

## **Süs Bitkilerinde Kriyoprezervasyon (Ultra Soğuk Koşullarda Dondurularak Muhafaza) Yönteminin Kullanımı**

**Ümran Şenel**

Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir

**e-posta:** umran.senel@gthb.gov.tr

### **Özet**

Süs bitkileri sektörünün ekonomik olarak önemi ülkemizde ve dünyada her geçen yıl artmaktadır. Her yıl tüketici taleplerine göre yeni çeşitler üretilmektedir. Yeni ve eski pek çok çeşit önemli ıslah materyali kaynağını oluşturmaktadır. Bu noktada da bu genetik kaynakların korunması ve muhafazası çok önemlidir. Günümüzde genetik kaynaklarının uzun süreli muhafazası gen bankalarında *in vitro* koşullarda sağlanabilmektedir. Bu yöntemin pek çok avantajı olmasına rağmen, bu uzun süreli muhafazanın ekonomik yükü ağır olmakla birlikte, kontaminasyon kayıpları ve somaklonal varyasyon gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Kriyoprezervasyon yöntemi bu konuda büyük önem arz etmektedir. Dünyada pek çok bitki türünde bu yöntem kullanılmasına rağmen, süs bitkilerindeki kullanımı istenilen seviyede değildir. Bu derlemede kriyoprezervasyon yönteminin süs bitkilerinde kullanımı irdelenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Kriyoprezervasyon, süs bitkileri

### **Usage of Cryopreservation Method in Ornamental Plants**

#### **Abstract**

Economic importance of ornamental plants sector is increasing every year in our country and around the world. Every year, new varieties are being produced according to consumer demand. Many kinds of new and old-fashioned cultivars are an important source of breeding material. At this point, the protection and storage of these genetic resources is very important. Today, the long-term conservation of genetic resources can be obtained in gene banks under *in vitro* cultures. Although there are many advantages of this method, long term storage has heavy economic burden and there are also other disadvantages such as contamination losses and somaclonal variation. In this regard, cryopreservation has great importance. Although this method is being used in many plant species in the world, usage in ornamental plants are not at the desired level. In this review, use of cryopreservation method in ornamental plants were examined.

**Keywords:** Cryopreservation, ornamental plant

#### **Giriş**

Şekli, formu, rengi ve estetik özellikleri ile öne çıkan süs bitkileri insanoğlunun acılarını ve sevinçlerini sembolize eden bitkilerdir. Bu nedenle de ülkemiz dahil birçok ülkede geçmiş olduğu kadar eskilere dayanmaktadır (Baktır, 2013). Yüzyıllar önce estetik amaçlarla kullanılmaya başlanan çiçek, günümüzde kentlerin daha yaşanılır ortamlar haline getirilmesi, doğadan uzaklaşan insanların doğa özleminin giderilmesi gibi amaçlarla kullanılmakta ve bugün birçok ülkenin ekonomik kalkınmasında önemli bir rol oynamaktadır. Giderek artan talep, birim alandan fazla ürün alınması ve yüksek gelir elde edilmesi, istihdama yapmış olduğu katkılar ve ihracat olanakları birçok ülkede olduğu gibi ülkemizde de bu sektörün hızla gelişmesinde etkili olmuştur (Korkut ve ark., 1995).

Süs bitkileri sektörünün ekonomik olarak öneminin, ülkemizde ve dünyada artmasıyla, her yıl tüketici talepleri doğrultusunda yeni çeşitler

elde edilmektedir. Tüketici tercihlerinin devamlı değişmesinden dolayı bugün moda olmayan bir çeşit, gelecekte tekrar tercih edilebilmektedir. Ayrıca bu yeni ve eski pek çok çeşit önemli ıslah materyali kaynağını oluşturmaktadır. Bu noktada da bu genetik kaynakların korunması ve muhafazası sektör açısından büyük önem taşımaktadır (Kulus ve Zalewska, 2014).

Günümüzde genetik kaynak materyali olarak muhafaza edilecek bitkiler; ortodoks tip tohumlu bitkiler, rekalsitran tohumlu bitkiler ve heterozigot yapıda olup da tohumla üretilmeleri istenmeyen veya vejetatif üretilen bitkiler olarak üç grupta toplanabilir. Rekalsitran tohumlu ve vejetatif üretilen bitkilerin, vejetatif formda saklanması zorunludur ve bu materyallerin muhafazası arazide (koleksiyon bahçesi), seralarda veya doğada (*In situ*) yapılabilir (Taşkın, 2008). Bu şekilde yapılan muhafaza devamlı bir uğraşı isteyeceği için hem iş gücü hem de yer sıkıntısı doğurmaktadır. Ayrıca arazi

koşullarında muhafaza edilen materyal, hastalık ve zararlılar ile ve çevresel streslerle devamlı baş etmek zorunda kalacaktır (Sekizawa ve ark., 2011). Tüm bunlar göz önüne alındığında, genetik materyalin muhafazasında biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması pek çok avantaj sağlamaktadır.

*In vitro* kültür teknikleri kullanılarak yapılan muhafaza şekillerinden biri bitki gelişimini yavaşlatarak muhafazadır (Slow Growth Storage). Kısa ve orta süreli muhafazaya uygun olan bu teknikle, bitki materyali birkaç aydan 2-3 yıla kadar alt kültüre alınmadan minimum kültür koşullarında muhafaza edilebilir. Büyümenin yavaşlatılması genellikle, kültür ortamında ve/veya çevre koşullarında yapılan modifikasyonlarla sağlanır. Kültür ortamında mineral maddelerin seyreltilmesi, şeker konsantrasyonunun azaltılması, büyüme düzenleyicilerinin ya da konsantrasyonlarının değiştirilmesi gibi değişikliklere gidilebilir. Çevre koşullarında ise sıcaklığın düşürülmesi, ışık yoğunluğunun düşürülmesi ya da tamamen karanlıkta bırakma gibi değişiklikler yapılabilir. Kısa ve orta süreli depolamada büyümenin yavaşlatılması ve alt kültürler arası sürenin uzatılması amaçlanmaktadır (Cruz ve ark., 2013). Gen bankalarında *in vitro* koşullarda yapılan bu tekniğin pek çok avantajı olmasına rağmen, ekonomik yükü ağırdır ve kontaminasyon kayıpları ile somaklonal varyasyon gibi dezavantajları da vardır (Kulus ve Zalewska, 2014). Rekalsitrant tohumlu bitkiler, vejetatif üretilen bitkiler ile nadir ve tehlike altındaki bitkilerin uzun süreli muhafazasında, bir diğer *in vitro* kültür tekniği olan kriyoprezervasyon yöntemi kullanılmaktadır.

### **Kriyoprezervasyon**

Uzun süreli ultra düşük sıcaklıklardaki depolamada (kriyoprezervasyon) genellikle sıvı azot (-196°C) kullanılmaktadır. Biyolojik materyal olarak; tohumlar, meristemler, zigotik ve somatik embriyolar, polenler ile kallus kültürleri ve kültüre alınmış hücreler, sıvı azot (-196°C) içerisinde depolanabilmektedir (Engelmann, 2010).

Bu sıcaklıkta tüm hücresel bölünmeler ve metabolik süreçler durmaktadır. Bitki materyali süresiz olarak değişmeden veya modifiye olmadan saklanabilmektedir. Ayrıca materyaller küçük hacimlerde, kontaminasyondan uzak ve

çok az bir bakım gerektirerek depolanabilmektedirler (Engelmann, 2004).

Kriyoprezervasyon yöntemi pek çok türde başarıyla uygulanmaktadır. Süs bitkilerinde ilk kriyoprezervasyon ile ilgili çalışmalara 1989 yılında *Dianthus hybrida*' da rastlanmıştır. Bu kısa zaman diliminde süs bitkilerinde kriyoprezervasyon yönteminin kullanımı istenilen düzeyde olmasa da her geçen gün değeri anlaşılmaktadır (Kulus ve Zalewska, 2014).

Hücredeki su miktarı, tekniğin başarısını etkileyen önemli bir faktördür (Benson, 2008). Bütün kriyoprezervasyon sürecinde, materyalin zararlanmalardan korunmasında suyun uzaklaştırılması temel rol oynamaktadır (Gonzalez-Arno ve ark., 2008). Bazı materyaller (ortodoks tohumlar, dormant tohumcuklar) herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan dondurularak muhafaza edilebilirler. Hücre kültürleri, kalluslar, sürgün uçları ve embriyolar gibi hücrelerinde fazla miktarda su bulunduran materyaller ise donma zararlanmalarına karşı aşırı hassastırlar (Engelmann, 2010).

Eksplantın tipi ve boyutu, ön uygulamalar, kriyoprotektantların tipi ve konsantrasyonları, kriyoprezervasyon metodunun seçimi, donma ve çözünme miktarları, çözünme metodunun seçimi de başarıyı etkileyen önemli faktörlerdendir (Kaviani, 2011).

Çoğu kriyoprezervasyon yönteminde, dondurma ve çözündürme aşamalarında hücrelerin dondan etkilenmemeleri için bazı kimyasallardan (kriyoprotektant) yararlanılır. Kriyoprotektantlar, hücrelerin içine tesir etmeyenler (Polietilen glikol-PEG, şeker ve diğer karbonhidratlar) ve hücrelerin içine tesir edenler (Dimetil Sülfö Oksit-DMSO, Gliserol) olarak iki gruba ayrılırlar. En yaygın olarak, hücrelere kolaylıkla nüfuz edebilmelerinden dolayı DMSO ve gliserol kullanılmaktadır (Panis ve Lambardi, 2005). *Ranunculus kausensis*' in embriyonik hücre süspansiyonu kültüründe yapılan bir çalışmada, DMSO' in ise gliserole göre daha etkili sonuç verdiği saptanmıştır (Kim ve Oh, 2009).

### **Kriyoprezervasyon Yöntemleri**

Kriyoprezervasyon yöntemleri, klasik ve modern teknikler olmak üzere ikiye ayrılır.

Klasik tekniklerde buz varlığına bağlı soğutma sağlanırken, vitrifikasyona dayalı modern tekniklerde ise buz oluşumları yoktur (Cruz ve ark., 2013). Kriyoprezervasyon yöntemlerinin her biri farklı teknik detaylara sahiptir.

Klasik bir method olan yavaş dondurma yönteminde (slow freezing), ilk olarak örnekler ön kültüre alınırlar. Kriyoprotektant uygulamasının ardından dokuların sıcaklığı yavaş yavaş (0.5 – 2°C/dak) olacak şekilde -40° C'ye kadar soğutulur ve sıvı azot içerisine aktarılır. Burada depolanan örnekler buzlarından çözündürülür ve yeniden kültüre alınırlar (Kartha ve Engelman, 1994).

Klasik kriyoprezervasyon yöntemleri genellikle hücre süspansiyonları ve kalluslar gibi farklılaşmamış dokularda (Kartha ve Engelman, 1994; Withers ve Engelman, 1998) ve soğuğa dayanıklı türlerin tepe kısımlarında başarıyla kullanılabilir (Reed ve Uchendu, 2008). Yavaş dondurma yöntemi, karanfil (Fukai ve ark., 1991a) ve krizantemde (Fukai ve ark., 1991b) başarıyla uygulanmaktadır. Fakat bu yöntemin, pahalı dondurucular gerektirmesi kullanımını kısıtlamaktadır. Ayrıca farklılaşmış dokulara sahip, soğuklara hassas olan pek çok süs bitkisinde kullanılamaması yöntemin dezavantajlarındandır.

Vitrifikasyona dayalı modern tekniklerde ise hücreler, yüksek konsantrasyonlu bitki vitrifikasyon solusyonlarında (PVS) dehidrasyona uğrarlar ya da hava ile kurutulurlar. Ve ardından hızla dondurulurlar. Vitrifikasyona bağlı modern tekniklerden; ön kültür, dehidrasyon, ön kültür-dehidrasyon, enkapsülasyon-dehidrasyon, vitrifikasyon, enkapsülasyon-vitrifikasyon, droplet vitrifikasyon ve Cryo-plate en çok bilinenlerdir (Cruz ve ark., 2013). Tüm modern tekniklerde, örneklerin sıvı azota alınmıncaya kadarki yapılan işlemler farklılık gösterirken, depolama sonrası sürecindeki işlemler ise hepsinde aynıdır. Sıvı azotta depolanan donmuş materyal önce uygun şekilde çözündürülür, yeniden kültüre alınan materyallerin rejenerasyonu sağlanarak, bitkiler elde edilir.

Ön kültür yönteminde örnekler, kriyoprotektantlarla kültüre alınır ve hemen ardından sıvı azotta depolanırlar. Dehidrasyon yönteminde örnekler, laminar kabinde ya da silika jelde dehidre edilip, hızlıca dondurulurlar. Ön kültür- dehidrasyon yöntemi de her iki

yöntemin kombine edilmesiyle uygulanır. Bu teknikler, meristematik kültürler, küçük boyutlu tohumlarda, poliembriyonik kültürlerde, zigotik embriyolarda ve tohumlardan çıkartılmış embriyo uçlarında kullanılır (Gonzalez-Arno ve ark., 2008). Enkapsülasyon-dehidrasyon yöntemi, eksplanların kalsiyum aljinat damlalarına sarmalandığı sentetik tohum teknolojisiye dayanmaktadır. Kapsüllere alınan eksplanlatlar daha sonra sıvı ortamda yüksek şeker konsantrasyonunda ön kültüre alınır ve dondurulmadan önce kısmen kurutulur (Gonzalez-Arno ve Engelman, 2006).

Vitrifikasyon yönteminde örnekler, kriyoprotektant maddelere maruz bırakılıp, yüksek konsantrasyonlu bitki vitrifikasyon solusyonlarında (PVS) dehidre edilip hızla dondurulur. Bu yöntemde materyal olarak uç noktalar, hücre süspansiyonları ve somatik embriyolar kullanılabilir (Sakai ve Engelman, 2007). Basit, güvenilir ve az maliyetli olması nedeniyle vitrifikasyon yöntemi, orkidelerde etkili yöntemlerden biridir (Galdiano ve ark., 2012).

Enkapsülasyon-vitrifikasyon yöntemi de enkapsülasyon-dehidrasyon ile vitrifikasyon yöntemlerinin kombine edilmesiyle uygulanır. Droplet-Vitrifikasyon yönteminde, vitrifikasyon solusyonuyla muamele edilen örnekler aliminyum folyo üzerine bırakılan kriyoprotektant damlacıkları üzerine yerleştirilerek sıvı azot içerisinde depolanırlar (Sakai ve Engelman, 2007). Çok yeni bir yöntem olan Cryo-plate tekniği ise enkapsülasyon-vitrifikasyon ve droplet – vitrifikasyon yöntemlerinin kombinlenmesiyle uygulanmaktadır (Yamamoto ve ark., 2011).

Günümüzde süs bitkilerinde, klasik bir yöntem olan yavaş dondurma tekniği (slow cooling) halen kullanılmakta iken, vitrifikasyon, enkapsülasyon-vitrifikasyon, enkapsülasyon-dehidrasyon gibi modern tek aşamalı dondurma (one-step freezing) teknikleri daha çok tercih edilmektedir (Ozudogru ve ark., 2010). Örneğin *Chrysanthemum grandiflora* (Halmagyi ve ark., 2004), *Gentian* spp. (Tanaka ve ark., 2004), *Dianthus caryophyllus* (Halmagyi ve Deliu, 2007) türlerinde tek aşamalı dondurma teknikleri kullanılmaktadır. Halmagyi ve ark., (2004) *Chrysanthemum morifolium*'un sürgün uçlarında, kontrollü dondurma, enkapsülasyon-dehidrasyon, droplet ve vitrifikasyon yöntemleri

olmak üzere farklı kriyoprezervasyon yöntemleri denemişlerdir. Vitrifikasyon yönteminde en yüksek sürgün rejenerasyonu tespit edilse de, droplet yönteminin de başarılı olduğunu belirtmişlerdir ( Halmagyi ve ark., 2004).

Sıvı azotla muamele etmeden önce şeker ilavesiyle yapılan ön kültür, süs bitkilerinde pek çok kriyoprezervasyon yönteminin temel basamağını oluşturmaktadır. 2006 yılında gülde yapılan bir çalışmada, ön kültürde dört farklı şeker kullanılmıştır ve gülün sürgün uçlarının şeker kullanıldığında dona daha toleranslı olduğu saptanmıştır (Halmagyi ve Pinker, 2006). Zambaklarda yapılan çalışmalarda ise en iyi germplazm kaynağının tohum olduğu ve sıvı azotta depolama sonrası en çok başarı sağlanan uygulamanın 0.75 M şeker ve 1 saat dehidrasyon olduğu belirlenmiştir. (Kaviani ve ark., 2008; 2009; 2010)

Süs bitkilerinde PVS2 kullanımının, 5 dakikadan (*Chrysanthemum grandiflora*)(Halmagyi ve ark., 2004), 3 saate (*Dianthus caryophyllus*) (Halmagyi ve Deliu, 2007) kadar değişen farklı sürelerde uygulandığı rapor edilmiştir. Sıvı azotta dondurulan materyalin hızla ısıtılması, materyalde başarılı bir geri dönüşüm sağlasa da, bu hızla ısıtmanın nasıl olması gerektiği tartışmalı bir konudur. Ama süs bitkilerinde 20°C (27) ile 45°C (28-29) arasında olması önerilmektedir (Özudoğru ve ark., 2010).

### **Sonuç**

Günümüzde genetik kaynaklarının uzun süreli muhafazası gen bankalarında in vitro koşullarda sağlanabilmektedir. Bu yöntemin pek çok avantajı olmasına rağmen, dezavantajları da bulunmaktadır. Günümüzde kriyoprezervasyon yöntemi, süs bitkilerinde orta ve uzun süreli muhafazada başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Materyallerin düşük maliyetle ve az yer gerektirerek sınırsız süreyle depolanabiliyor olması bu yöntemin en önemli avantajlarından. Dünyada pek çok bitki türünde kullanılan bu yöntemin süs bitkilerindeki kullanımı henüz istenilen seviyede olmasa da her geçen gün iyileştirici yeni teknikler geliştirilmektedir. Klasik yöntemler yerini yavaş yavaş modern yöntemlere bırakmaktadır. Klasik bir yöntem olan yavaş dondurma metodu hem pahalı ekipmanlar gerektirirken, hem de soğuğa hassas türlerde başarıyla kullanılamamaktadır. Vitrifiksasyona dayalı modern teknikler geliştirildikçe, sadece

soğuğa hassas türler değil aynı zamanda süs bitkileri açısından önemli tropikal türlerin ve farklılaşmış dokuların da muhafazasında kriyoprezervasyon yönteminin kullanılmasına olanak sağlanmıştır.

Günümüzde, karanfil (Fukai ve ark., 1991a), krizantem (Fukai ve ark., 1991b), *Gentiana cruciata* L. (Mikula ve ark., 2005), *Lilium* sp. (Bouman ve ark., 2003), *Dendrobium candidum* (Wang ve ark., 1998), *Photinia serrulata* (Yan, 2006), *Paeonia lactiflora* (Kim ve ark., 2004), *Saintpaulia ionantha* (Moges ve ark., 2004) gibi süs bitkilerinde kriyoprezervasyon yöntemi başarıyla kullanılmaktadır. Süs bitkilerinin uzun süreli muhafazasında yapılacak olan çalışmalar ile farklı türler için yeni kriyoprezervasyon protokolleri geliştirilmelidir.

### **Kaynaklar**

- Baktır İ., 2013. Türkiye’de süs bitkilerinin dünü, bugünü ve yarını. 5. Süs Bitkileri Kongresi. 06-08 Mayıs 2013 Yalova. Cilt1. Sf 13-16.
- Benson, E.E., 2008. Cryopreservation theory. In: Reed B.M. (Ed) Plant cryopreservation: A practical guide Springer, USA, pp 15-3.
- Bouman, H., Tiekstra, A., Petutschnig, E., Homan, M., Schreurs, R., 2003. Cryopreservation of *Lilium* species and cultivars. *Acta Hort.*, 612:147-154.
- Cruz, C.A.C., Gonzalez-Arnao, M.T., Engelmann, F., 2013. Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources*, 2:73-95.
- Engelmann, F., 2004. Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*, 40(5):427-433.
- Engelmann, F., 2010. Use of biotechnology for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*, DOI 10.1007/s11627-010-9327-2.
- Fukai, S., Goi, M., Tanaka, M., 1991a. Cryopreservation of shoot tips of Caryophyllaceae ornamentals. *Euphytica* 56:149-153.
- Fukai, S., Goi, M., Tanaka, M., 1991b. Cryopreservation of shoot tips of *Chrysanthemum morifolium* and related species native to Japan. *Euphytica* 54: 201-204.
- Galdiano J.R. ve ark., 2012. Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. *Scientia Horticulturae*, 148:154-160, 2012.
- Gonzalez-Arnao, M.T., Engelmann, F., 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: Review and case study on sugarcane. *CryoLetters* 27: 155-168.

- Gonzalez-Arno, M.T., Panta, A., Roca, W.M., Escobar, R.H., Engelmann, F., 2008. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 92:1-13.
- Halmagyi, A., Fischer-Klüber, G., Mix-Wagner, G., Schumacher, H.M., 2004. Cryopreservation of *Chrysanthemum morifolium* (Dendranthema grandiflora Ramat) using different approaches. *Plant Cell Rep.* 22:371-375.
- Halmagyi, A. ve 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.
- Halmagyi A., Deliu C., 2007. Cryopreservation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot tips by encapsulation-vitrification. *Sci. Hort.*, 113: 300-306.
- Kartha, K.K., Engelmann, F., 1994. Cryopreservation and germplasm storage. In: Vasil I. K.; Thorpe T.A. (Eds). *Plant cell and tissue culture*. Kluwer, Dordrecht, 195-230.
- Kaviani, B., Safari-Motlagh, M.R., Padasht Dehkaei, M.N., Darabi, A.H., Rafizadeh, A., 2008. Cryopreservation of lily [*Lilium ledebourii* (Baker) Bross. germplasm by ED. *Int. J. Bot.*, 4 (4): 491-493.
- Kaviani B, Hashemabadi D, Mohammadi Torkashvand A, Sedaghatpour S., 2009. Cryopreservation of seeds of lily [*Lilium ledebourii* (Baker) Bross.]: Use of sucrose and dehydration. *African J. Biotech.*, 8: 3809-3810.
- Kaviani, B., Padasht Dehkaei, M.N., Hashemabadi, D., Darabi, A.H., 2010. Cryopreservation of *Lilium ledebourii* (Baker) Bross. by encapsulation-vitrification and *in vivo* media for planting of germplasm. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, 8 (5): 556-560.
- Kaviani, B., 2011. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *Ajcs* 5(6):778-800.
- Kim, H.M., Shin, J.H., Sohn, J.K., 2004. Cryopreservation of zygotic embryos of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by encapsulation-dehydration. *Korean J. Crop Sci.*, 49 (4):354-357.
- Kim, S.W., Oh, M.J., 2009. Establishment of plant regeneration and cryopreservation system from zygotic embryo- derived embryogenic cell suspension cultures of *Ranunculus katusensis*. *Methods Mol. Biol.* 547:107-115.
- Korkut, A., Yıldırım, T., Görür, G., Çakmak, S., 1995. Türkiye'de süs bitkileri tüketim projeksiyonları ve üretim hedefleri. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi. 9-13 Ocak 1995 Ankara. T.C. Ziraat Bankası Kültür Yayınları No:26. 697-714.
- Kulus, D., Zalewska, M., 2014. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species – A review. *Scientia Horticulturae*, 168: 88-107.
- Mikuła, A., Fiuk, A., Rybczyński, J.J., 2005. Induction, maintenance and preservation of embryogenic competence of *Gentiana cruciata* L. cultures. *Acta Biol. Crac. Bot.*, 47:227-236.
- Moges, A.D., Shibli, R.A., Karam, N.S., 2004. Cryopreservation of African Violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) shoot tips. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 40:389-395.
- Ozudogru, E.A., Previati, A., Lambardi, M., 2010. In vitro conservation and cryopreservation of ornamental plants. *Protocol for in vitro propagation of ornamental plants, methods in molecular biology vol. 589*, 303-324.
- Panis, B., Lambardi, M., 2005. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). The role of biotechnology, Villa Gualino, Turin, Italy -5-7 March, 2005.
- Reed, B.M., Uchendu, E., 2008. Controlled rate cooling. In: Reed, B.M. (Ed) *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, Berlin, 77- 92.
- Sakai, A., Engelmann, F., 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: A review. *CryoLetters*, 28:151-172.
- 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 Biotechnol.*, 28: 401-405.
- 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.
- Taşkın, T., 2008. Bitki genetik kaynakların korunmasında dondurarak muhafaza (Cryopreservation) teknikleri ve uygulamaları. *Anadolu J. of AARI*, 18 (2):62-78.
- Wang, J.H., 1998. Cryopreservation of seeds and protocorms of *Dendrobium candidum*. *Cryo Letters*, 19: 123-128.
- Withers, L.A., Engelmann, F., 1998. In vitro conservation of plant genetic resources. In: Altman, A., (Ed) *Biotechnology in agriculture*. Marcel Dekker, New York, 57-88.
- Yan, W.Y.L., 2006. Cryopreservation of *Photinia serrulata* shoot-tips by vitrification. *Sci. Silvae Sin.* 12: 23.
- Yamamoto, S., Rafique, T., Priyantha, W.S., Fukui, K., Matsumoto, T., Niino, T., 2011. Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. *CryoLetters* 32:256-265.