



Bitki Genetik Kaynaklarının Muhafazası Açısından Biyoteknoloji

Özlem BİLİR*

Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Edirne, Türkiye

*Sorumlu Yazar:

E-posta:ozlem.bilir@tarim.gov.tr

Geliş Tarihi: 21 Haziran 2016

Kabul Tarihi: 30 Eylül 2016

Özet

Bitki genetik kaynakları, artan dünya nüfusunun ihtiyaçlarının karşılanması açısından gerekli olan yeni çeşitlerin geliştirilmesi, farklı sektörlerde de değerlendirilebilmeleri bakımından önem taşımaktadır. Bitki genetik kaynaklarında mevcut olan genetik çeşitliliğin gelecek nesillere aktarılabilmesi ise bu kaynakların muhafazasıyla mümkündür. Günümüzde bitki genetik kaynaklarının korunmasında yerinde ve yeri dışında olmak üzere iki temel muhafaza yönteminden faydalanılmaktadır. Biyoteknoloji alanındaki son yıllardaki gelişmeler bitki genetik kaynaklarının muhafazası çalışmalarına büyük katkılar sağlamaktadır. Klasik metotlarla üretimi ve saklanması zor olan bitki türlerinin (inatçı tohumlu, tohumla üretiminde problem olan, vejetatif çoğalan bitkiler vb.) yeri dışında korunmasında; ultra soğuk koşullarda muhafaza (kriyo-muhafaza), yavaş büyüme gibi biyoteknolojik yöntemlere başvurulmaktadır. Bu yöntemler, bitki genetik kaynaklarının sahip olduğu genetik çeşitlilik kaybını önlemek amacıyla tohum gen bankaları tarafından etkin olarak kullanılmaktadır. Bu derlemede, bitki genetik kaynaklarının muhafazasında biyoteknolojik metotların önemleri, genel prensipleri, avantaj ve dezavantajları tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: bitki genetik kaynakları, biyoteknoloji, muhafaza, kriyomuhafaza, yavaş büyüme

Biotechnology with regard to Conservation of Plant Genetic Resources

Abstract

Plant genetic resources carry weight for the development of new varieties to meet the needs of a growing world population, also assessment in different sectors. Genetic diversity existing plant genetic resources can be transferred future generations, on condition that those resources is conserved. At the present days, two basic conservation methods namely in situ and ex situ are utilized for the protection of plant genetic resources. Developments in recent years in the field of biotechnology provide great contribution to the the conservation studies of plant genetic resources. Biotechnological methods such as conservation at the ultra cold conditions (cryopreservation), slow growth are applied in ex situ conservation of plant species (recalcitrant seeds, problematic seed production, vegetative growing plants etc.) which are difficult to product and store by conventional methods. These methods are used effectively in order to prevent the loss of genetic diversity owned plant genetic resources by plant gene banks. In this review, significances, general principles, advantages and disadvantages of biotechnology methods have been discussed in the preservation of plant genetic resources.

Keywords: plant genetic resources, biotechnology, conservation, cryopreservation, slow growth

GİRİŞ

Bitki genetik kaynakları, yerel çeşitler olarak nitelendirilen köy populasyonları; bunların yabani akrabaları, artık kullanılmayan eski çeşitler ve kalıtsal özellikleri belirlenmiş hatlardan oluşur. Kısaca ekilebilen bitkilerin geliştirilmesi için bu canlılar ile yabani formlarını da içine alan canlı materyalidir [1]. Bitki genetik kaynakları, genetik çeşitlilik için önemli kaynak niteliğinde olup, bir bitki türünün gen havuzundaki kalıtsal bilginin çeşitliliği, zenginliğini içermektedir [2] ve bitkisel üretimde verim, kalite artışı vb. sağlanmasının ve idamesinin garantisi, hastalık, zararlı ve olumsuz çevre şartlarına dayanıklılık için vazgeçilmez bir kaynak olup, farklı tat ve lezzetlerin adresidir [3]. “Bitkisel Çeşitlilik” ya da “Bitki Genetik Kaynakları” olarak adlandırılan bu materyal; “Bitki Islahı Çalışmaları” için oluşturulacak gen havuzunda birinci derecede önem taşımaktadır [4]. Ülkemiz ise bitkisel çeşitlilik bakımından çok önemli bir potansiyele sahiptir. Ülkemizde 10000 kadar bitki türü bulunduğu, bunlar içinde toplam 1890 adet bitkinin ise yurdumuzun değişik bölgelerinden birisine has oldukları, yani ancak o bölgede yetiştikleri saptanmıştır [5]. Komşu ülkelerdekinden daha fazla çeşitliliğe sahip olan Türkiye, biyolojik çeşitliliğinin zenginliği bakımından tüm kıta ülkeleri arasında 9. sıradadır. Sınırları içinde bulunan bitki türlerinin %33’ü endemik

niteliğe sahiptir ve bu konuda önde gelen ülkelerden biridir [6]. Dünya nüfusunun artması, doğadan aşırı bitki toplama ve sökümü, şehirleşme, endüstrileşme, yerel çeşitlerin yerini ıslah çeşitlerinin alması, doğal afet gibi çevresel tahripler ve genetik erozyon gibi nedenlerle bu kaynaklar hızla azalmakta ya da kaybolmaktadır [7]. Bu kaynakların, günümüzde ve gelecekteki bitkisel araştırmaların kullanımına hazır bir şekilde saklanması çok önemlidir [4] ve hatta bunların korunması, geleceğin bitkisel üretimini, böylece insanlığın geleceğini, güvence altına alması bakımından zorunludur [2]. Bitkilerin muhafaza stratejileri bitki türlerine göre değişmekle birlikte [4], biyolojik çeşitliliği korumak için ex situ (doğal yaşam alanı dışında koruma ya da yapay koruma) ve in situ koruma (doğal yaşam alanında koruma ya da yerinde koruma) yaklaşımları izlenmektedir. Her iki yaklaşımda kendine özgü uygulamaları olan kabul edilmiş programlardır [8]. Bunun yanı sıra biyoçeşitliliğinin belirlenmesi ve korunması amacı ile çeşitli biyoteknolojik yöntemlerin kullanımı yaygınlaşmıştır [9] ve son yıllarda biyoteknolojide görülen hızlı gelişmeler, bitki genetik kaynaklarına ait çalışma alanlarına doğrudan ve çok büyük katkılar sağlamıştır [10]. Bitkisel biyolojik çeşitlilik ve bitki genetik kaynakları, eskiden beri biyoteknolojinin birçok uygulamalarında materyal olarak kullanılmıştır. Özellikle klasik yöntemlerle muhafazası zor veya olanaksız olan

bitkilere ait genetik çeşitliliğin devamlılığının sağlanmasında çeşitli biyoteknolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Bu şekilde biyoteknoloji, tarımsal üretimin sigortası durumunda olan bitki genetik kaynaklarının korunması için vazgeçilmez bir araç durumundadır [11].

Bu derleme çalışmasının amacı, bitki genetik kaynaklarının muhafazasında faydalanılan biyoteknolojik metodların yerini ve genel prensiplerini, olumlu ve olumsuz taraflarını değerlendirmektir.

BİYOTEKNOLOJİK MUHAFAZA YÖNTEMLERİ

Bitki gen kaynaklarının korunmasındaki temel prensipler, uzun süre depolanabilmesini, canlılık kayıplarının en aza düşürülmesini, çok sayıda örneğin muhafaza altına alınabilmesini, bakım çalışmalarının ve maliyetin düşürülmesini hedeflemektedir. Bu amaca yönelik yaygın uygulama alanı bulan *ex situ* koruma çerçevesinde *in vitro* DNA, tohum ve polen muhafazası yer almakta, tarla gen bankası ve botanik bahçelerinin yapılandırılması bulunmaktadır [12]. Doku ya da hücrelerin yapay ortamlarda, DNA ve polenlerin sıvı nitrojen içinde muhafazası da *ex situ* muhafaza içinde ele alınmaktadır [13].

Muhafaza şekilleri çeşitli yöntemlere sahip olup, bunlar muhafaza etme ve kullanım amacına uygun olarak; muhafaza yerine, bitki çeşidine, materyalin yapısına ve genetik kompozisyonuna uyan en geçerli yöntem olarak seçilirler [14]. Ancak biyoteknolojik metodlarla *in vitro* (yapay kültür ortamlarında) germplazmın muhafazasında genel olarak bu iki teknik uygulanmaktadır;

a- Yavaş büyütme tekniği ile muhafaza

b- Ultra soğuk koşullarda muhafaza (Kriyomuhafaza) [15, 11].

İn vitro (yapay kültür ortamlarında) Muhafaza

İn vitro şartlarda muhafaza genel olarak vejetatif materyalin baz koleksiyonlarının kontrollü şartlarda muhafaza edilmesini ifade etmektedir [16]. Generatif ve vejetatif yollarla çoğaltılması mümkün olmayan veya zor olan, genetik olarak değeri yüksek olan türler, çok yıllık bitkilerin koleksiyon halinde muhafazalarının zor ve pahalı olması gibi nedenlerle yapay besin ortamlarında bitki parçası veya hücre olarak saklanır [17]. Totipotent hücrelerin *in vitro* kültürü, kallus veya süspansiyon hücreleri şeklinde uzun süreli olarak veya belirli aralıklarla yeniden oluşturularak saklanabilir ve ihtiyaç duyulduğunda bu hücrelerden yeni bitkiler oluşturulabilir. Alternatif olarak ilgili hücreler, meristemler veya elde edilen minyatür bitkiler düşük sıcaklıkta (40°C), çok az besin maddesine ve alana ihtiyaç göstererek steril şartlarda (1-4 yıl) veya benzer şekilde çok düşük sıcaklıklarda, sıvı azot içinde doku ve hücreler hızlı bir şekilde dondurulup saklanabilirler. Bu doku kültürü teknikleri *in vitro* germplazm muhafazasında önemlidir ve gen ve tohum bankalarında alternatif olabilmektedir. Bitki genetik kaynaklarının muhafazası, bunların arzu edilen bitkisel özellikleriyle ve sürekli *in vitro* üretimleri ile yakından ilişkilidir. Stok kültürler aşağı yukarı optimal koşullarda sürekli alt kültür yapılarak uzun süre muhafaza edilebilmektedir [18].

İn vitro koruma yapay kültür ortamında bitki germplazmının (özellikle sürgün ucu, somatik embriyo veya embriyogenik kallus) steril koşullar altında yavaş büyütme stratejisi kullanılarak orta dönem saklama ve kriyoprezervasyon kullanılarak uzun dönem (teorik olarak

sonsuz kadar) saklama tekniklerini içerir [19].

a- Yavaş büyütme tekniği ile muhafaza

Yavaş büyütme, tekniği doku kültürü koşullarında türlere bağlı olarak periyodik olarak alt kültür yapılması ile 1-15 yıl arasında klonal bitki materyalinin korunmasıdır [20]. En yaygın uygulama stratejisi ya tamamen karanlıkta ya da hafif aydınlık koşullarda, düşük sıcaklıkta kültürler elde etmektir [21].

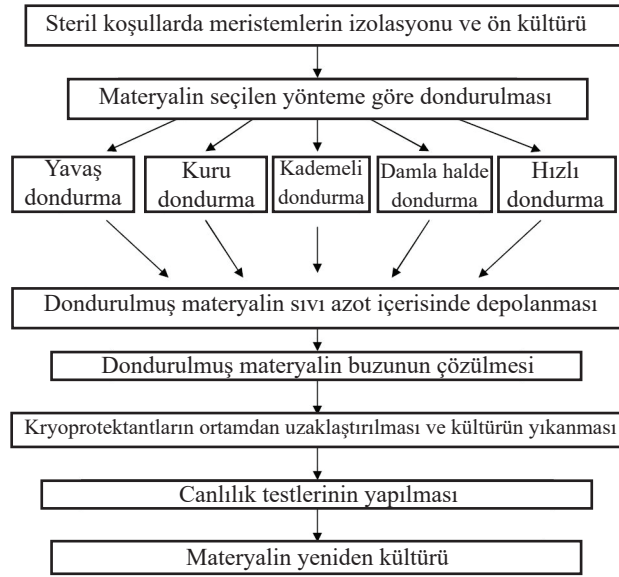
Yavaş ya da azaltılmış büyütme ile muhafazanın esası, bitki kültürlerinin canlı kalabilmelerinin izin verdiği oranda, kültür ortamının ve kültür koşullarının değiştirilmesine dayanır. Değiştirilmiş koşullarda büyüme oranı, oldukça düşük olmaktadır. Böyle bir uygulamanın başlıca avantajı ise görünebilir kültür bozulmasının kolayca fark edilebilmesidir. Bu sayede canlılık kaybından kaçınılabilir. Yavaş büyütme ile muhafaza; farklılaşan kültürler, bitkicik ya da bitki sürgünlerinde yaygın olarak uygulanırken, farklılaşmayan kültürler, kallus ve süspansiyon kültürlerinde ise daha az uygulanmaktadır [18]. Aynı zamanda bu muhafaza tekniği patojensiz bitki materyalinin elde edilmesine imkan verir ve olumsuz çevre koşulları nedeniyle kültürlerin zarar görmemesini sağlamaktadır [22]. Birçok türe ilişkin kültürler, bu tekniklerle 6 ay ile 2 yıl arasında alt kültür yapılmadan saklanabilir [10].

b- Ultra soğuk koşullarda muhafaza (kriyomuhafaza)

Bitki çeşitliliğinin korunması, genetik erozyon veya kaybolma riski taşıyan bitki tür, form ve çeşitlerinin uzun süreli güvence altına alınması işlemidir [9]. Kriyomuhafaza, bitki genetik kaynaklarının ultra düşük sıcaklıklarda (sıvı azotta: -196°C) depolanması olup, bu muhafaza metodu bitki genetik kaynaklarının güvenli ve düşük maliyetle saklanmasıdır (Bu sıcaklıkta hücre bölünmesi ve de metabolik aşamalar durur, teorikte bitki materyali değişiklik ya da modifikasyon olmaksızın sonsuz kadar muhafaza edilebilir, ayrıca kültür kontaminasyondan korunarak, çok küçük bir hacimde saklanır [23]. Bitki genetik kaynaklarının kriyoprezervasyon tekniği ile muhafazasında bitkisel materyal olarak; hücreler, protoplastlar, sürgün uçları, somatik embriyolar, tohumlar veya zigotik embriyolar, gibi kullanılabilir [20].

Kriyomuhafaza teknikleri

Çoğu canlı bitki hücresi yüksek miktarda suya sahiptir ve 0°C'nin altındaki sıcaklıklara oldukça hassastır. Bu nedenle hücreler kristal buz oluşumundan kaçınmak için dehidratasyon yapılmalıdır [24]. Ancak, aşırı kurutma da iç komponentlerin yüksek konsantrasyonu, protein denatürasyonu nedeniyle hücre membranına zarar verir. Kriyomuhafaza teknikleri bu iki zararı en aza indirebilmek için geliştirilmiştir. Kriyomuhafaza teknikleri ya dehidratasyon kaynaklı dondurulma (klasik metodlar) ya da vitrifikasyona (yeni metodlar) dayalıdır [25]. Kriyoprezervasyon tekniğinde bitki materyalinin muhafazasında uygulanan işlemler aşağı yukarı benzer olmakla birlikte, bitkilerin kriyomuhafazasında genel olarak şu yollar izlenir [26];



Şekil 1. Bitki genetik kaynaklarının muhafazasında genel kriyomuhafaza aşamaları [26]

Klasik muhafaza metotları, kimyasal kriyoprotektanlar ve yavaş dondurmaya dayanmaktadır [25]. Böyle klasik kriyomuhafaza yöntemleri üniform ve küçük birimlerden ziyade kallus ve hücre kültürlerinde başarılı olmaktadır [27, 28]. Yavaş dondurma metodu 1980'li yıllara kadar bitki genetik kaynaklarının muhafazasında uygulanan temel bir yöntemdi. Bitki genetik kaynakları (hücre ve doku) saman veya kriyotüp içine alınır ve kriyoprotektanlar ilave edilmekteydi. Bu metodun dezavantajı pek çok bitki türünde bu metodun uygulanamaması [29] ve bitki dokularının kısmi olarak ölmesi ve sonuç itibarıyla canlılığının azalmasıdır [30, 31]. Öte yandan kriyomuhafaza bitki genetik kaynaklarının uzun dönem saklanması (-196°C'de) önemli bir araçtır olmaktadır ve etkili kriyomuhafaza protokolleri pek çok sayıda bitki türleri için geliştirilmektedir. Kriyomuhafaza sadece küçük bir alan ve de çok az bakım işlemleri gerektirmektedir [32]. İlk defa Seibert 1976'da karanfil meristemlerini 0,1 mg/l IAA (İndol Asetik Asit) ve 0,5 mg/l kinetin içeren agarlı MS ortamında karanlık şartlarda 4 gün süre ile inkube etmiş, ardından 0,5 ml %5 lik DMSO içeren sıvı besin ortamı içinde 4 ml'lik kriyotüplere aktarmış ve sıvı azot içinde -196°C'de muhafaza etmiş ve başarılı sonuç almıştır [26]. Klasik kriyoprezervasyon teknikleri; tanımlanmış bir ön-dondurma sıcaklığına kadar yavaş soğutulduktan sonra, hızlı bir şekilde sıvı azota daldırma şeklinde uygulanır. Klasik kriyomuhafaza işlemleri ardışık adımları içermektedir: örneklerin ön büyütmesi, kriyokoruma, yavaş soğutma (dakikada 0.5-2.0°C) belirlenmiş bir ön-dondurma sıcaklığına kadar örnekleri sıvı azota hızlı daldırma, depolama, hızlı çözülmesi, yeniden canlandırma şeklinde iken; yeni kriyoprezervasyon teknikleri ise vitrifikasyona dayalı bir yöntemlerdir. Hücre dondurulmadan önce örnekler, donmaya karşı koruyucu ortama koyulur ve/veya havada kurumaya maruz bırakılır ve daha sonra dehidrasyon gerçekleştirilir, bunu hızlı soğutma soğutma izler. Bunun bir sonucu olarak, hücre içi buz oluşumunu etkileyen tüm engelleyici faktörlerden kaçınılmış olur [1]. 1980'li yıllarda itibaren vitrifikasyona dayanan yeni bitki kriyomuhafaza işlemleri geliştirilmiştir. Vitrifikasyon (hızlı dondurma) kristalizasyonla değil, fakat soğutma sırasında viskozitede aşırı yükselme vasıtasıyla bir sıvının katılaşmasıdır [33]. Vitrifikasyona dayalı kapsülleme ve dehidrasyon, vitrifikasyon (camsılaştırma), kapsülleme ve vitrifikasyon, dehidrasyon, ön büyütme, ön büyütme ve

dehidrasyon damlacık (droplet) dondurma şeklinde temelde 7 farklı yöntem belirlenmiştir [1]. Klasik kriyomuhafaza teknikleri karşılaştırıldığında vitrifikasyon temelli yöntemler çok hızlı dondurma gibi pratik avantajlara sahiptir. Çok hızlı dondurma (vitrifikasyon), donmanın uyarıldığı dehidrasyon koşulları altında, çeşitli hücre tiplerini içeren kompleks organ yapıları (sürgün ucu ve embriyo gibi) için daha uygundur. Buz oluşumunu engelleyerek, klasik kriyoprezervasyon tekniklerine göre işlevsel olarak (kontrollü dondurucu kullanımı gerektirmediği için) daha az karmaşıktır. Vitrifikasyona dayalı yöntemler geniş uygulanabilirliği nedeniyle daha büyük bir potansiyele sahiptir ve farklı hücre tipleri için yöntemde yalnızca küçük değişiklikler gerekir [34]. Hızlı dondurmada hücre içinde buz oluşumu engellenerek hücrelerdeki fiziksel zararın önüne geçilmiş ve hücrelerin canlı kalması sağlanmış olur.

Gelişmiş ülkelerde dondurarak muhafaza konusunda yoğun çalışmalar sürdürülmekte ve en son tekniklerle genetik kaynakların korunmasına ve muhafaza altına alınmasına çalışılmaktadır [26]. Ancak çeşitli nedenlerle ekolojideki değişimler ve toplumsal bilincin yetersizliği nedeniyle sadece ülkemizin değil insanlığın bir hazinesi olan gen kaynakları hızla yitirilmektedir. Yeni geliştirilen yüksek nitelikli çeşit ve hibritlerin kullanımının yaygınlaşması ile geçmişten günümüze kadar intikal eden populasyon ve yerel çeşitlerin hızla kaybolması sonucu ıslah çalışmalarında kullanılan genetik varyasyon daralmakta, bu da gelecekte yeni çeşitlerin geliştirilmesinde büyük bir risk oluşturmaktadır. Halen ülkemizde önemli sayıda toplanmış örnekler olmasına rağmen, bunların depolama koşullarına bağlı olarak canlılıkları hızla kaybolmaktadır. Biyoteknoloji alanında ülkemizin güçlü yanları son yıllarda önemli ölçüde kaynak ayrılmasıyla yeterli altyapının oluşması ve gen kaynakları potansiyelimiz olmasına rağmen, yetişmiş insanların etkili kullanılmaması, genetik kaynakların korunmasında bilinç eksikliği, cihaz ve sarf malzemesinde dışa bağımlılık gibi genetik kaynaklarımızın biyoteknolojik yöntemlerle muhafazasında birçok zayıf yanlarımız mevcuttur. Ayrıca iyi yetişmiş araştırmacıların yurt dışına götürülerek patentlenmesi, gen kaynaklarının zarar görmesi ve genetik kirlenme gibi tehdit unsurları da bulunmaktadır [35].

SONUÇ

Genetik çeşitliliğin temeli olan bitki genetik kaynakları, şimdiki ve gelecek nesiller için hayatın idamesinde temel kaynak niteliğindedir. Dünyada ve özellikle çok zengin bitki genetik kaynaklarına sahip ülkemizde var olan, ancak zaman içerisinde kayba uğrayan bu değerli potansiyelin korunması büyük önem taşımaktadır. Bitki genetik kaynaklarının muhafazasında yıllardan beri uygulanan yöntemlere ek olarak son yıllarda biyoteknolojik metotlardan da faydalanılmaktadır. Biyoteknoloji bitki genetik kaynaklarının korunması, dolayısıyla da sürdürülebilir tarım için vazgeçilmez bir araç olmaktadır. Birçok ülkede genetik kaynakların muhafazasında kullanılan biyoteknolojik yöntemlerin, ülkemizde daha fazla uygulama alanı bulması, bitki genetik kaynaklarımızın genetik erozyona uğramadan uzun yıllar boyunca korunmasına önemli katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Kayhan F. 2015. Kriyoprezervasyon yöntemlerinden vitrifikasyon tekniğinin ekonomik olarak önemli üzüm (*Vitis Vinifera L.*) çeşitlerinde uygulanabilirliğinin araştırılması. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi, sayfa: 1-61. Denizli.
- [2] Tan A. 2009. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Türkiye bitki genetik kaynakları çalışmaları. <http://emanetçiler.blogspot.com.tr/search?q=bitki+genetik+kaynaklar%C4%B1>
- [3] Eser V. 2016. Tohumun izinde. <http://susbir.org.tr/index.php/haberler/431-tohumun-izinde-isimli-sosyal-sorumluluk-projesi-tanitim-toplantisi-antalya-da-yapildi>.
- [4] Tan A. 2013. Bitki genetik kaynaklarının önemi ve korunması. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. Teknik Broşür. No:1. http://arastirma.tarim.gov.tr/etae/Belgeler/TeknikBrosur/BGK_Korunmas%C4%B1.pdf
- [5] Niksarlı-İnal F. 2013. Tabiatıta mevcut bitki türlerinin korunması. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. Teknik Broşür No:2. http://arastirma.tarim.gov.tr/etae/Belgeler/TeknikBrosur/BGK_do%C4%9Ffal%20bitkiler.pdf.
- [6] Baran M, Özçelik F. 2006. Biyogüvenlik ve Türkiye’de uygulanabilme düzeyi. Türkiye 9. Gıda Kongresi. 24-26 Mayıs, Bolu, 849-850.
- [7] Altındağ D, Akgün İ. 2015. Bitki genetik kaynakları ve tahillardaki durumu. Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 12(1): 147-153.
- [8] Terzioğlu E. 2007. Türkiye’nin biyolojik çeşitliliğine ilişkin genel bilgi, biyolojik çeşitliliği koruma çalışmaları ve biyolojik çeşitlilik sözleşmesi ve ulusal biyolojik çeşitlilik stratejisi ve eylem planı (Ubsep). <http://www.nuhungemisi.gov.tr/DosyaRaporSunum/Belgeler/bb951776-e874-40ce-842b-d90ae82b6381.pdf>.
- [9] Gökdoğan-Yılmaz E, Kaya E. 2015. Bitki germplazmalarının korunmasında biyoteknolojik yöntemlerin ve biyoçeşitliliğin belirlenmesinde moleküler markör sistemlerinin kullanımı. Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi. 6 (Özel Sayı 2): 98-107.
- [10] Tan A, Taşkın T, İnal A. 2013. Bitki genetik kaynakları ve biyoteknoloji. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. Teknik Broşür. No: 6. http://arastirma.tarim.gov.tr/etae/Belgeler/TeknikBrosur/BGK_biyoteknoloji.pdf.
- [11] Karagöz A. 2009. Genetiği değiştirilmiş organizmaların bitkisel biyoçeşitlilik üzerine olası etkileri. Kırsal Çevre Yılığ 2009. 7-19.

[12] Varol İ. 2007. Bazı turuncuğil türlerinde embriyogenik kallusların in vitro muhafazası ve genetik kararlılıklarının RAPD markırları ile araştırılması. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, sayfa: 1-80. Adana.

[13] İnal A. 2013. Yerel çeşitlerin önemi ve korunması. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. Teknik Broşür No:3. http://arastirma.tarim.gov.tr/etae/Belgeler/TeknikBrosur/BGK_yerelcesitler.pdf.

[14] Akpınar G. 2006. Embriyonik kültür yöntemiyle yetiştirilen ve soğukta muhafaza edilen ayçiçeği (*Helianthus Annuus L.*) bitkilerinde karyolojik ve anatomik incelemeler. Trakya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, sayfa:1-68, Edirne.

[15] Engelmann F, Engels JM. 2002. Technologies and strategies for ex situ conservation. In: Managing Plant Genetic Diversity Proceedings of an International Conference, Kuala Lumpur, Malaysia, 12-16 June. (ed. Engels JMM, Ramanatha Rao V, Brown AHD, Jackson MT), 89-104.

[16] Anonim 1992. Tarım ve Köyişleri Bakanlığında bitki genetik kaynaklarının toplanması muhafazası ve kullanılması hakkında yönetmelik. T.C. Resmi Gazete 15 ağustos, 21316:4. <http://www.resmigazete.gov.tr/arsiv/21316.pdf>.

[17] Balkaya A, Yanmaz R. 2001. Bitki genetik kaynaklarının muhafaza imkanları ve tohum gen bankalarının çalışma sistemleri. Ekoloji Çevre Dergisi. 39: 25-30.

[18] Emeklier HY. 2001. Germplazm muhafazası. In: Bitki Biyoteknolojisi (Doku Kültürü ve Uygulamaları). (ed. Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S.), 282-323, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.

[19] Paunescu A. 2009. Biotechnology for endangered plant conservation: a critical overview. Romanian Biotechnological Letters. 14(1):4095-4103.

[20] Rao NK. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of Biotechnology. 3(2):136-145.

[21] Marco-Medina A, Casas JL. 2012. Polyamine content during minimal growth storage of *Thymus moroderi* explants. *Biologia Plantarum*. 56:590-594.

[22] Withers LA, Engelmann F. 1997. In vitro conservation of plant genetic resources. In: *Biotechnology in Agriculture* (ed. Altman A), pp. 57-88, Marcel Dekker Inc., New York.

[23] Engelmann F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant*. 40(5): 427-433.

[24] Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and applications. *American Journal of Physiology*. 247:125-142.

[25] Gonzalez-Benito ME, Clavero-Ramirez I, Lopez-Aranda JM. 2004. Review. the use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2(3):341-351.

[26] Taşkın T. 2008. Bitki genetik kaynakların korunmasında dondurarak muhafaza (cryopreservation) teknikleri ve uygulamaları. *Anadolu Dergisi*. 18(2):62-78.

[27] Schrijnemakers EWM, Van Iren F. 1995. A two step or equilibrium freezing procedure for the cryopreservation of plant cell suspensions. In: *cryopreservation and freeze-drying protocols*. (ed. Day JG, Pennington MW.), Vol. 38, pp. 103-111. Humana Press, Totowa, NJ.

[28] Lynch PT. 2000. Applications of cryopreservation to the long-term storage of dedifferentiated plant cultures. In:

conservation of plant genetic resources in vitro applications and limitations (ed. Razdan MK, Cocking EC.), Vol 2. 66-86. Science Publishers Inc., Enfield, NH.

[29] Kami D. 2012. Cryopreservation of plant genetic resources. <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/31241.pdf>.

[30] Grout BWW, Henshaw GG. 1980. Structural observations on the growth of potato shoot-tip cultures after thawing from liquid nitrogen. *Annals of Botany*. 46(2):243-248.

[31] Haskins RH, Kartha KK. 1980. Freeze preservation of pea meristems: cell survival. *Canadian Journal of Botany*. 58(8):833-840.

[32] Niino T, Arizaga MV. 2015. Cryopreservation for preservation of potato genetic resources. *Breeding Science*. 65(1): 41-52.

[33] Fahy GM, Macfarlane DR, Angell CA, Meryman HT. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21:407-426.

[34] Engelmann F. 1997. In vitro conservation methods. In: *Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use* (ed. Ford-Lloyd BV, Newbury HJ, Callow JA.), 119-162, Wallingford: CABI, UK.

[35] Anonim 2003. TÜBİTAK vizyon 2023 bilim ve teknoloji öngörüsü projesi tarım ve gıda paneli son rapor temmuz 2003. https://www.tubitak.gov.tr/tubitak_content_files/vizyon2023/tg/tarimgida_son_surum.pdf.