen MS + 0,4 M sukroz) ve PVS3 (%40 gliserol + %40 sukroz + büyüme düzenleyicisi içermeyen MS) çözeltileri -100 °C' a kadar süper soğutma özellikleri ile düşük sıcaklıklarda dokularda vitrifikasyona yol açmaktadırlar (Fahy ve ark., 1984). Bunlara ilaveten vitrifikasyon için 0,4 M sukroz + 2 M gliserol içeren LS (Loading solution-yükleme solüsyonu) çözeltisinin kullanımı, ozmokoruyucu olarak görev alarak dehidratasyona yol açmaktadır ve dokuların soğuk toleransını arttırmaktadır (Nishizawa ve ark., 1992; Sakai ve ark., 1991). Vitrifikasyon sırasında hücredeki metabolik olaylar minimuma inmekte ve doku yıkımı engellenerek genetik kararlılığın korunması sağlanmış olmaktadır (Burke, 1986).

2.4.2.1. Kolaylaştırılmış Dondurma Tekniği

Dondurma tekniğini kolaylaştırmak için klasik metotta kullanılan -20 veya -40 °C'e kadar soğutabilen kontrollü dondurma

cihazları, standart ticari soğutucuların yerine kullanılmaktadır. Öncelikle örneğin sıcaklığı dondurucunun sıcaklığı ile eşleştirilmekte, örnekler sonrasında hızlı şekilde sıvı nitrojene daldırılmaktadır. Bu teknik havuç ve kahve somatik embriyoları, muzun zigotik embriyoları, çeşitli *Citrus* varyetelerinin embriyonik hücre süspansiyonları ve kalluslarında başarı ile uygulanmıştır (Villalobos ve Engelmann, 1995).

2.4.2.2. Desikasyon ve Ön kültürleme Desikasyon

Zigotik embriyolar veya embriyonik eksen, başarılı şekilde kurutulmaktadır. Tohumlardan izole edilen embriyolar, steril kabinde yatay akımlı havada kurutulmakta ve hızlıca sıvı nitrojene aktarılıp dondurulmaktadır. Desikasyon süresi embriyonun büyüklüğüne ve su içeriğine bağlı olarak değişmektedir. Genellikle, dondurma işleminden sonra embriyonun maksimum canlılığını sağlayan su içeriği %15-20 civarında olmalı (yaş ağırlık) ve canlılığı sağlayan bu içerik aynı zamanda desikasyon hasarına da yol açmamalıdır. Abdelnour-Esquivel ve ark. (1992), *Coffea arabica* zigotik embriyolarında desikasyondan sonra su içeriği ve canlılıkla ilgili başarılı sonuçlar almışlardır (Villalobos ve Engelmann, 1995).

Kriyokoruyucu içeren ortamda ön kültürleme ve desikasyon tekniklerini kombine eden kriyoprezervasyon tekniği, özellikle hindistan cevizi zigotik embriyoları için geliştirilmiştir. Olgun embriyolar 4 saat yatay akımlı steril kabinde kurutulmuş, 11-20 saat 600 g L^{-1} glikoz ve 150 g L^{-1} gliserol içeren ortamda kültürlenmiş ve hızlı gerçekleştirilen dondurma ve çözme işleminden sonra %33-93 yeniden canlanma oranı elde edilmiştir (Villalobos ve Engelmann, 1995).

2.4.2.3. Dehidratasyon

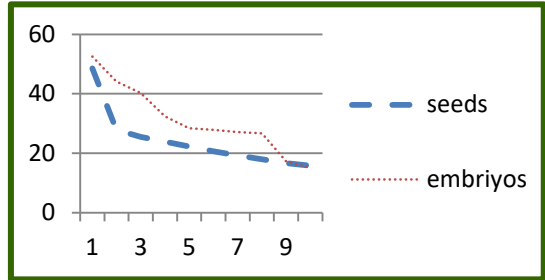
Bitkisel örneklerin kurutulması esnasında su dokulardan ayrılarak havaya difüze olmaktadır. Difüzyon oranı, havanın buhar basıncı, sıcaklık, doku boyunca oluşan hava hareketinin hızı, dokunun şekli ve boyutu, dokunun dış yüzeyinin fiziksel ve kimyasal kompozisyonu ve kurutulacak materyalin

miktarı gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Dokuların kriyoprezervasyonu sırasında bu faktörlerin bir veya birkaçı değiştirilerek kuruma oranı iyi şekilde ayarlanmalıdır (Şekil 1-2). Kullanılacak kurutma yönteminde ortam sıcaklığı ve nem oranı değişiklik arz etmektedir. Genellikle kurutulacak örnek miktarı, laboratuvar olanakları ve hangi kurutma yönteminin uygulanacağı dikkatli şekilde seçilmelidir. Kurutma yöntemlerinden bazısı sadece tohumlar için uygunken bazıları ise çoğu bitkisel dokular için kullanılabilir (Reed, 2008).



Şekil 1. *Musa velutina* tohumları (A, B), *M. acuminata* (D, E), *M. velutina* embriyosu (C), *M. acuminata* embriyosu (F), (Bar 1,5 mm; Kaya ve ark., 2016).

Figure 1. Seeds of *Musa velutina* (A, B), *M. acuminata* (D, E), an embryo of *M. velutina* (C), *M. acuminata* (F), (Bars 1,5 mm).



Şekil 2. *M. velutina* tohumları ve embriyolarının nem içeriği değişimi (çevresel koşullar; sıcaklık: $77 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{F}$, nispi nem: $\%17 \pm 1$).

Figure 2. Moisture content change of *M. velutina* seeds and embriyos (enviromental conditions; temperature: $77 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{F}$, relative humidit: $17 \pm 1\%$).

Tohum ve vejetatif dokuların kriyoprezervasyonu sürecinde dehidratasyon için başlıca iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlar; (i) Laminar hava akımlı kabinde dehidratasyon ve (ii) silika jel ile

dehidratasyondur. Laminar hava akımlı kabinde dehidratasyon yönteminde soğuşa alıştırma ve sukroz ön kültür aşamasından sonra eksplantlar steril petri kabına alınarak kriyoprezervasyon esnasında hücre için ölümcül olabilecek fazla suyun uzaklaştırılması yapılmış olmaktadır. Aktif silika jel kullanılarak da aynı şekilde hücre içinde ölümcül buz oluşumuna neden olacak suyun fazlası hücreden uzaklaştırılmaktadır (Gonzales-Arno ve Engelmann, 2006).

2.4.2.4. Enkapsülasyon-dehidratasyon

Bu teknikte dehidratasyon ile sentetik tohum teknolojisi birleştirilmiştir (Redenbaugh ve ark., 1986). Enkapsülasyon-dehidratasyon tekniği vitrifikasyon protokollerine benzese de enkapsüle edilmiş eksplantların desikasyona bırakılması ile vitrifikasyondan ayrılmaktadır. Tekniğin aşamaları (i) ön kültürleme, (ii) enkapsülasyon, (iii) ozmokoruma, (iv) dehidratasyon ve (v) sıvı azota aktarmadan oluşmaktadır. Teknik ilk olarak armut ile patates sürgün uçlarının kriyoprezervasyonunda kullanılmıştır. Çalışmada enkapsüle edilen eksplantlar, yüksek derişimli sukroz içeren sıvı veya katı besiyerinde kültüre alınmış ve dehidrate edilerek sıvı azota aktarılmışlardır. Enkapsülasyon sırasında eksplantların canlılıklarını sürdürebilecekleri en düşük nem içeriğine kadar desikasyonunun yapılması oldukça önemlidir (Fabre ve Dereuddre, 1990). Desikasyon işlemi ile hücre içi su içeriği oldukça azalacağından dolayı hücrede ölümcül buz oluşumu engellenmekte ve eksplantların sıvı azota aktarımı ile başarılı şekilde vitrifikasyon gerçekleşmektedir (Engelmann, 1997). Meristem veya embriyolar, dondurma işleminden önce yüksek sukroz içeren besiyerinde ön kültürlenmekte ve dehidrate edildikten sonra enkapsüle edilerek korunmaktadır (Blakesley ve ark., 1996). Enkapsülasyon-dehidratasyon tekniği kullanılarak okalüptüs (Poissonnier ve ark., 2002), üzüm (Plessis ve ark., 1991), armut ve havuçta (Dereuddre ve ark., 1991) başarılı sonuçlar alınmıştır.

Tekniğin uygulanması sırasında soğuşa alıştırma ve önkültürleme süreçlerinin doğru şekilde yapılması çok önemlidir. Alt kültürlerden gelen materyalde meristem su içeriğinin yüksek olduğu ve kriyoprezervasyon sonrası canlılık ile eksplant su içeriğinin ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ön koşullandırmada soğuk şartlarda alt kültürleme sıklıkla başvurulan bir yöntemdir (Zhao ve ark., 2001). Yüksek sukroz konsantrasyonunda kültürleme de uygulanan diğer bir yöntemdir (Grospecht ve ark., 1999).

Enkapsülasyon, bitkisel materyalin genellikle %3'lük sodyum aljinatla kaplanarak ve 100 mM CaCl₂ içeren MS ortamında polimerizasyonu sağlanarak desikasyona karşı eksplantlar korumaya sahip olmaktadır (Gonzales-Arno ve Engelmann, 2006).

Ozmokoruma sürecinde sentetik tohumlar desikasyon ve kriyoprezervasyon öncesinde yüksek sukroz derişimlerinde kültürlenmektedirler. Çalışmalar sonucunda sentetik tohumların 0,50-0,75 M sukroz içeren sıvı besiyerinde 16-17 saat kültürlenebildiklerini göstermiştir (Gonzales-Arno ve ark., 1993).

Dehidratasyon aşamasında sentetik tohumlar, yatay akımlı kabinde veya silikajel üzerinde desike edilmektedir. Kabinde yapılan desikasyonda ortamın sıcaklığı ve nem içeriği ile ilgili farklı sonuçlar alınabileceğinden dolayı silika jel üzerinde desikasyon daha çok tercih edilmektedir. Desikasyon işleminde bitki türünden türüne değişmekle birlikte genellikle sentetik tohumun su içeriğinin yaklaşık %20'ye düşürülmesi ile canlılığın sağlandığı belirlenmiştir (Gonzales-Arno ve Engelmann, 2006).

Bu tekniğin son aşamasında, sentetik tohumlar 1,2 ml'lik polipropilen kriyoviyoller içindeki sıvı azota daldırılmaktadır. Çözme işlemi ise oda sıcaklığında yavaş gerçekleştirilmektedir (Gonzales-Arno ve Engelmann, 2006). Bunun yanında 40 °C su banyosunda 2-3 dakika süreyle çözme işlemi (Matsumoto ve Sakai, 1995) ve tomurcukların rehidrate olmaları için 5-10 dakika sıvı besiyeri ile yıkama işlemi (Reed ve ark., 2006) farklı araştırmacılar tarafından başarı ile

uygulanmıştır. Enkapsülasyon-dehidratasyon türlerinin eksplant tiplerine göre son 10 yıla tekniği ile kriyoprezervasyonu yapılan bitki ait çalışmalar Çizelge 2'de özetlenmiştir. **Çizelge 2.** Enkapsülasyon-dehidratasyon tekniği ile kriyoprezervasyonu yapılan bitkilerle ilgili son 10 yıla ait çalışmalar

Table 2. Works of cryopreserved plant via encapsulation-dehydration technique in the last ten years

Latince İsmi	Eksplant Tipi	Teknik	Referans
<i>Oncidium bifolium</i> Sims.	Tohum ve protokorm	Enkap.-dehid.	Flachsland ve ark., 2006
<i>Saccharum</i> spp.	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Gonzalez-Arnao ve Engelmann, 2006
<i>Rubus</i> spp.	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Gupta ve Reed, 2006
<i>Oryza sativa</i> L. ssp. <i>japonica</i>	Anter	Enkap.-dehid.	Marassi ve ark., 2006
<i>Dioscorea floribunda</i> Mart. & Gal.	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Mandal ve Ahuja-Ghosh, 2007
<i>Prunus avium</i> L.	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Shatnawi ve ark., 2007
<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	Sürgün	Enkap.-dehid.	Yamuna ve ark., 2007
<i>Begonia x erythrophylla</i> J. Neuman	Adventif sürgün	Enkap.-dehid.	Burritt, 2008
<i>Quercus suber</i> L.	Somatik embriyo	Enkap.-dehid.	Fernandes ve ark., 2008
<i>Cocos nucifera</i> L.	Plumula	Enkap.-dehid.	N'Nan ve ark., 2008
<i>Indigofera tinctoria</i> (L.)	Aksillar sürgün	Enkap.-dehid.	Nair ve Reghunath, 2009
<i>Lilium ledebourii</i> (Baker) Bioss.	Tohum		
<i>Melia azedarach</i> L.	Embriyonik eksen	Enkap.-dehid.	Kaviani, 2010
<i>Camellia sinensis</i> L.	Embriyonik eksen		
<i>Fraxinus excelsior</i> L.	Embriyogenik kallus	Enkap.- dehid.	Özüdoğru ve ark., 2010
<i>Saccharum</i> spp.	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Barroco ve ark., 2011
<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Feng ve ark., 2011
<i>Phalaenopsis bellina</i> (Rchb.f.) Christenson	Protokorm	Enkap.-dehid.	Khoddamzadeh ve ark., 2011
<i>Chrysanthemum x morifolium</i> Ramat	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Martin ve ark., 2011
<i>Picrorhiza kurrooa</i>	Mikrosürgün	Enkapsülasyon	Mishra ve ark., 2011
<i>Dendrobium sonia</i> -17	Protokorm	Enkap.-dehid.	Subramaniam ve ark., 2011
<i>Dendrobium</i> Bobby Messina	Protokorm	Enkap.-dehid.	Zainuddin ve ark., 2011
<i>Rabdosia rubescens</i> (Hemsl.) Hara	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Ai ve ark., 2012
<i>Dendrobium nobile</i> Lindl.	Protokorm	Enkap.-dehid.	Mohanty ve ark., 2012
<i>Morus alba</i> L.	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Padro ve ark., 2012
<i>Teucrium polium</i> L.	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Rabba'a ve ark., 2012
<i>Artemisia herba-alba</i> Asso.	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Sharaf ve ark., 2012
<i>Malus x domestica</i> Borkh.	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Feng ve ark., 2013
<i>Eucalyptus</i> spp.	Sürgün ucu	Enkap.- dehid.	Kaya ve ark., 2013
<i>Rosa chinensis</i>	Tomurcuk	Enkap.-dehid.	Le Bras ve ark., 2014

2.4.2.5. Vitrifikasyon

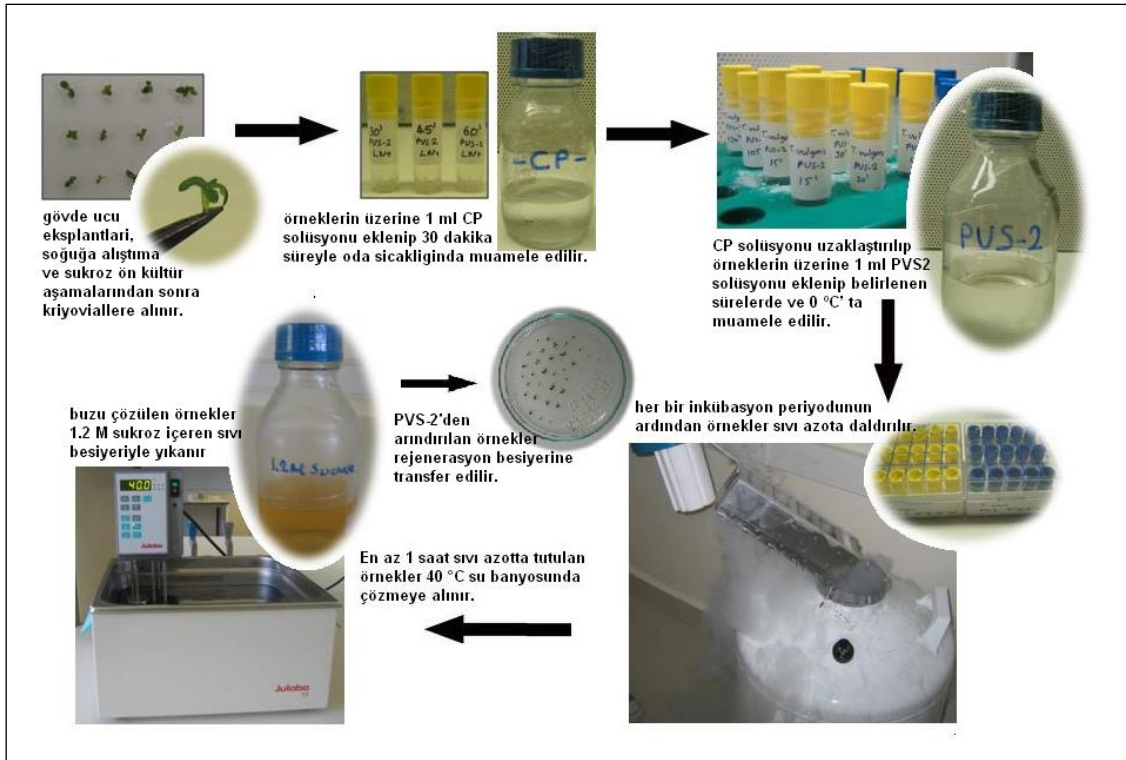
Vitrifikasyon tekniği ön koşullandırma, ozmokoruma, sıvı azota batırma ve çözme işlemlerinden oluşmaktadır. Bitkisel materyal normal kültür koşullarında uygun derişimdeki sukroz çözeltisinde ön kültürlenmektedir. Sukroz derişimi, bitki türüne ve kullanılan eksplant tipine (güvde ucu, nodal tomurcuk vb.) göre değişiklik göstermektedir. Ayrıca, ön

kültürleme aşaması bitkilerin otsu veya odunsu olmasına göre de farklılık göstermektedir. Örneğin elma ve armut gibi odunsu bitkilerde +4 ile +5 °C'de 3 haftalık ön kültür süreci canlılığı arttırmıştır (Niino ve ark., 1992 a,b). Ön kültür aşamasında sukroz dışında diğer bazı kimyasalların kullanımı da mümkündür. *Ribes*'te 1 haftalık soğuğa alıştırma sürecini takiben %5 DMSO ile 2 gün

yapılan ön kültürlenme sonucu iyi şekilde canlılık elde edilmiştir (Luo ve Reed, 1997). Otsu bitkilerde ise ön kültürlenme sürecinde ozmotik aktif şekerler sıklıkla kullanılmaktadır (Dereuddre ve ark., 1988). Ön kültür sürecinde şeker ve şeker alkollerinin kullanımının kriyokoruyucuların hücre içinde birikimini teşvik ettiği ve membran kararlılığını arttırdığı belirlenmiştir (Crowe ve ark., 1984 a,b).

Ön koşullandırmayı takiben eksplantlar, LS çözeltileri ile 20-30 dakika ozmokorumaya tabi tutulmaktadır. Bu aşamada vitrifikasyon çözeltilerinin neden olabileceği hücre hasarının engellenmesi ve dokuların

dehidratasyona karşı dirençlerinin artması beklenmektedir. Dehidratasyon aşamasında LS çözeltilerinden arındırılan eksplantlar farklı süre ve sıcaklıklarda (0 °C-25 °C) 1-2 ml PVS2 gibi vitrifikasyon çözeltisi ile muamele edilmektedirler (Şekil 3). Kriyokoruyucuların toksik etkileri nedeni ile vitrifikasyon çözeltilerinin eksplantlara uygulama süresinin çok iyi optimize edilmesi gerekmektedir. En uygun etkileşim süresi eksplantları sıvı azota girmeden vitrifiye edebilmeli ve çözme işleminden sonra canlılık elde edilebilmelidir (Matsumoto ve ark., 1994).



Şekil 3. Vitrifikasyon tekniğinin uygulanması (Özüdoğru ve ark., 2011a).

Figure 3. Application of vitrification technique

Kriyoprezervasyon, polipropilen kriyoviyollerde örneklerin doğrudan sıvı azota aktarılması ile son bulmaktadır. Sıvı azotta en az 24 saat süre ile bekletilen örnekler çözme aşamasında 1-2 dakika 40 °C su banyosunda yapılmaktadır. Çözme sürecinde dokuların vitrifiye olma ihtimaline karşı çözme hızının iyi optimize edilmesi gerekmektedir. PVS2'nin dokulardan dışarı çıkması için eksplantlar, 1,2 M sukroz içeren çözeltide yıkanarak

rejenerasyon besiyerine aktarılmaktadır. Rejenerasyon besiyeri içeriği, canlılığı etkileyen diğer önemli bir faktördür. Aktif kömür kullanımı (Scrijmakers ve van Iren, 1995) veya amonyum iyonu içermeyen besiyeri kullanımı (Kuriyama ve ark., 1989) canlılığı olumlu etkilemektedir. Vitrifikasyon tekniği ile kriyoprezervasyonu yapılan bitki türlerinin eksplant tiplerine göre son 10 yıla ait çalışmalar Çizelge 3'de özetlenmiştir.

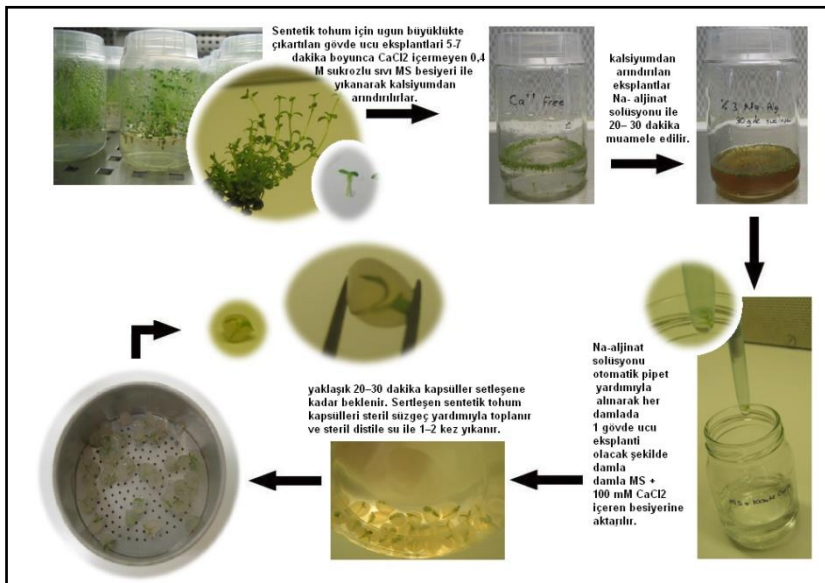
Çizelge 3. Vitrifikasyon tekniği ile kriyoprezervasyonu yapılan bitkilere ait son 10 yılın çalışmaları
Table 3. Works of cryopreserved plant via vitrification technique in the last ten years

Latince İsmi	Eksplant Tipi	Teknik	Referans
<i>Rubus</i> spp.	Sürgün ucu	Vitrifikasyon	Gupta ve Reed, 2006
<i>Prunus avium</i> L.	Sürgün ucu	Vitrifikasyon	Shatnawi ve ark., 2007
<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	Sürgün	Vitrifikasyon	Yamuna ve ark., 2007
<i>Rubus</i> sp.	Sürgün ucu	Vitrifikasyon	Uchendu ve ark., 2010
<i>Lilium</i> spp.	Apikal meristem	Vitrifikasyon	Chen ve ark., 2011
<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam	Sürgün ucu	Vitrifikasyon	Feng ve ark., 2011
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Sürgün ucu	Vitrifikasyon	Hirai, 2011
<i>Sequoia sempervirens</i> (D. Don) Endl.	Apikal ve bazal tomurcuk	Vitrifikasyon	Özüdoğru ve ark., 2011b
<i>Thymus cariensis</i> Hub.-Mor. & Jalas	Sürgün ucu	Vitrifikasyon	Özüdoğru ve Kaya, 2012
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Sürgün ucu	Vitrifikasyon	Padro ve ark., 2012
<i>Morus alba</i> L.	Sürgün ucu	Vitrifikasyon	Rabba'a ve ark., 2012
<i>Teucrium polium</i> L.	Sürgün ucu	Vitrifikasyon	Guzman-Garcia ve ark., 2013
<i>Persea americana</i> Mill.	Embriyogenik kallus	Vitrifikasyon	Çelebi-Toprak ve ark., 2015
<i>Vitis</i> spp.	Sürgün ucu	Vitrifikasyon	

2.4.2.6. Enkapsülasyon-vitrifikasyon

Enkapsülasyon-vitrifikasyon yöntemi, enkapsülasyon ve PVS2 vitrifikasyon tekniklerinin avantajları birleştirmek amacı ile geliştirilmiştir (Matsumoto ve Sakai, 1995). Yöntemde, soğuğa alıştırılan ve ozmotik aktif şekerle ön kültürü yapılan eksplantlar, %2 veya %3'lük sodyum aljinat içeren besiyerinde enkapsüle edilmekte (Şekil 4) ve PVS2 ile inkübe edilmektedir (Fabre ve Dereudde,

1990). Enkapsülasyon-vitrifikasyon yöntemi, deniz lavantası (Matsumoto ve ark., 1998), nane (Hirai ve Sakai, 1999a), patates (Hirai ve Sakai, 1999b), büyük kantaron (Tanaka ve ark., 2004) ve çilek (Hirai ve ark., 1998) gibi farklı bitkilerin kriyoprezervasyonunda başarı ile kullanılmıştır. Enkapsülasyon-vitrifikasyon tekniği ile kriyoprezervasyonu yapılan bitki türlerinin eksplant tiplerine göre son 10 yıla ait çalışmalar Çizelge 4'de özetlenmiştir.



Şekil 4. Sentetik tohum protokolü (Özüdoğru ve ark, 2011a).

Figure 4. Protocol of Synthetic seed.

Çizelge 4. Enkapsülasyon-vitrifikasyon tekniği ile kriyoprezervasyonu yapılan bitkilerle ilgili son 10 yıla ait çalışmalar

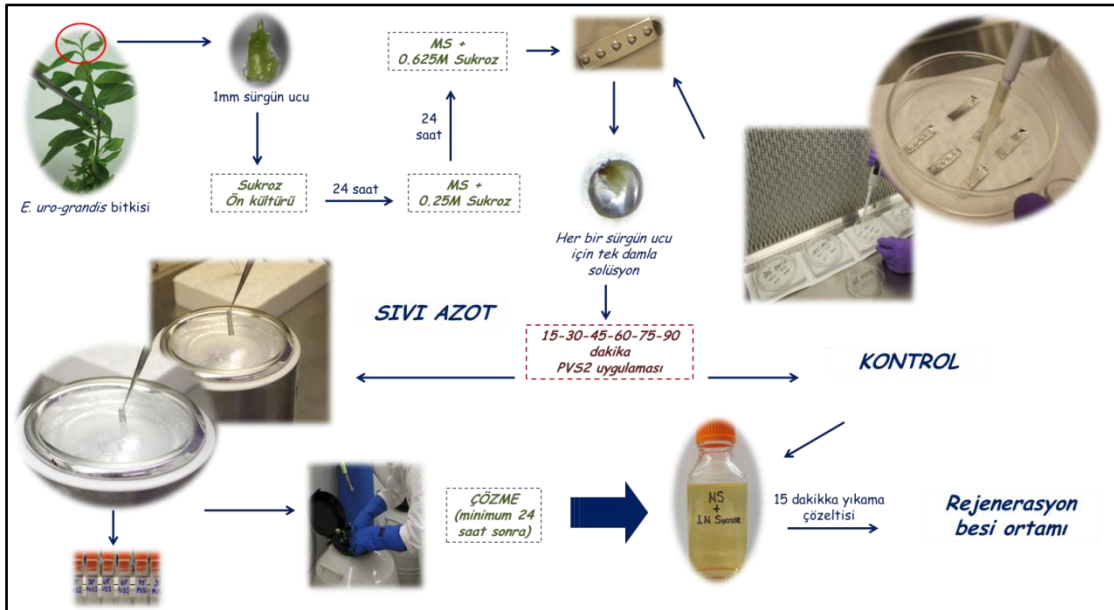
Table 4. Works of cryopreserved plant via encapsulation-vitrification technique in the last ten years

Latince İsmi	Eksplant Tipi	Teknik	Referans
<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	Sürgün ucu	Enkap.-vitri.	Halmagyi ve Deliu, 2007
<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	Sürgün	Enkap.-vitri.	Yamuna ve ark., 2007
<i>Dendrobium candidum</i> Wall. ex Lindl.	Protokorm	Enkap.-vitri.	Yin ve Hong, 2009
<i>Dioscorea bulbifera</i> L.	Embriyogenik kallus	Enkap.-vitri.	Ming-Hua ve Sen-Rong, 2010
<i>Fraxinus excelsior</i> L.	Embriyogenik kallus	Enkap.-vitri.	Özüdoğru ve ark., 2010
<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam	Sürgün ucu	Enkap.-vitri.	Feng ve ark., 2011
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Sürgün ucu	Enkap.-vitri.	Hirai, 2011
<i>Sequoia sempervirens</i> (D. Don) Endl.	Apikal ve bazal tomurcuk	Enkap.-vitri.	Özüdoğru ve ark., 2011b
<i>Dendrobium nobile</i> Lindl.	Protokorm	Enkap.-vitri.	Mohanty ve ark., 2012
<i>Thymus cariensis</i> Hub.-Mor. & Jalas	Sürgün ucu	Enkap.-vitri.	Özüdoğru ve Kaya, 2012
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Sürgün ucu	Enkap.-vitri.	Özüdoğru ve Kaya, 2012
<i>Artemisia herba-alba</i> Asso.	Sürgün ucu	Enkap.-vitri.	Sharaf ve ark., 2012

2.4.2.7. Damlacık dondurma tekniği

Damlacık dondurma tekniği, eksplantların alüminyum folyo şeritler üzerinde PVS2 veya DMSO ile farklı sürelerde inkübasyonu sonrasında hızlı şekilde dondurulması temeline dayanmaktadır (Şekil 5). İlk olarak patates gövde ucu

eksplantlarının kriyoprezervasyonunda kriyokoruyucu olarak DMSO kullanılarak teknik uygulanmıştır (Schafer-Menhur ve ark., 1997). Muzda kriyokoruyucu olarak PVS2'nin kullanıldığı bir diğer çalışmada başarılı sonuçlar alınmıştır (Panis ve ark., 2005).



Şekil 5. Damlacık dondurma tekniğinin uygulanması (Kaya ve ark., 2013)

Figure 5. Application of droplet vitrification technique

Son yıllarda kriyoprezervasyonda sıklıkla kullanılan bu tekniğin temeli vitrifikasyona dayanmaktadır. Ancak diğer vitrifikasyon sürecinden ayrılan en önemli fark, bu teknikte eksplantların 3-5 mm x 10-15 mm alüminyum folyo şeritler üzerinde bulunan yaklaşık 4 µl PVS2 damlacıkların içine yerleştirilmesidir. Eksplantlar, 25°C veya 0°C' de belirli sürede dehidrate edildikten sonra folyolar sıvı azot ile soğutulmuş kriyoviallerin içine aktarılmaktadır ve kriyovialler sıvı azot tankına daldırılarak kriyoprezervasyon tamamlanmaktadır. Çözme işlemi, 1,2 M

sukroz içeren sıvı besiyerinde 25 °C'de çok hızlı şekilde gerçekleştirilmekte ve akabinde eksplantlar rejenerasyon için besiyerine aktarılmaktadır. Damlacık dondurma ve vitrifikasyon tekniğinin en önemli özelliği farklı genotiplere sahip bitkilere uygulanabilmesidir (Sakai ve Engelmann, 2007; Sakai ve ark., 2008). Damlacık dondurma tekniği ile kriyoprezervasyonu yapılan bitki türlerinin eksplant tiplerine göre son 10 yıla ait çalışmalar Çizelge 5'de özetlenmiştir.

Çizelge 5. Damlacık dondurma tekniği ile kriyoprezervasyonu yapılan bitkilerle ilgili son 10 yıla ait çalışmalar

Table 5. Works of cryopreserved plant via droplet vitrification technique in the last ten years

Latince İsmi	Eksplant Tipi	Teknik	Referans
<i>Rosa x hybrida</i> L.	Sürgün ucu	Damlacık D.	Halmagyi ve Pinker, 2006
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Sürgün ucu	Damlacık D.	Yoon ve ark., 2006
<i>Pelargonium</i> spp.	Gövde ucu	Damlacık D.	Gallard ve ark., 2008
<i>Colocasia esculenta</i> var. <i>esculenta</i> (L.) Schott	Sürgün ucu	Damlacık D.	Sant ve ark., 2008
<i>Dendranthema grandiflora</i> T.	Sürgün ucu	Damlacık D.	Kim ve ark., 2009
<i>Allium sativum</i> L.			
<i>Rubia akane</i> Nakai	Kök tüyü	Damlacık D.	Kim ve ark., 2010
<i>Thymus moroderi</i> Pau ex Martínez	Sürgün ucu	Damlacık D.	Marco-Medina ve ark., 2010
<i>Saccharum</i> spp.	Sürgün ucu	Damlacık D.	Barroco ve ark., 2011
<i>Lilium</i> spp.	Apikal meristem	Damlacık D.	Chen ve ark., 2011
<i>Malus domestica</i> Borkh.	Aksillar tomucuk	Damlacık D.	Condello ve ark., 2011
<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam	Sürgün ucu	Damlacık D.	Feng ve ark., 2011
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Sürgün ucu	Damlacık D. - Jel matriks DM	Hirai, 2011
<i>Sequoia sempervirens</i> (D. Don) Endl.	Apikal ve bazal tomurcuk	Damlacık D.	Özüdoğru ve ark., 2011b
<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	Sürgün ucu	Kriyo-plate	Sekizawa ve ark., 2011
<i>Rubus fruticosus</i> L.			
<i>Prunus cerasifera</i> Ehrh.	Apikal sürgün ucu	Damlacık D.	Vujovic ve ark., 2011
<i>Thymus cariensis</i> Hub.-Mor. & J alas	Sürgün ucu	Damlacık D.	Özüdoğru ve Kaya, 2012
<i>Thymus vulgaris</i> L.			
<i>Persea americana</i> Mill.	Embriyogenik kallus	Damlacık D.	Guzman-Garcia ve ark., 2013
<i>Rubia akane</i> Nakai	Kök tüyü	Damlacık D.	Yi ve ark., 2012
<i>Eucalyptus</i> spp.	Sürgün ucu	Damlacık D.	Kaya ve ark., 2013
<i>Galanthus elwesii</i> Hook.	Apikal meristem	Damlacık D.	Maslanka ve ark., 2013
<i>Nandina domestica</i>	Sürgün ucu	Damlacık D.	Özüdoğru ve ark., 2013
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Sürgün ucu	Damlacık D.	Wang ve ark., 2014
<i>Lilium</i> spp.	Sürgün ucu	Damlacık D.	Yin ve ark., 2014
<i>Rosa chinensis</i>	Tomurcuk	Damlacık D.	Le Bras ve ark., 2014
<i>Rosa</i> spp.	Sürgün ucu	Damlacık D.	Pawlovska ve Szewczyk-

3. Moleküler Tekniklerle Genetik Kararlılığın Belirlenmesi

Bitkiler arasındaki akrabalık derecelerinin belirlenmesi amacı ile modern biyoteknolojik yaklaşımların kullanımı, bitki koruma programlarında önemli bir yere sahiptir. Son yıllarda genetik kararlılığın belirlenmesi amacı ile çeşitli moleküler markör teknikleri geliştirilmiştir. Moleküler belirteçler kullanılarak yapılan genetik yapı ve çeşitlilik analizleri, ayrı coğrafik bölgelerdeki populasyonlar arasındaki genetik benzerlik derecelerinin, yakın akraba populasyonları arasındaki genetik varyasyonların ve bir kültür ortamında türün korunması için hangi kaynaklardan yararlanılabileceğinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Dittbrenner ve ark., 2005). Muhafaza altına alınmış germplazmın genetik kararlılığı, protein markörleri veya DNA (moleküler) markörleri ile belirlenebilmektedir (Paunescu, 2009). Moleküler markör teknikleri üç kategoride toplamak mümkündür. Bunlar: (i) herhangi bir özelliğe bakmaksızın genotipi belirleyen teknikler, (ii) belirli bir özellik ile ilgili DNA sekansını belirleyen teknikler ve (iii) ilgili geni karakterize eden tekniklerdir. Southern blot, restriksiyon fragmentlerindeki farklılıkları ortaya çıkarmakta ve RFLP tekniği ile belirlenen polimorfizm, tek veya çoklu lokuslar kullanılarak belirlenmektedir. Ayrıca DNA sekanslama, son yıllarda geliştirilen ve germplazm karakterizasyonunda güvenilir şekilde kullanılan önemli bir tekniktir (Villalobos ve Engelmann, 1995).

DNA temelli moleküler belirteçler pek çok bitki germplazmındaki genetik farklılıkların belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İzoenzim (bir veya birden fazla lokus tarafından kodlanan enzimlerin fonksiyonel olarak benzer fakat ayrılabilen formlarıdır) veya alloenzimlere (Aynı lokusta farklı allellerin ürünüdür) göre daha fazla sayıda belirteç sağladıklarından dolayı bitki araştırmalarında DNA belirteçleri yaygın kullanım alanına sahip olmuşlardır. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD),

Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP), Tek Nükleotit Polimorfizmi (SNP), mikrosatellit temelli markör sistemleri, organel mikrosatellitleri, Dizi Karakterize Bölgeler (SCAR), Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler (CAPS), Dizi İlişkili Çoğaltılma Polimorfizmi (SRAP), Hedef Bölge Çoğaltılma Polimorfizmi (TRAP), Tek Zincir Konformasyonel Polimorfizmi (SSCP), Çoğaltılmış Ara Retrotranspozon Polimorfizmi (IRAP) ve Çoğaltılmış Retrotranspozon-Mikrosatellit Polimorfizmi (REMAP) Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR) temelli markör sistemleri içinde bulunmaktadır (Walton, 1993).

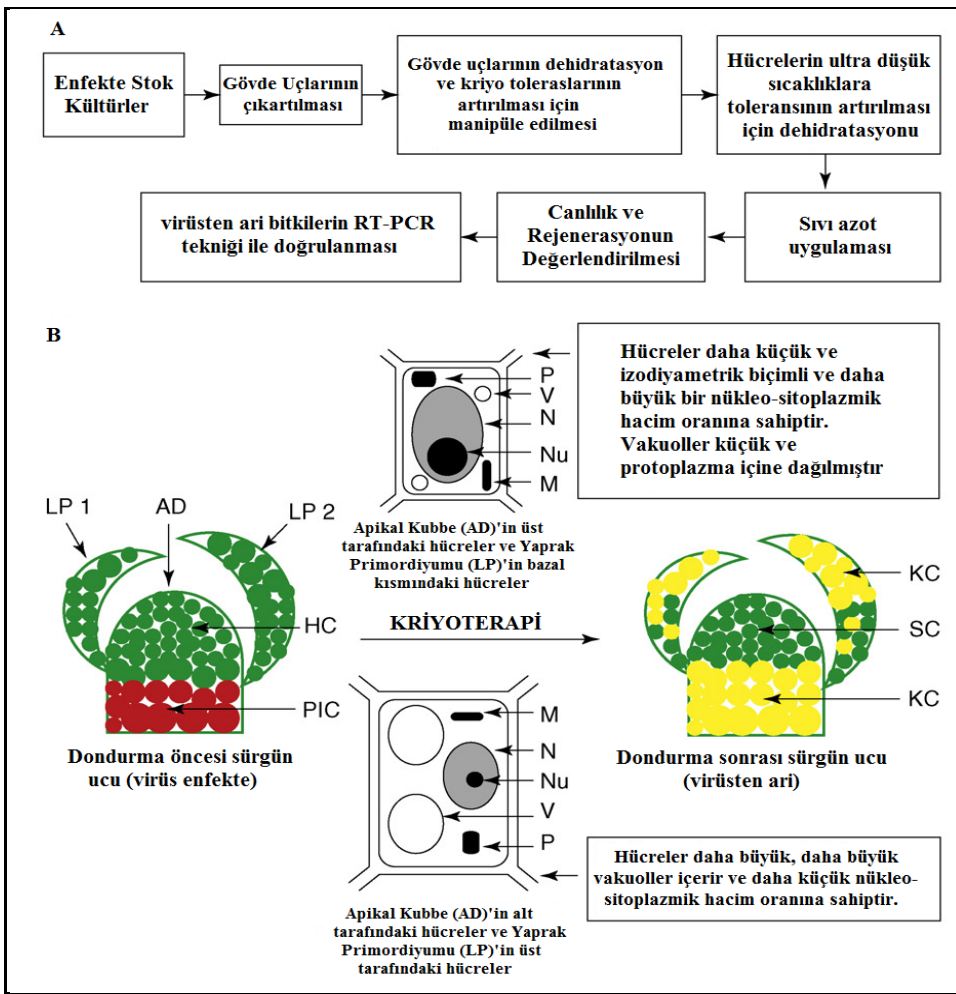
4. Kriyoprezervasyonun Farklı Kullanımları

Kriyoprezervasyon tekniği pek çok türün muhafazasında rutin şekilde uygulanmasının yanı sıra nadir bulunan ya da tehlike altındaki türlerin uzun süreli muhafazasına da olanak tanımaktadır. Elma germplazmına ait 2.200 aksesiyonun dormant tomurcukları da kriyoprezervasyon ile koruma altına alınmıştır. Geliştirme programları çerçevesinde, sıvı nitrojende polenlerin rutin muhafazası da mümkündür. Ayrıca, kriyoprezervasyon, biyoteknolojik ürünlere de uygulanabilmektedir. İngiltere'de farmasötik özelliklere sahip 1.000'den fazla kallus hattı, Kanada'da büyük ölçekli klonal dikim programlarında binlerce konifer embriyonik hücre hatları -196 °C'de muhafaza edilmektedir (Engelmann, 2004).

Kriyoprezervasyon, germplazmın korunmasının yanında farklı diğer kullanım alanlarına da olanak tanımaktadır. Bu kullanımlardan bir olan kriyoseleksiyonda, dondurulmuş populasyonlarda bazı belirli özelliklere sahip örneklerin seleksiyonu yapılmaktadır (Engelmann, 2004). Bitki kriyoprezervasyon tekniğinin yeni bir uygulaması olan kriyoterapi, virüs eliminasyonunda etkin şekilde kullanılmaktadır (Şekil 6). Kriyoprezervasyon protokollerinin uygulandığı ve sıvı nitrojende sürgün uçlarından virüs, fitoplazma ve bakteri gibi bitki patojenleri elemine edilmektedir

(Kaya ve Yılmaz-Gökdoğan, 2015). Düşük sıvı nitrojen sıcaklığında, pek çok virüs meristem kısmını enfekte edemediğinden eksplantların soğutulması ve dondurulması, meristemlerde viral eliminasyonu kolaylaştırmaktadır ve akabinde meristem gibi çok küçük eksplantlardan bile bitkiler geliştirilebilmektedir (Kaczmarczyk ve ark., 2011). Kriyoterapide, meristem kültürü ve termoterapi gibi klasik virüs arındırma tekniklerine tamamlayıcı olarak virüs, fitoplazma ve bakteri gibi bitki patojenleri, sıvı nitrojene direk maruz bırakılmakta ve

enfekte bitkilerin sürgün uçlarından patojenler arındırılmaktadır (Sakai ve Engelman, 2007). Sürgün uçlarının kriyoterapisini takiben yapılan termoterapi, virüs eliminasyonunda başarı ile kullanılmaktadır. Günümüze değin *Citrus* türleri, *Prunus* türleri, *Rubus idaeus*, muz, üzüm, patates ve tatlı patateste kriyoterapi uygulanarak pek çok bitkinin patojenlerden arındırılması gerçekleştirilmiştir (Engelman, 2011).



Şekil 6. Virüs ile enfekte bitkiye ait sürgün ucundan, kriyoterapi yöntemiyle virüs eliminasyonu. **A.** Yötem uygulama aşamaları, **B.** Apikal bölgede bulunan hücrelerin ve primordiyal yaprak kısımlarına ait hücrelerin anatomik özelliklerinin şematik olarak gösterilmesi. Kısaltmalar; AD, Apikal kubbe; HC, sağlıklı hücreler; KC, ölü hücreler; M, mitokondri; N, nükleus; P, proplastid; PIC, virüs enfekte hücreler; SC, canlı hücreler; V, vakuol (Wang ve Valkonen, 2009).

Figure 6. Virus eradication from shoot tip of virus infected plant via cryotherapy technique. **A.** Protocol application steps, **B.** schematic demonstration of apical shoot tip cells and leaf primordium sides. abbreviations; AD, Apical Doom; HC, Healty Cells; KC, Dead Cells; M, mitochondria; N; nucleus; P, proplastide; PIC, virus infected cells; SC, survived cells; V, vacuole (Wang ve Valkonen, 2009).

Sonuç

Son yıllarda biyoteknoloji alanındaki hızlı ilerlemeler biyoçeşitliliğinin korunması amacı ile yeni muhafaza metotlarının geliştirilmesine olanak tanımıştır. *In vitro* kültür tekniklerinin kullanıldığı koruma stratejilerinde bitkilerin hücre, kallus, tohum, polen, embriyo, meristem ve sürgün uçları başarı ile kısa, orta ve uzun sürelerde muhafaza edilebilmiştir. Uzun süreli muhafaza için kriyoprezervasyon tekniği kullanılarak pek çok bitki türü, çeşidi ve hatta genotiplerine ait germplazmalarının küçük alanlarda sonsuz şekilde korunması mümkün hale gelmiştir. Tekniğin ilk kullanıldığı yıllarda karmaşık prosedürlerin ve pahalı cihazların kullanımı söz konusu iken bu alanda yaşanan

hızlı gelişmelerle temeli vitrifikasyona dayanan yöntemlerle teknik, daha kolay ve hızlı uygulanabilir olmuştur. Kriyobanklarda oluşturulmaya başlanan bitki koleksiyonları ile bitki genetik kaynakları iyi bir biçimde korunmaktadır. Son yıllarda kriyoprezervasyonun kullanıldığı diğer yaklaşımlar olan kriyoseleksiyonda istenen ve belirli özelliğe sahip örneklerin seleksiyonu yapılmakta ve kriyoterapi ile çeşitli bitkilerden hedef bitki patojenlerinin eliminasyonu başarı ile uygulanmaktadır. Sonuç olarak, bu derleme çalışmasının, gelecekte ülkemizdeki bitki biyoçeşitliliğinin korunması, tohum ve kriyo bankaların oluşturulmasına ve de geliştirilmesine yönelik yapılacak olan çalışmalara ışık tutabileceği öngörülmektedir.

Kaynaklar

- Abdelnour-Esquivel A, Villalobos V, Engelmann F, 1992. Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea* spp. *CryoLetters*, 13: 297–302.
- Ai P-F, Lu L-P, Song J-J, 2012. Cryopreservation of in vitro-grown shoot-tips of *Rabdosia rubescens* by encapsulation-dehydration and evaluation of their genetic stability. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 108: 381-387.
- Akdemir H, Kaya E, Özden Y, 2010. In vitro proliferation and minimum growth storage of fraser photinia: Influences of different medium, sugar combinations and culture vessels. *Scientia Horticulturae*, 126: 268-275.
- Barroco G, Sylvestre I, Engelmann F, 2011. Comparing encapsulation-dehydration and droplet-vitrification for cryopreservation of sugarcane (*Saccharum* spp.) shoot tips. *Scientia Horticulturae*, 130: 320-324.
- Benson EE, 1999. An introduction to plant conservation biotechnology. (Ed. E.E. Benson), *Plant Conservation Biotechnology*, Taylor & Francis, London, 3-39.
- Benson EE, 2004. Cryoconserving algal and plant diversity: Historical perspectives and future challenges. (Ed. B. Fuller, N. Lane, E.E. Benson), *Life in the Frozen State*, CRC Press, London, 299-328.
- Blakesley D, Pask N, Henshaw GG, Fay MF, 1996. Biotechnology and the conservation of forest genetic resources: in vitro strategies and cryopreservation. *Plant Growth Regulation*, 20: 11-16.
- Bournman CH, 1994. Micropropagation and Somatic embryogenesis. (Ed. M.D. Hayward, N.O. Bosemark, I. Romgaso), *Plant Breeding; Principles and Prospects*, Chapman and Hall, London, 246-260.
- Bravo LA, Zuniga GE, Alberdi M, Corcuera LJ, 1998. The role of ABA in freezing tolerance and cold acclimation. *Physiologia Plantarum*, 103: 12-23.
- Brison M, de Boucaud MT, Dosba F, 1995. Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of two interspecific *Prunus* rootstocks. *Plant Sci*, 105: 235-242.
- Burke MJ, 1986. The glassy state and survival of anhydrous biological systems. (Ed. A.C. Leopold), *Membrane, Metabolism and Dry Organisms*, Cornell Univ. Press, Ithaca, NY, 358-364.
- Burritt DJ, 2008. Efficient cryopreservation of adventitious shoots of *Begonia x erythrophylla* using encapsulation–dehydration requires pretreatment with

- both ABA and proline. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 95: 209-215.
- Charoensub R, Phansiri S, Sakai A, Yongmanitchai W, 2004. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of cassava. *CryoLetters*, 25 (1): 51-58.
- Chen X-L, Li J-H, Xin X, Zhang Z-E, Xin P-P, Lu X-X, 2011. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. *South African Journal of Botany*, 77: 397-403.
- Condello E, Caboni E, Andrè E, Piette B, Druart P, Swennen R, Panis B, 2011. Cryopreservation of apple *in vitro* axillary buds using droplet-vitrification. *CryoLetters*, 32 (2): 175-185.
- Crowe JH, Crowe LF, Chapman D, 1984a. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. *Science*, 233: 701-703.
- Crowe JH, Crowe LF, Chapman D, 1984b. Infrared spectroscopic studies on interactions of water and carbohydrates with a biological membrane. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 232: 400-407.
- Cruz-Cruz CA, Gonzalez-Arno MT, Engelmann F, 2013. Biotechnology and conservation of plant diversity. *Resources*, 2: 73-95.
- Çelebi-Toprak F, Kayhan F, Alan AR, 2015. Türkiye’de Ticari Önemi Yüksek Bazı Üzüm (*Vitis*) Çeşitleri ve Anaçlarında Kriyoprezervasyon Tekniğinin Uygulanması. I. Ulusal Bitki Fizyolojisi Sempozyumu, Erzurum, Türkiye, 1: 104.
- Dağcı EK, İzmirli M, Dığrak M, 2002. Kahramanmaraş İlinde Yetişen Bazı Ağaç Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması. *KSU Fen ve Mühendislik Dergisi*, 5 (1): 38-46.
- Dülger B, Gücin F, Malyer H, Bıçakçı A, 1997. Antimicrobial Activity of Marigold (*Tagetes minuta* L.). *Acta Pharmaceutica Turcica*, 39 (3): 115-119.
- Dereuddre J, Fabre J, Bassaglia C, 1988. Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var. Eolo) apical and axillary shoot tips excised from different aged *in vitro* plantlets. *Plant Cell Reports*, 7: 170-173.
- 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. *CryoLetters*, 12: 125-134.
- Duarte Souza FV, Kaya E, de Jesus Vieira L, de Souza EH, de Oliveira Amorim VB, Skogerboe D, Matsumoto T, Alves AAC, da Silva Ledo CA, Jenderek MM, 2016. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 124: 351-360.
- Dittbrenner A, Hensen I, Wesche K, 2005. Genetic structure and random amplified polymorphic DNA diversity of the rapidly declining *Angelica palustris* (*Apiaceae*) in Eastern Germany in relation to population size and seed production. *Plant Species Biology*, 20: 191-200.
- Dussert S, Engelmann F, Chabrillange N, Anthony F, Noirot M, Hamon S, 1997. *In vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.) germplasm. (Ed. M.K. Razdan & E.C. Cocking), *Conservation of Plant Genetic Resources In vitro*, Vol. 1, Science Publishers, Inc., New Hampshire, USA, 287-305.
- Engelmann F, 1997. *In vitro* conservation methods. (Ed. B.V. Ford-Lloyd, J.H. Newbury, J.A. Callow), *Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use*, CAB International, Wellingford, 119-162.
- Engelmann F, 2004. Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40: 427-433.
- Engelmann F, 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47: 5-16.
- Fabre J, Dereuddre J, 1990. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *CryoLetters*, 11: 413-426.

- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT, 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21: 407-426.
- Faisal M, Ahmad N, Anis M, 2006. In vitro plant regeneration from alginate-encapsulated microcuttings of *Rauvolfia tatarphylla* L.. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 1 (1): 01-06.
- Feng C-H, Cui Z-H, Li B-Q, Chen L, Ma Y-L, Zhao Y-H, Wang Q-C, 2011. Cryopreservation of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) and its pathogen eradication by cryotherapy. *Biotechnology Advances*, 29 (1): 84-93.
- Feng C-H, Cui Z-H, Li B-Q, Chen L, Ma Y-L, Zhao Y-H, Wang Q-C, 2013. Duration of sucrose preculture is critical for shoot regrowth of in vitro-grown apple shoot-tips cryopreserved by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 112: 369-378.
- Fernandes P, Rodriguez E, Pinto G, Roldán-Ruiz I, De Loose M, Santos C, 2008. Cryopreservation of *Quercus suber* somatic embryos by encapsulation-dehydration and evaluation of genetic stability. *Tree Physiology*, 28: 1841-1850.
- Flachsland E, Terada G, Scocchi A, Rey H, Mroginski L, Engelmann F, 2006. Cryopreservation of seeds and in vitro-cultured protocorms of *Oncidium bifolium* Sims. (*Orchidaceae*) by encapsulation-dehydration. *CryoLetters*, 27(4): 235-242.
- Gallard A, Panis B, Dorion N, Swennen R, Grapin A, 2008. Cryopreservation of *Pelargonium* apices by droplet-vitrification. *CryoLetters*, 29(3): 243-251.
- Gonçalves S, Romano A, 2007. In vitro minimum growth for conservation of *Drosophyllum lusitanicum*. *Biologia Plantarum*, 51 (4): 795-798.
- Gonzalez-Arnao MT, Engelmann F, 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. *CryoLetters*, 27(3): 155-168.
- Gonzalez-Arnao MT, Engelmann F, Huet C, Urra C, 1993. Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedures and histology. *CryoLetters*, 14: 303-308.
- Gonzalez-Benito ME, Clavero-Ramirez I, Lopez-Aranda M, 2004. The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2 (3): 341-351.
- Grospietch M, Stodulkova E, Zamecnik J, 1999. Effect of osmotic stress on the dehydration tolerance and cryopreservation of *Solanum tuberosum* shoot tips. *CryoLetters*, 20: 339-346.
- Gupta S, Reed BM, 2006. Cryopreservation of shoot tips of blackberry and raspberry by encapsulation-dehydration and vitrification. *CryoLetters*, 27(1): 29-42.
- Guzman-Garcia E, Bradai F, Sanchez-Romero C, 2013. Cryopreservation of avocado embryogenic cultures using the droplet-vitrification method. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35: 183-193.
- Gürel E, 1997. Plant tissue culture techniques and types of *in vitro* development occurring in cultures. *Kızılırmak Fen Bilimleri Kongresi, Kırklareli Üniversitesi*, 14-16 Mayıs 1997, 23-36.
- Gürel E, Uçar-Türker A, 2001. Organogenesis. (Ed. M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan), *Bitki Biyoteknolojisi I-Doku Kültürü ve Uygulamaları*, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 36-70.
- Halmagyi A, Deliu C, 2007. Cryopreservation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot tips by encapsulation-vitrification. *Scientia Horticulturae*, 113: 300-306.
- Halmagyi A, Pinker I, 2006. Plant regeneration from *Rosa* shoot tips cryopreserved by a combined droplet vitrification method. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84: 145-153.
- Hirai D, 2011. Gelled droplet vitrification improves recovery of cryopreserved potato germplasm. *CryoLetters*, 32 (4): 287-296.
- Hirai D, Sakai A, 1999a. Cryopreservation of *in vitro*-grown axillary shoot-tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation

- vitrification. *Plant Cell Reports*, 19: 150-155.
- Hirai D, Sakai A, 1999b. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. *Potato Research*, 42: 153-160.
- Hirai D, Shirai K, Shirai S, Sakai A, 1998. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) by encapsulation-vitrification. *Euphytica*, 101: 109-115.
- Kaczmarczyk A, Rokka V-M, Keller ERJ, 2011. Potato shoot tip cryopreservation. a review. *Potato Research*, 54: 45-79.
- Kaviani B, 2010. Cryopreservation by encapsulation-dehydration for long-term storage of some important germplasm: seed of lily [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss.], embryonic axe of persian lilac (*Melia azedarach* L.), and tea (*Camellia sinensis* L.). *Plant Omics Journal*, 3(6): 177-182.
- Kaya E, Alves A, Rodrigues L, Jenderek M, Hernandez-Ellis M, Özüdoğru A, Ellis D, 2013. Cryopreservation of Eucalyptus genetic resources. *CryoLetters*, 34 (6): 608-618.
- Kaya E, Souza FVD, Ceylan M, Jenderek MM, 2016. Conservation of Musa sp Seeds Via Cryopreservation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animl*, 52 (1): 38-38.
- Kaya E, Yılmaz-Gokdogan E, 2015. Virus eradication from plants via novel biotechnological processes: one step freezing methods based on vitrification of cryotherapy techniques. *Mugla Journal of Science and Technology*, 1 (2): 34-40.
- Khoddamzadeh AA, Sinniah UR, Lynch P, Abdul Kadir M, Bin Kadzimin S, Mahmood M, 2011. Cryopreservation of protocorm-like bodies (PLBs) of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) christenson by encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107: 471-481.
- Kim H-H, Lee Y-G, Park S-U, Lee S-C, Baek H-J, Cho E-G, Engelmann F, 2009. Development of alternative loading solutions in droplet-vitrification procedures. *CryoLetters*, 30 (3): 291-299.
- Kim H-H, Popova EV, Yi J-Y, Cho G-T, Park S-U, Lee S-C, Engelmann F, 2010. Cryopreservation of hairy roots of *Rubia akane* (Nakai) using a droplet-vitrification procedure. *CryoLetters*, 31 (6): 473-484.
- Kuriyama A, Watanabe K, Ueno S, Mitsuda H, 1989. Inhibitory effect of ammonium ions on recovery of cryopreserved rice cells. *Plant Science*, 64: 231-235.
- Lambardi M, De Carlo A, 2003. Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. (Ed. S.M. Jain and K. Ishii), *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, Kluwer Ac. Pub., Dordrecht, 815-840.
- Lambardi M, Özüdoğru EA, Previati A, 2009. *In Vitro* Conservation and Cryopreservation of Ornamental Plants. (Ed. S.M. Jain & J. Ochatt), *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants*. Springer, Berlin (*in press*).
- Lamb CJ, Beachy RN, 1989. *Plant Gene Transfer*. (Ed. C.J. Lamb, R.N. Beachy), *Proceedings of a UCLA Symposium*, Utah, April 1-7, Wiley-Liss, New York.
- Le Bras C, Le Besnerais P-H, Hamama L, Grapin A, 2014. Cryopreservation of *ex vitro*-grown *Rosa chinensis* 'Old Blush' buds using droplet-vitrification and encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 116: 235-242.
- Lee SP, Chen THH, Fuchigami LH, 1991. Changes in the translatable RNA population during abscisic acid induced freezing tolerance in bromegrass suspension culture. *Plant and Cell Physiology*, 32: 45-56.
- Lovelock JE, Bishop MWH, 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature (London)*, 183: 1394-1395.
- Luo J, Reed BM, 1997. Abscisic acid-responsive protein, bovine serum albumin, and proline pretreatments improve recovery of *in vitro* currant shoot-tip meristems and callus cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 34: 240-250.
- Maheswari N, Rajyalahsmi K, Baneja K, Dhir SK, Chowdry CN, Maheswari SC, 1995. In

- vitro culture of wheat and genetic transformation. Retrospect and prospect. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14 (2): 149-178.
- Mandal BB, Ahuja-Ghosh S, 2007. Regeneration of *Dioscorea floribunda* plants from cryopreserved encapsulated shoot tips: effect of plant growth regulators. *CryoLetters*, 28 (5): 329-336.
- Marassi MA, Scocchi A, Gonzalez AM, 2006. Pant regeneration from rice anthers cryopreserved by an encapsulation/dehydration technique. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 42: 31-36.
- Marco-Medina A, Casas JL, Swennen R, Panis B, 2010. Cryopreservation of *Thymus moroderi* by droplet vitrification. *CryoLetters*, 31 (1): 14-23.
- Martín C, Cervera MT, González-Benito ME, 2011. Genetic stability analysis of chrysanthemum (*Chrysanthemum x morifolium* Ramat) after different stages of an encapsulation–dehydration cryopreservation protocol. *Journal of Plant Physiology*, 168: 158-166.
- Maślanka M, Panis B, Bach A, 2013. Cryopreservation of *Galanthus elwesii* Hook. apical meristems by droplet vitrification. *CryoLetters*, 34 (1): 1-9.
- Matsumoto T, Sakai A, 1995. An approach to enhance dehydration tolerance of alginate-coated dried meristems cooled to –196°C. *CryoLetters*, 16: 299-306.
- Ming-Hua Y, Sen-Rong H, 2010. A simple cryopreservation protocol of *Dioscorea bulbifera* L. embryogenic calli by encapsulation-vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 101: 349-358.
- Mishra J, Singh M, Palni LMS, Nandi SK, 2011. Assessment of genetic fidelity of encapsulated microshoots of *Picrorhiza kurrooa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104: 181-186.
- Mohanty P, Das MC, Kumaria S, Tandon P, 2012. High-efficiency cryopreservation of the medicinal orchid *Dendrobium nobile* Lindl., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109: 297-305.
- Nair DS, Reghunath BR, 2009. Cryoconservation and regeneration of axillary shoot meristems of *Indigofera tinctoria* (L.) by encapsulation–dehydration technique. In *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant*, 45: 565-573.
- Niino T, Sakai A, Enomoto S, Magoshi J, Kato S, 1992a. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of mulberry by vitrification. *CryoLetters*, 13: 303-312.
- Niino T, Sakai A, Yakuwa H, Nojiri K, 1992b. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28: 261-266.
- Nishizawa S, Sakai A, Amano Y, Matsuzawa T, 1992. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by a simple freezing method. *CryoLetters*, 13: 379-388.
- N’Nan O, Hoher V, Verdeil J-L, Konan J-L, Ballo K, Mondeil F, Malaurie B, 2008. Cryopreservation by encapsulation–dehydration of plumules of coconut (*Cocos nucifera* L.). *CryoLetters*, 29 (4): 339-350.
- Noss RF, 1990. Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. *Conservation Biology*. 4: 355-364.
- Özden-Tokatli Y, De Carlo A, Gumusel F, Pignattelli S, Lambardi M, 2008. Development of encapsulation techniques for the production and conservation of synthetic seeds in ornamental plants. *Propagation of Ornamental Plants*, 8 (1): 17-22.
- Özdoğan EA, Capuana M, Kaya E, Panis B, Lambardi M, 2010. Cryopreservation of *Fraxinus excelsior* L. embryogenic callus by one-step freezing and slow cooling techniques. *CryoLetters*, 31 (1): 63-75.
- Özdoğan A, da Silva DPC, Kaya E, Dradi G, Paiva R, Lambardi M, 2013. In vitro conservation and cryopreservation of *Nandina domestica*, an outdoor ornamental shrub. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41 (2): 638-645.

- Özüdoğru EA, Kaya E, 2012. Cryopreservation of *Thymus cariensis* and *T. vulgaris* shoot tips: comparison of three vitrification-based methods. *CryoLetters*, 33 (5): 363-375.
- Özüdoğru EA, Kaya E, Kirdok E, Issever-Ozturk S, 2011a. In vitro propagation from young and mature explants of thyme (*Thymus vulgaris* and *T. longicaulis*) resulting in genetically stable shoots. *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant*, 47: 309-320.
- Özüdoğru EA, Kirdok E, Kaya E, Capuana M, Benelli C, Engelmann F, 2011b. Cryopreservation of redwood (*Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.) in vitro buds using vitrification-based techniques. *CryoLetters*, 32 (2): 99-110.
- Özüdoğru EA, Kirdok E, Kaya E, Capuana M, De Carlo A, Engelmann F, 2011c. Medium term conservation of redwood (*Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.) in vitro shoot cultures and encapsulated buds. *Scientia Horticulturae*, 127: 431-435.
- Özüdoğru EA, Özden-Tokatlı Y, Gumusel F, Benelli C, Lambardi M, 2009. Development of a cryopreservation procedure for peanut (*Arachis hypogaea* L.) embryonic axes and its application to local Turkish germplasm. *Advances in Horticultural Science*, 23 (1): 41-48.
- Padro MDA, Frattarelli A, Sgueglia A, Condello E, Damiano C, Caboni E, 2012. Cryopreservation of white mulberry (*Morus alba* L.) by encapsulation-dehydration and vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 108: 167-172.
- Panis B, Piette B, Swennen R, 2005. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Science*, 168: 45-55.
- Paunescu A, 2009. Biotechnology for endangered plant conservation: a critical overview. *Romanian Biotechnological Letters*, 14 (1): 4095-4103.
- Pawlowska B, Szewczyk-Taranek B, 2014. Droplet vitrification cryopreservation of *Rosa canina* and *Rosa rubiginosa* using shoot tips from in situ plants. *Scientia Horticulturae*, 168: 151-156.
- Plessis P, Leddet C, Dereuddre J, 1991. Resistance to dehydration and to freezing in liquid nitrogen of alginate coated shoot-tips of grape vine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay). *C R Acad Sci Paris 313 Sér III*: 373-380.
- 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. *CryoLetters*, 14: 309-320.
- Poissonnier M, Monod V, Pâques M, Dereuddre J, 2002. Cryopreservation of Eucalyptus sp. Shoot Tips by the Encapsulation-Dehydration Procedure. (Ed. L.E. Towill, Y.P.S. Bajaj), *Cryopreservation of Plant Germplasm II*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 50: 234-245.
- Previati A, Benelli C, Da Re F, Özüdoğru A, Lambardi M, 2008. Micropropagation and in vitro conservation of virus-free rose germplasm. *Propagation of Ornamental Plants*, 8 (2): 93-98.
- Rai MK, Asthana P, Singh SK, Jaiswal VS, Jaiswal U, 2009. The encapsulation technology in fruit plants- a review. *Biotechnology Advances*, 27: 671-679.
- Rao NK, 2004. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, 3 (2): 136-145.
- Rabba'a MM, Shibli RA, Shatnawi MA, 2012. Cryopreservation of *Teucrium polium* L. shoot-tips by vitrification and encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110: 371-382.
- Redenbaugh K, Fujii JA, Slade D, 1988. Encapsulated plant embryos. (Ed. A. Mizrahi), *Biotechnology in Agriculture Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 9, Alan R Liss, Inc., New York, 225-248.
- Redenbaugh K, Paasch B, Nichol J, Kessler M, Viss P, Walker K, 1986. Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos. *Bio/Technology*, 4: 797-801.
- Reed BM, 2002. Implementing Cryopreservation for Long-Term

- Germplasm Preservation in Vegetatively Propagated Species. (Ed. L.E. Towill, Y.P.S. Bajaj), Biotechnology in Agriculture and Forestry 50, Cryopreservation of Plant Germplasm II. Springer, 22-33.
- Reed BM, 2008. Plant Cryopreservation: A Practical Guide, Springer, USA.
- Reed BM, Schumacher L, Wang N, D'Achino J, Barker RE, 2006. Cryopreservation of bermudagrass germplasm by encapsulation dehydration. Crop Science, 46: 6-11.
- Reed BM, Uchendu E, 2008. Controlled rate cooling. (Ed. B.M. Reed), Plant Cryopreservation: A Practical Guide, Springer, USA, 77-92.
- Sakai A, 1960. Survival of a twig of woody plants at -196°C . Nature, 185: 393-394.
- Sakai A, 1986. Cryopreservation of germplasm of woody plants. (Ed. Y.P.S. Bajaj), Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 1: Trees. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 113-129.
- Sakai A, Engelmann F, 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. CryoLetters, 28: 151-172.
- Sakai A, Hirai D, Niino T, 2008. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. (Ed. B.M. Reed), Plant Cryopreservation: A Practical Guide, Chapt. 3, Springer, New York, USA, 33-57.
- 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: 30-33.
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I, 1991. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) by a simple freezing method. Plant Science, 74: 243-248.
- Sakai A, Nishiyama Y, 1978. Cryopreservation of winter vegetative buds of hardy fruit trees in liquid nitrogen. HortScience, 13: 225-227.
- Sant R, Panis B, Taylor M, 2008. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 92: 107-111.
- Sarasan VA, Cripps R, Ramsay MM, Atherton C, McMichen M, Prendergast G, Rowntree JK, 2006. Conservation in vitro of threatened plants-progress in the past decade. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 42: 206-214.
- Scrijnemakers EWM, Van Iren F, 1995. A two step or equilibrium freezing procedure for the cryopreservation of plant cell suspensions. (Ed. D.J. Day, M.R.R. McLellan), Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Humana Press., Totawa, NJ, 103-111.
- Sekizawa K, Yamamoto S, Rafique T, Fukui K, Niino T, 2011. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by vitrification method using aluminium cryo-plates. Plant Biotechnology, 28: 401-405.
- Sharaf SA, Shibli RA, Kasrawi MA, Baghdadi SH, 2012. Cryopreservation of wild Shih (*Artemisia herba-alba* Asso.) shoot-tips by encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 108: 437-444.
- Sharma S, Shahzad A, 2012. Encapsulation technology for short-term storage and conservation of a woody climber, *Decalepis hamiltonii* Wight and Arn. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 111: 191-198.
- Shatnawi MA, Shibli R, Qrunfleh I, Bataineh K, Obeidat M, 2007. In vitro propagation and cryopreservation of *Prunus avium* using vitrification and encapsulation dehydration methods. Journal of Food, Agriculture & Environment, 5 (2): 204-208.
- Singh SK, Rai MK, Asthana P, Sahoo L, 2010. Alginate-encapsulation of nodal segments for propagation, short-term conservation and germplasm exchange and distribution of *Eclipta alba* (L.). Acta Physiologiae Plantarum, 32: 607-610.
- Srivastava V, Khan SA, Banerjee S, 2009. An evaluation of genetic fidelity of encapsulated microshoots of the medicinal plant: *Cineraria maritima*

- following six months of storage. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99: 193-198.
- Staritsky G, Zandvoort EA, 1985. In vitro propagation and genetic conservation of tropical woody crops. *Acta Botanica Neerlandica*, 34: 238.
- Subramaniam S, Sinniah UR, Khoddamzadeh AA, Periasamy S, James JJ, 2011. Fundamental concept of cryopreservation using *Dendrobium sonia*-17 protocorm-like bodies by encapsulation-dehydration technique. *African Journal of Biotechnology*, 10 (19): 3902-3907.
- Sundararaj SG, Agrawal A, Tyagi RK, 2010. Encapsulation for in vitro short-term storage and exchange of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) germplasm. *Scientia Horticulturae*, 125: 761-766.
- Tagipur EM, Seker G, Teixeira da Silva JA, Yalcin Mendi Y, 2016. Somatic Embryogenesis, Cryopreservation, and *In Vitro* Mutagenesis in Cyclamen. (Ed. A, Mujib), *Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications*, Springer India, 155-167.
- Taşkın T, 2008. Bitki Genetik Kaynakların Korunmasında Dondurarak Muhafaza (Cryopreservation) Teknikleri ve Uygulamaları. *Anadolu : Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü dergisi*, 18 (2): 62 – 78.
- White PR, 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiology*, 9: 585-600.
- Wilson EO, 1988. *Biodiversity*. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- Tan A, 1996. Turkey; Country report to the FAO international technical conference on plant genetic resource, pp. 5-45.
- Tanaka D, Niino T, Isuzugawa K, Hikage T, Uemura M, 2004. Cryopreservation of shoot apices of in vitro grown gentian plants: comparison of vitrification and encapsulation-vitrification protocols. *CryoLetters*, 25: 167-176.
- Tanino KK, Chen THH, Fuchigami LH, Weiser CJ, 1990. Metabolic alterations associated with abscisic acid-induced frost hardiness in bromegrass suspension culture cells. *Plant and Cell Physiology*, 31: 505-511.
- Thorpe TA, 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37: 69-80.
- Uchendu EE, Muminova M, Gupta S, Reed BM, 2010. Antioxidant and anti-stress compounds improve regrowth of cryopreserved *Rubus* shoot tips. *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant*, 46: 386-393.
- Ulrich JM, Finkle BJ, Moore PH, Ginoza H, 1979. Effect of a mixture of cryoprotectants in attaining liquid nitrogen survival of callus cultures of a tropical plant. *Cryobiology*, 16: 550-556.
- Vavilov N, 1992. *Origin and geography of cultivated crops*. Cambridge Univ. Press, UK, 0-532.
- Villalobos VM, Engelmann F, 1995. *Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11: 375-382.
- Vural M, 2003. *Turkey's endangered plant species*. Workshop report on Biodiversity and Organic Agriculture in Turkey, 168-183.
- Walton M, 1993. Molecular markers: which ones to use? *Seed World*, 131: 22-29.
- Wang M, Ha Y, 2007. An electrochemical approach to monitor pH change in agar media during plant tissue culture. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 2718-2723.
- Wang Q, Valkonen PT, 2009. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends in Plant Science*, 14 (3): 119-122.
- Wang R-R, Gao X-X, Chen L, Hua L-Q, Li M-F, Wang Q-C, 2014. Shoot recovery and genetic integrity of *Chrysanthemum morifolium* shoot tips following cryopreservation by droplet-vitrification. *Scientia Horticulturae*, 176: 330-339.
- Vujovic T, Sylvestre , Ruzic D, Engelmann F, 2011. Droplet-vitrification of apical shoot tips of *Rubus fruticosus* L. and *Prunus cerasifera* Ehrh. *Scientia Horticulturae*, 130: 222-228.

- Yamuna G, Sumathi V, Geetha SP, Praveen K, Swapna N, Nirmal Babu K, 2007. Cryopreservation of in vitro grown shoots of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *CryoLetters*, 28 (4): 241-252.
- Yi J-Y, Sylvestre I, Colin M, Salma M, Lee S-Y, Kim H-H, Park H-J, Engelmann F, 2012. Improved cryopreservation using droplet-vitrification and histological changes associated with cryopreservation of madder (*Rubia akane* Nakai). *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, 30 (1): 79-84.
- Yin Z-F, Bi, W-L, Chen L, Zhao B, Volk GM, Wang Q-C, 2014. An efficient, widely applicable cryopreservation of *Lilium* shoot tips by droplet vitrification. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36: 1683-1692.
- Yin M, Hong S, 2009. Cryopreservation of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. protocorm-like bodies by encapsulation-vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 98: 179-185.
- Yoon J-W, Kim H-H, Ko H-C, Hwang H-S, Hong E-S, Cho E-G, Engelmann F, 2006. Cryopreservation of cultivated and wild potato varieties by droplet vitrification: effect of subculture of mother-plants and of preculture of shoot tips. *CryoLetters*, 27 (4): 211-222.
- Zainuddin M, Julkifle AL, Pobathy R, Sinniah UR, Khoddamzadeh A, Jeyanthi J, Pavallekoodi JA, Subramaniam S, 2011. Preliminary analysis of cryopreservation of *Dendrobium* Bobby Messina orchid using an encapsulation-dehydration technique with Evans blue assay. *African Journal of Biotechnology*, 10 (56): 11870-11878.
- Zhao Y, Wu Y, Engelmann F, Zhou M, 2001. Cryopreservation of axillary buds of grape (*Vitis vinifera*) in vitro plantlets. *CryoLetters*, 22: 321-328.