

Perkembangan Aplikasi Teknik Kriopreservasi untuk Konservasi dan Mendukung Program Pemuliaan Tanaman

Ika Roostika

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; E-mail: ikatambunan@yahoo.com

Diajukan: 26 Desember 2012; Diterima: 5 Maret 2013

ABSTRACT

Development of the Application of Cryopreservation Techniques for Conservation and Supporting Plant Breeding Program. Ika Roostika. In the beginning, cryopreservation technique was primarily used for germplasms long-term storage as passive collection because cell division and metabolism process can be stopped at super low temperature, commonly in liquid nitrogen. The technique is suitable for vegetative propagated plants and recalcitrant seeds. Recently, its application is extending for storing many species and orthodox seeds. In this paper, the development of cryopreservation application is discussed. In Indonesia, cryopreservation is being studied but the application of cryopreservation has been significantly developed abroad. The application of cryopreservation technique is not only for preserving passive collections but also for storing active collections, including to provide plant materials for hybridization, cellular engineering, genetic transformation, as well as pathogens eradication or cryotherapy. It is concluded that cryopreservation plays an important role in conventional and modern plant breeding program.

Keywords: Cryopreservation, passive collection, active collection, cryotherapy, plant breeding.

ABSTRAK

Perkembangan Aplikasi Teknik Kriopreservasi untuk Konservasi dan Mendukung Program Pemuliaan Tanaman. Ika Roostika. Kriopreservasi awalnya diterapkan untuk penyimpanan plasma nutfah jangka panjang sebagai koleksi pasif karena pembelahan sel dan proses metabolisme dapat dihentikan pada kondisi suhu sangat rendah, di dalam nitrogen yang umumnya berfase cair. Teknik tersebut sesuai untuk diterapkan pada tanaman yang berbiak secara vegetatif dan berbenih rekalsitran, namun saat ini penerapannya semakin luas untuk berbagai macam tanaman, bahkan yang berbenih ortodoks. Naskah ini mendiskusikan tentang perkembangan aplikasi teknik kriopreservasi. Di Indonesia, teknik kriopreservasi masih merupakan studi sedangkan di mancanegara telah mengalami perkembangan yang nyata. Teknik tersebut tidak hanya diterapkan untuk penyimpanan koleksi pasif, melainkan juga dikembangkan untuk penyimpanan koleksi aktif termasuk penyediaan materi untuk persilangan, rekayasa seluler dan rekayasa genetika, serta untuk eradikasi patogen atau krioterapi. Dengan demikian,

dapat disimpulkan bahwa teknik kriopreservasi menduduki posisi penting dalam program pemuliaan secara konvensional maupun bioteknologi.

Kata kunci: Kriopreservasi, koleksi pasif, koleksi aktif, krioterapi, pemuliaan tanaman.

PENDAHULUAN

Teknik kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan pada suhu sangat rendah dengan menggunakan nitrogen. Pembelahan sel dan proses metabolisme di dalam sel, jaringan, atau organ tanaman dapat dihentikan dalam waktu yang tidak terbatas melalui kriopreservasi (Bhojwani dan Razdan, 1983; Ashmore, 1997). Kondisi suhu penyimpanan secara kriopreservasi dalam nitrogen sangat rendah, yaitu -160 hingga -180°C pada fase uap, bahkan sampai -196°C pada fase cair dan di bawah -200°C pada fase terpadatkan (*solidified*) (Grout, 1995; Towill dan Jarret, 1992). Teknik kriopreservasi sangat potensial dikembangkan untuk penyimpanan plasma nutfah tanaman dalam jangka panjang hingga puluhan tahun (Bajaj, 1979; Withers, 1985; Towill dan Jarret, 1992).

Secara teknis, kriopreservasi telah berkembang dari teknik klasik yang didasarkan pada *free-induced dehydration of the cell* melalui pembekuan lambat dan teknik baru yang didasarkan pada *vitrification* melalui pembekuan cepat (Kartha, 1985; Ashmore, 1997). Berbagai macam teknik baru tersebut telah berkembang (Roostika dan Mariska, 2004), antara lain vitrifikasi, enkapsulasi-dehidrasi, enkapsulasi-vitrifikasi, desikasi, pratumbuh-desikasi, droplet, dan droplet-vitrifikasi. Secara umum, tahapan teknik kriopreservasi meliputi pratumbuh, prakultur, pemuatan (*loading*), dehidrasi, pembekuan, pelelehan, penggantian muatan (*deloading* atau *unloading*), pemulihan, dan regenerasi.

Teknik kriopreservasi tidak hanya menjadi bahan yang menarik untuk diteliti, namun telah diterapkan secara rutin di beberapa pusat penelitian di berbagai negara. *International Transit Center* (ITC) yang dahulu dikenal sebagai INIBAB (*International Network for the Improvement of Banana and Plantain*) di Belgia telah

menerapkan teknik kriopreservasi secara rutin terhadap tanaman pisang (Panis, 2009). Demikian pula, *International Centre for Tropical Agriculture* (CIAT) di Kolombia, *Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung* (IPK) di Jerman, *International Potato Center* (CIP) di Peru, *National Institut of Agrobiological Science* (NIAS) di Jepang, dan *National Clonal Germplasm Repository* di Amerika Serikat telah rutin menyimpan ubi kayu, kentang, dan tanaman buah-buahan secara kriopreservasi di bank gen (Golmirzaie dan Panta, 2000; Reed *et al.*, 2000; Leunufna, 2004; Okuno *et al.*, 2005; Keller *et al.*, 2008).

Dari sisi aplikasi, kriopreservasi telah mengalami perkembangan yang nyata. Kriopreservasi tidak hanya diterapkan untuk penyimpanan koleksi pasif. Dewasa ini, teknik tersebut dikembangkan untuk penerapan yang lebih luas, antara lain penyimpanan koleksi aktif, penyediaan materi untuk persilangan, rekayasa seluler dan transformasi genetik, juga untuk eradikasi patogen dan penyimpanan materi hasil perbaikan genetik.

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen) merupakan institusi di bawah Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian yang memiliki mandat untuk melestarikan sumber daya genetik pertanian. Teknik kriopreservasi perlu dikembangkan dan diaplikasikan untuk mendukung program pemuliaan tanaman, baik secara konvensional maupun bioteknologi.

Naskah ini secara khusus membahas tentang perkembangan aplikasi teknik kriopreservasi, khususnya di mancanegara dan perkembangan studi kriopreservasi di Indonesia serta prospek pada masa yang akan datang. Melalui diskusi tersebut maka diketahui peran penting dari teknik kriopreservasi untuk mendukung program pemuliaan, baik secara konvensional maupun bioteknologi.

APLIKASI TEKNIK KRIOPRESERVASI

Kriopreservasi untuk Penyimpanan Koleksi Pasif

Pada tanaman yang berbiak secara vegetatif, penyimpanan plasma nutfah secara *ex situ* dalam kondisi *in vitro* lebih disarankan daripada penyimpanan di lapang karena lebih menghemat area, waktu, tenaga, dan biaya serta lebih rendah risikonya terhadap turunnya diversitas genetik yang disebabkan oleh cekaman biotik dan abiotik (Mariska *et al.*, 1996). Penyimpanan *in vitro* dapat dilakukan melalui tiga cara, yaitu penyimpanan dalam keadaan tumbuh, secara pertumbuhan minimal dan kriopreservasi (Mariska *et al.*, 1996).

Permasalahan yang muncul pada penyimpanan dalam keadaan pertumbuhan aktif adalah penuaan fisiologis, kehilangan vigoritas, dan totipotensi (*total potential genetic*) serta munculnya keragaman somaklonal (Kaeppeler *et al.*, 2000). Melalui kriopreservasi, biakan tidak perlu disubkultur secara frekuentif atau dikulturkan dalam periode yang lama sehingga totipotensi sel tetap terjamin dan risiko terjadinya kontaminasi akan menurun yang berakibat pada terpeliharanya koleksi tanpa kekhawatiran akan rusak atau hilangnya materi genetik yang disimpan. Selain itu, pengurangan frekuensi subkultur akan menurunkan risiko terjadinya perubahan genetik bahan tanaman yang disimpan (Sakai, 1993). Untuk menghindari perubahan genetik, disarankan menggunakan struktur yang telah terdiferensiasi sebagai bahan yang disimpan secara kriopreservasi. Menurut Sakai (1993), kriopreservasi jaringan meristematik merupakan teknologi penting dalam penyimpanan plasma nutfah jangka panjang karena hanya diperlukan ruang yang minimum dan tidak terjadinya perubahan genetik. Leunufna dan Keller (2003) juga menjelaskan bahwa kriopreservasi meristem pucuk memungkinkan diperolehnya tanaman yang *true-to-type* (sesuai dengan induknya).

Plasma nutfah yang disimpan secara kriopreservasi berstatus sebagai koleksi dasar (Kantha, 1985; González-Benito *et al.*, 2004) atau koleksi pasif, yaitu koleksi tanaman yang disimpan dalam jangka waktu yang sangat lama dan hanya akan digunakan jika terjadi hal-hal yang luar biasa. Dalam hal ini, koleksi pasif bertindak sebagai *back up* atau duplikat atas koleksi aktif, baik dalam kultur *in vitro* maupun koleksi di lapang. Berbagai macam teknik kriopreservasi telah diterapkan untuk penyimpanan jangka panjang plasma nutfah tanaman yang berbiak vegetatif, berbenih rekalsitran, semi rekalsitran, dan ortodoks (Tabel 1).

Beberapa pusat penelitian di mancanegara telah menerapkan teknik kriopreservasi untuk penyimpanan koleksi pasif, antara lain ITC di Belgia, CIAT di Kolombia, IPK di Jerman, CIP di Peru, dan NIAS di Jepang. Di Indonesia, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) merupakan perintis dilakukannya studi kriopreservasi yang diawali pada tahun 1992 pada tanaman kehutanan, hortikultura, dan pangan, yaitu akasia, *Paraserianthes falcataria*, *Pometia pinnata*, leci, lengkung, jeruk, bawang putih, kedelai, dan jagung (Sudarmonowati, 2000). Di Badan Litbang Pertanian, khususnya BB Biogen, status teknik kriopreservasi tanaman juga masih dalam taraf penelitian. Teknik kriopreservasi pada beberapa macam tanaman telah diteliti, antara lain pule pandak (Prasetyorini, 1999), ubi jalar (Roostika *et al.*, 2004b; 2004c), ubi kayu

Tabel 1. Berbagai macam teknik kriopreservasi dan tipe eksplan yang telah diterapkan pada berbagai macam tanaman.

Tanaman	Eksplan yang disimpan	Teknik kriopreservasi	Pustaka
Monokotil:			
Asparagus	Tunas pucuk	Droplet-vitrifikasi	Nishizawa <i>et al.</i> (1993); Mix-Wagner <i>et al.</i> (2000)
Pisang	Suspensi sel	Droplet-vitrifikasi	Panis <i>et al.</i> (2000); Panis dan Thinh (2009)
Tebu	Tunas apikal	Enkapsulasi-dehidrasi	Paulet <i>et al.</i> (1993)
Bawang putih	Meristem	Vitrifikasi	Sudarmonowati (2001)
Nanas	Tunas apikal	Enkapsulasi-vitrifikasi	Gámez-Pastrana <i>et al.</i> (2004); Huang <i>et al.</i> (2004)
Dikotil herba:			
Ubi jalar	Tunas apikal	Vitrifikasi, enkapsulasi-vitrifikasi	Towill dan Jaret (1992)
Kentang	Meristem	Enkapsulasi-vitrifikasi	Hirai dan Sakai (1999a)
Mentha	Tunas apikal	Enkapsulasi-vitrifikasi	Hirai dan Sakai (1999b)
Krisan	Tunas apikal, meristem	Enkapsulasi-dehidrasi, droplet-vitrifikasi	Halmagyi <i>et al.</i> (2004)
Dikotil berkayu:			
Ubi kayu	Tunas apikal	Vitrifikasi	Escobar <i>et al.</i> (1997)
Apel	Tunas apikal	Vitrifikasi	Niino <i>et al.</i> (1992)
Jeruk	Sel nuselar	Vitrifikasi	Sakai <i>et al.</i> (1990)
Pir	Tunas apikal	Vitrifikasi	Niino <i>et al.</i> (1992)
Berbenih rekalsitran:			
Kopi	Biji	Desikasi	Dussert <i>et al.</i> (2000)
Berbenih <i>intermediate</i>:			
Damar	Biji	Vitrifikasi	Djam'an <i>et al.</i> (2006)
Berbenih ortodoks:			
Uwi	Tunas pucuk	Vitrifikasi, droplet-vitrifikasi	Leunufna dan Keller (2003)
Jagung	Biji	Desikasi	Reed (2008)
Wijen	Biji	Desikasi	Priadi (2006)

(Roostika *et al.*, 2004a), purwoceng (Roostika *et al.*, 2007; 2008), dan pisang (Roostika *et al.*, 2011).

Kriopreservasi untuk Penyimpanan Koleksi Aktif

Dewasa ini, teknik kriopreservasi tidak hanya diterapkan untuk mengkoleksi plasma nutfah dalam waktu yang lama sebagai koleksi pasif (Kartha, 1985), namun juga telah diterapkan untuk penyimpanan koleksi aktif, terutama dalam bentuk kalus embriogenik, sel-sel embriogenik atau suspensi sel (Panis, 2009). Koleksi aktif adalah koleksi yang sewaktu-waktu dapat diperbanyak kembali atau secara rutin dapat digunakan untuk berbagai macam keperluan, seperti produksi benih secara masal maupun perbaikan genetik tanaman.

Terdapat beberapa faktor yang menyebabkan kriopreservasi perlu diterapkan pada biakan (kalus atau jaringan) embriogenik. Pembentukan biakan embriogenik sulit dilakukan, terutama karena tergantung pada genotipe yang digunakan (*genotype dependent*) (Panis, 2009). Tingkat kesulitan tersebut semakin tinggi pada tanaman monokotil dan berkayu (Mariska, komunikasi pribadi). Biakan embriogenik yang telah diperoleh perlu dipelihara melalui subkultur secara frekuentif, yang mengindikasikan pemborosan tenaga, waktu, dan biaya serta membuka peluang rusaknya biakan oleh karena kontaminasi (Panis 2009; Zeliang dan Pattanayak, 2011). Tanpa pemeliharaan melalui tindakan subkultur maka biakan embriogenik akan mudah mengalami pencoklatan dan kematian.

Kapasitas regenerasi biakan embriogenik dapat menurun atau bahkan hilang sama sekali (Panis, 2009; Zeliang dan Pattanayak, 2011) dan perubahan genetik dapat terjadi dengan meningkatnya frekuensi subkultur (Zeliang dan Pattanayak, 2011). Banyak jenis tanaman yang bersifat rekalsitran terhadap perlakuan transformasi, yaitu dengan efisiensi transformasi dan daya regenerasi yang rendah (Kumar *et al.*, 2005; Panis *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005). Melalui aplikasi teknik kriopreservasi maka biakan embriogenik dapat tersedia dan dimanfaatkan sepanjang waktu tanpa memerlukan tindakan inisiasi dan subkultur.

Di mancanegara, kajian kriopreservasi kalus embriogenik, suspensi sel, dan embrio somatik telah dilakukan pada beberapa macam tanaman (Tabel 2). Di Indonesia, kajian tersebut masih terbatas pada tanaman purwoceng (Roostika *et al.*, 2008) dan pisang (Roostika *et al.*, 2011). Dengan mempertimbangkan pentingnya biakan embriogenik maka studi kriopreservasi materi tersebut masih perlu dilakukan pada berbagai jenis tanaman lainnya.

Konservasi secara kriopreservasi juga perlu dilakukan pada transforman dan materi tanaman hasil perbaikan genetik tanaman (Wang *et al.*, 2012) karena: (1) gen-gen yang berharga dapat digunakan untuk pengembangan kultivar baru, (2) biakan embriogenik dan protoplas dapat mengefisienkan sistem regenerasi selama transformasi genetik, (3) regenerasi tanaman dari sel yang telah dikriopreservasi dapat meningkat,

Tabel 2. Berbagai macam tanaman dan eksplan yang telah disimpan secara kriopreservasi dengan menggunakan berbagai macam teknik.

Tanaman	Bahan tanaman yang disimpan	Teknik kriopreservasi	Pustaka
Pepaya	<i>Pro-embryogenic mass</i>	Enkapsulasi-dehidrasi, vitrifikasi	Dhekney (2004)
Jeruk	Kalus embriogenik	Pembekuan lambat	Perez <i>et al.</i> (1999)
Apokat	Kalus embriogenik	Pembekuan lambat dan vitrifikasi	Efendi dan Litz (2003)
Kelapa sawit	Embrio somatik	Desikasi	Dumet <i>et al.</i> (1993)
Pisang	Kalus embriogenik, suspensi sel	Vitrifikasi, enkapsulasi-vitrifikasi	Panis dan Thinh, (2009)
Uwi	Kalus embriogenik	Enkapsulasi-vitrifikasi	Yin dan Hong 2010
Coklat	Embrio somatik	Enkapsulasi-dehidrasi	Fang dan Wetten (2011)

(4) materi transgenik dapat disimpan dengan aman sebelum dianalisis dan dievaluasi lebih lanjut, dan (5) stok benih dapat disiapkan secara lebih mantap untuk komersialisasi produk rekayasa genetika. Melalui aplikasi teknik kriopreservasi maka pemeliharaan berbagai macam transforman dapat menjadi lebih efisien (hemat area, waktu, tenaga, dan biaya). Biakan embriogenik dan protoplas merupakan materi yang ideal untuk ditransformasi karena dapat menghindarkan dari terbentuknya tanaman khimera yang sangat tidak dikehendaki terjadi. Maturasi embrio somatik bahkan dapat distimulasi melalui proses dehidrasi selama tahapan kriopreservasi sehingga daya regenerasi sel menjadi meningkat. Melalui aplikasi teknik kriopreservasi, materi transgenik dapat disimpan, dianalisis, dan dievaluasi kapan saja ketika diperlukan. Selain itu, perbanyakan tanaman secara masal atau produksi benih sintetik akan mudah dilakukan, terutama ketika digunakan biakan embriogenik sebagai eksplan dalam kriopreservasi.

Pada hibridisasi aseksual atau somatik dan rekayasa seluler lainnya (seperti variasi somaklonal dan seleksi *in vitro*) serta rekayasa genetika terbuka peluang dihasilkannya tanaman dengan berbagai sifat yang unik dan baru. Konservasi materi genetik tersebut akan lebih efisien jika dikonservasi secara kriopreservasi karena: (1) materi genetik dapat disimpan secara lebih dini sebelum ditanam di lapang, (2) materi genetik dapat disimpan dalam waktu yang sangat lama (puluhan tahun), (3) jumlah materi genetik yang dapat dikelola secara kriopreservasi lebih banyak dibandingkan dengan teknik konservasi lainnya, (4) diversitas genetik dapat dipertahankan karena teknik kriopreservasi mampu menjamin stabilitas genetik dari bahan tanaman yang disimpan, (5) kriopreservasi lebih menghemat area, tenaga, waktu, dan biaya.

Di Indonesia, khususnya BB Biogen, transgen di dalam transforman belum disimpan secara kriopreservasi. Walaupun belum pernah diaplikasikan, penguasaan teknik kriopreservasi sangat penting dilakukan. Ketika diperoleh materi genetik yang berlimpah maka teknik kriopreservasi yang telah dikuasai akan

sangat berguna dalam mempertahankan ketersediaan transforman yang telah dihasilkan dari rekayasa genetika.

Kriopreservasi untuk Penyimpanan Materi Pemuliaan

Kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan yang efektif untuk penyediaan materi tanaman untuk persilangan (hibridisasi seksual), rekayasa seluler (secara kultur *in vitro*), dan rekayasa genetika (transformasi genetik) (Wang *et al.*, 2012). Plasma nutfah tanaman yang tersimpan secara kriopreservasi merupakan sumber daya genetik yang dapat dimanfaatkan sebagai tetua dalam persilangan untuk perakitan varietas unggul. Genotipe yang saat ini belum memiliki nilai komersial yang tinggi, dapat menjadi sumber tetua yang sangat potensial pada masa mendatang setelah terkarakterisasi beberapa sifat unggulnya. Teknik kriopreservasi juga bermanfaat untuk menyimpan varietas lokal yang saat ini belum dikembangkan secara luas. Varietas tersebut kemungkinan mengandung *minor allele frequency* (MAF) yang semakin banyak dieksplorasi dewasa ini melalui riset genomik.

Selama proses persilangan, kadang-kadang ditemui kendala, seperti tidak sinkronnya waktu anthesis dan reseptif, misalnya pada tanaman *Gymnosperma* (pinus dan cemara) yang memerlukan waktu hingga bulanan atau tahunan sesuai dengan siklus sporogenesis dan gametogenesis. Penyimpanan polen secara kriopreservasi merupakan salah satu strategi untuk mengatasi kendala tersebut. Polen yang telah dikriopreservasi tersebut dapat dilelehkan dan digunakan untuk menyerbuki bunga betina yang reseptif. Kajian penyimpanan polen secara kriopreservasi telah dilakukan pada tanaman mangga, pepaya, jeruk, anggur, gladiol, mawar, anggrek, tomat, dan terung (Reed, 2008; Vendrame *et al.*, 2008). Secara teknis, uji viabilitas polen perlu dilakukan terlebih dahulu untuk memastikan tingginya viabilitas polen sebelum dikriopreservasi. Uji viabilitas polen dapat dilakukan, misalnya dengan mengecambahkan polen dalam media tertentu melalui metode *hanging drops* dan suspensi atau

mengujinya dengan larutan kalium iodida (KI). Formulasi media perkecambahan sangat beragam, mulai dari yang sederhana (hanya mengandung sukrosa) hingga yang kompleks (mengandung sukrosa, *boric acid*, *polyethylene glycol*, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dan KNO_3). Selanjutnya, polen *viable* dienkapsulasi dalam kapsul gelatin, lalu kapsul dimasukkan dalam kantong aluminium dan disegel dalam keadaan kedap udara (Reed, 2008). Walaupun metodenya cukup mudah, kriopreservasi polen belum berkembang di Indonesia dan masih terbatas dilakukan pada beberapa tanaman kehutanan (Sudarmonowati, 2000).

Selain polen, materi tanaman lainnya dapat dikonservasi untuk penyediaan materi bagi rekayasa seluler dan molekuler, yaitu meristem, tunas pucuk, kalus embriogenik, embrio somatik, suspensi sel, dan protoplas. Kemudahan untuk direkayasa, kemudahan untuk diregenerasikan, dan rendahnya risikonya variasi somaklonal merupakan beberapa faktor yang perlu dipertimbangkan dalam penyediaan materi tanaman untuk rekayasa seluler dan molekuler.

Beberapa studi kriopreservasi memperlihatkan tingkat keberhasilan yang tinggi. Kalus embriogenik dan protoplas yang telah dikriopreservasi bahkan memiliki daya regenerasi yang lebih tinggi daripada yang tidak dikriopreservasi setelah perlakuan transformasi (Cornejo *et al.*, 1995; Haggman *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002). Hal ini mungkin disebabkan oleh proses dehidrasi selama tahapan kriopreservasi yang berakibat pada induksi maturasi embrio somatik. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa teknik kriopreservasi dapat meningkatkan keberhasilan pembentukan tanaman transgenik.

Kriopreservasi untuk Eradikasi Patogen

Beberapa macam patogen tanaman hanya dapat tumbuh dan memperbanyak diri di dalam jaringan tanaman hidup (bersifat biotrof) sehingga disebut sebagai parasit obligat, seperti viroid, virus, mikoplasma (fitoplasma), dan beberapa jenis bakteri serta jamur (Agrios, 1988). Asosiasi yang demikian dekat menyebabkan patogen tersebut sulit dieliminasi dari jaringan tanaman inangnya.

Teknik kultur apeks dan kultur meristem sudah umum diterapkan untuk eliminasi virus, namun teknik tersebut memiliki beberapa kelemahan, yaitu memerlukan isolasi meristem yang berukuran sangat kecil di bawah mikroskop (Wang dan Valkonen, 2012), memerlukan waktu yang lebih lama (Panis, 2009; Schneider, 2010), memerlukan ketrampilan khusus dalam isolasi meristem (Schneider, 2010), dan jumlah eksplan yang dapat diisolasi terbatas (Panis 2009), eks-

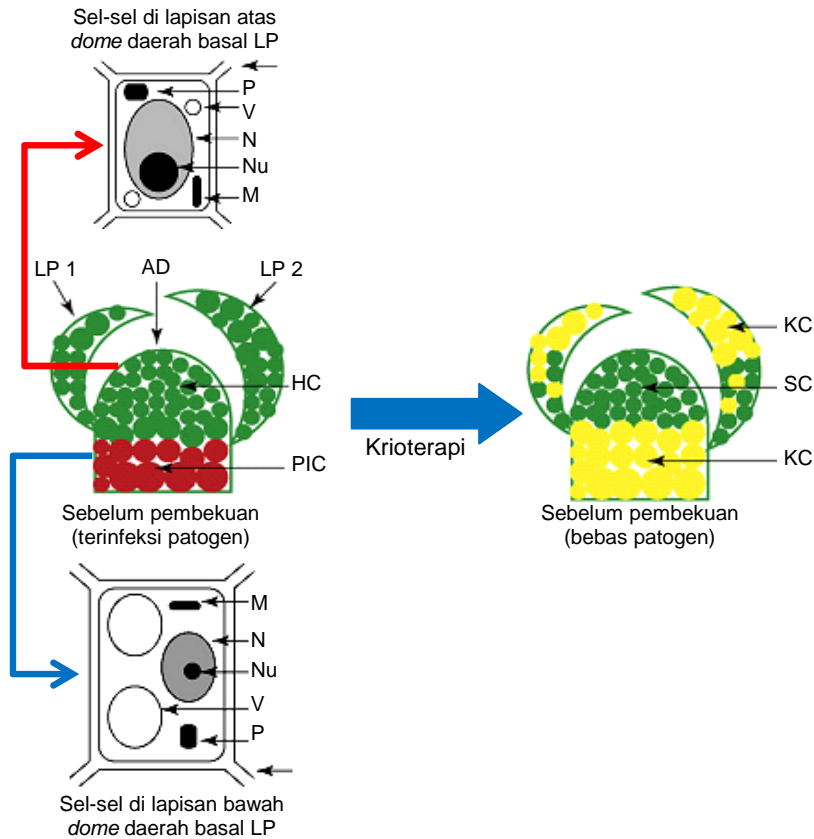
plan sulit diregenerasikan (Wang dan Valkonen, 2012), serta efektivitas eradikasi virus lebih rendah (Wang *et al.*, 2003; Wang dan Valkonen, 2012).

Dewasa ini, dilaporkan bahwa teknik kriopreservasi juga dapat diterapkan untuk eradikasi patogen yang bersifat obligat sehingga disebut sebagai teknik krioterapi. Teknik tersebut tidak hanya mampu meng-eradikasi virus, namun juga fitoplasma, bakteri, dan jamur parasit obligat. Kemampuannya untuk meng-eradikasi patogen bahkan jauh lebih efektif daripada teknik kultur meristem. Dilaporkan bahwa virus tertentu, seperti *raspberry bushy dwarf virus* (RBDV) nyaris tidak dapat dieliminasi melalui kultur apeks yang dikombinasikan dengan termoterapi. Eliminasi virus RBDV berhasil dilakukan dengan mengkombinasikan teknik krioterapi dan termoterapi (Wang dan Valkonen, 2012). Teknik krioterapi mampu menghasilkan bibit bebas virus yang sewaktu-waktu siap diperbanyak secara masal. Secara skematis, proses eradikasi virus secara krioterapi pada apeks ditampilkan pada Gambar 1.

Digambarkan bahwa patogen banyak terdapat pada lapisan sel di bagian bawah *dome* (berwarna merah) dan lapisan sel tersebut mati setelah pembekuan. Sel-sel yang bertahan hidup adalah yang berada di daerah *dome* dan bagian atas primordia daun (berwarna hijau) sehingga tanaman yang dihasilkan dari area tersebut secara otomatis terbebas dari infeksi virus. Sel-sel di daerah *dome* mampu bertahan hidup pada saat pembekuan dalam nitrogen cair karena sel-sel tersebut memiliki ukuran vakuola yang kecil. Menurut Gnanapragasam dan Vasil (1992), sel yang mempunyai vakuola berukuran kecil mengandung air yang relatif lebih sedikit sehingga menentukan keberhasilan kriopreservasi. Secara kriopreservasi, tindakan prakultur dengan menggunakan manitol atau sorbitol dapat menyebabkan penurunan volume vakuola sel dengan cara redistribusi vakuola sentral yang besar menjadi sejumlah vesikel yang lebih kecil.

Aplikasi teknik krioterapi relatif masih baru. Hingga saat ini, jenis tanaman yang dikrioterapi di mancanegara masih terbatas pada tanaman pisang, jeruk, anggur, kentang, dan ubi jalar. Jenis patogen yang dieradikasi secara krioterapi juga masih terbatas, namun efektivitas eradikasi patogen dapat mencapai 100% (Tabel 3).

Teknik krioterapi belum pernah diterapkan di Indonesia. Oleh karena itu, peluang aplikasi dan pengembangan teknik tersebut masih terbentang sangat luas, terutama pada tanaman yang diperbanyak secara vegetatif yang sering terinfeksi oleh patogen obligat. Menurut Feng *et al.* (2011), dengan mengkon-



Sumber: Wang dan Valkonen (2012).

Gambar 1. Ilustrasi anatomi sel-sel pada daerah apeks selama proses eliminasi virus melalui teknik krioterapi: *leaf primordia* atau primordia daun (LP1 dan LP2), *apical dome* (AD), *pathogen infected cells* atau sel-sel yang terinfeksi patogen (PIC), *healthy cells* atau sel-sel yang sehat (HC), *killed cells* atau sel-sel yang mati (KC), *survived cells* atau sel-sel yang bertahan hidup (SC), proplastida (P), vakuola (V), nukleus (N), nukleolus (Nu), dan mitokhondria (M).

Tabel 3. Berbagai jenis patogen yang telah dieradikasi secara krioterapi.

Tanaman	Patogen ^a	Teknik kriopreservasi	Efikasi ^b (%)
Pisang	CMV/BSV	Vitrifikasi	33
Jeruk	HLB	Vitrifikasi	98
Anggur	GVA	Enkapsulasi-vitrifikasi	89
Kentang	PLRV/PVY	Enkapsulasi-vitrifikasi	93
Kentang	PLRV/PVY	Droplet-vitrifikasi	90
Ubi jalar	SPCSV/SPFMV	Enkapsulasi-vitrifikasi	100
Ubi jalar	SPLL	Enkapsulasi-vitrifikasi	100

Sumber: Wang dan Valkonen (2012).

^a BSV = *banana streak virus*, CMV = *cucumber mosaic virus*, GVA = *grapevine virus A*, HLB = *huanglongping bacterium*, PLRV = *potato leaf roll virus*, PVY = *potato virus Y*, SPCSV = *sweet potato chlorotic stunt virus*, SPFMV = *sweet potato feathery mottle virus*, SPLL = *sweet potato little leaf phytoplasma*. ^b Persentase tunas pucuk yang bebas patogen.

firmani status fitosanitari dan stabilitas genetik dari tanaman yang beregenerasi maka kriopreservasi apeks dapat dipertimbangkan sebagai metode yang aman untuk pertukaran plasma nutfah tanaman antar daerah dan negara.

PENTINGNYA APLIKASI TEKNIK KRIOPRESERVASI DI INDONESIA

Penyimpanan secara kriopreservasi lebih menghemat area, tenaga, dan waktu untuk pemeliharaan (Kaczmarczyk *et al.*, 2011). Dilaporkan bahwa aplikasi teknik kriopreservasi pada tanaman kentang dapat

menghemat biaya hingga seperempat kali dibandingkan dengan penyimpanan di lapang. Selain itu, penelitian kriopreservasi pada tanaman stroberi telah membuktikan bahwa daya hidup meristem yang telah disimpan selama 28 tahun tidak berbeda nyata dengan yang disimpan selama 8 minggu. Diprediksikan bahwa kriopreservasi biji *lettuce* dapat mencapai 400 tahun atau 20 kali lebih lama dibandingkan dengan penyimpanan dalam bank benih (Li dan Pritchard 2009).

Tanaman buah-buahan merupakan salah satu kelompok tanaman yang sangat mendesak untuk disimpan secara kriopreservasi karena sebagian besar memiliki masa juvenil yang panjang dan dikembangkan secara vegetatif. Cekaman biotik dan abiotik sebagai akibat dari pengaruh pemanasan global semakin memperparah tingkat diversitas genetik tanaman tersebut. Kasus yang terjadi pada tanaman pisang merupakan fakta yang sangat menarik untuk menyadari akan pentingnya aplikasi teknik kriopreservasi. Banyak populasi tanaman pisang hancur oleh penyakit virus *banana bunchy top virus* (BBTV), layu fusarium (*Fusarium oxysporum* fsp. *cubense*) dan layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*) (Hermanto *et al.*, 2008). Selain itu, kekeringan menjadi salah satu kendala dalam konservasi tanaman pisang di Kebun Percobaan di Subang.

Selain untuk konservasi jangka panjang, kriopreservasi dapat sekaligus diterapkan sebagai teknik krioterapi untuk pengendalian patogen cendawan obligat, bakteri, fitoplasma, virus, dan viroid. Upaya pengendalian dengan menggunakan tanaman bebas patogen akan lebih aman terhadap lingkungan dibandingkan dengan menggunakan bahan-bahan kimia. Teknik krioterapi berpotensi besar diterapkan pada berbagai tanaman buah tropis, seperti pisang, jeruk, pepaya, melon, semangka, dan nenas yang banyak terinfeksi virus.

KENDALA DALAM PENGEMBANGAN DAN PENERAPAN TEKNIK KRIOPRESERVASI DI INDONESIA

Di antara berbagai macam kelebihannya, terdapat beberapa kendala dalam pengembangan teknik kriopreservasi di Indonesia. Penguasaan teknik regenerasi menjadi faktor terpenting dalam pengembangan teknik kriopreservasi. Saat ini, teknik regenerasi tanaman tahunan dan monokotil berkayu belum sepenuhnya dikuasai sehingga penelitian yang berkaitan dengan hal tersebut perlu dioptimalkan. Dukungan pemerintah juga memegang peranan penting dalam penelitian dan pengembangan teknik kriopreservasi. Sepuluh tahun yang lalu, dukungan tersebut masih

kurang memadai, namun dewasa ini, Kementerian Pertanian mencanangkan program konservasi sumber daya genetik pertanian sehingga teknik kriopreservasi menjadi salah satu teknologi yang diharapkan mampu mendukung program tersebut. Dalam hal ini, wawasan yang luas dari peneliti sangat diperlukan untuk mengembangkan teknik kriopreservasi sehingga peneliti perlu melakukan studi pustaka, studi banding, dan membangun jejaring kerja sama dengan lembaga lain, baik di dalam maupun luar negeri. Keterampilan teknis yang belum memadai merupakan salah satu kendala dalam penerapan teknik kriopreservasi di bank gen *in vitro*. Saat ini, biaya untuk pembangunan bank gen bukan merupakan kendala, namun pemeliharaannya memerlukan dukungan teknis (tenaga operator) serta finansial. Saat ini, kemampuan pelaksanaan dalam mengelola bank gen *in vitro* masih perlu ditingkatkan karena manajemen bank gen menjadi faktor utama dalam mendukung keberhasilan program konservasi.

KESIMPULAN

Di Indonesia, teknik kriopreservasi belum nyata berkembang sedangkan di mancanegara, teknik tersebut telah mengalami perkembangan yang nyata. Teknik kriopreservasi diterapkan untuk penyimpanan koleksi pasif, penyimpanan koleksi aktif, penyediaan materi untuk sumber pemuliaan tanaman, eradikasi patogen, serta penyimpanan materi hasil perbaikan genetik tanaman. Kriopreservasi menduduki posisi penting dalam program pemuliaan secara konvensional dan bioteknologi sehingga perlu dikembangkan dan diterapkan di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrios, G.N. 1988. Plant Pathology. 3th edition. Academic Press. 803 p.
- Ashmore, S.E. 1997. Status Report on the Development and Application of *In Vitro* Techniques for the Conservation and Use of Plant Genetic Resources. International Plant Genetic Resources Institute. Rome. Italy. 67 p.
- Bajaj, Y.P.S. 1979. Technology and prospects of cryopreservation of germplasm. *Euphytica* 28:267-285.
- Bhojwani S.S. and M.K. Razdan. 1983. Plant Tissue Culture. Theory and Practise. Elsevier. Amsterdam. New York. 502 p.
- Cornejo, M.J., V.L. Wong, and A.E. Blechl. 1995. Cryopreserved callus: A source of protoplasts for rice transformation. *Plant Cell Rep.* 14:210-214.
- Dhekney, S.A. 2004. Molecular investigations, cryopreservation and genetic transformation studies in

- papaya (*Carica papaya* L.) for cold hardiness. Dissertation, University of Florida, Florida. 169 p.
- Djam'an, D.F., D. Priadi, dan E. Sudarmanowati. 2006. Penyimpanan benih damar (*Agathis damara* Salisb.) dalam nitrogen cair. *Biodiversitas* 7(2):164-167
- Dumet, D., F. Engelmann, N. Chabrilange, and Y. Duval. 1993. Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis*) somatic embryos involving a desiccation step. *Plant Cell Rep.* 12:352-355.
- Dussert, S., N. Chabrilange, F. Engelmann, F. Anthony, and S. Hamon. 2000. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: Toward a simplified protocol for routine use in coffee genebanks. p. 161-166. *In* F. Engelmann and H. Takagi (eds.) *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. International Plant Genetic Resources Institute. Rome-Italy.
- Effendi, D. and R.E. Litz. 2003. Cryopreservation of avocado. *Proceedings V World Avocado Congress*. p. 111-114.
- Escobar, R.H., G. Mafla, and W.M. Roca. 1997. A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. *Plant Cell Rep.* 16:474-478.
- Fang, J-Y. and A. Wetten 2011. Importance of structural integrity of somatic embryos for long-term cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) germplasm. *African J. Agric. Res.* 6(17):3954-3961.
- Feng, C., Z. Yin, Y. Ma, Z. Zhang, L. Chen, B. Wang, and B. Li. 2011. Cryopreservation of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) and its pathogen eradication by cryotherapy. *Biotechnology Advances* 29:84-93.
- Gamez-Pastrana, R., Y. Martinez-Ocampo, C.I. Beristain, and M.T. Gozales-Arno. 2004. An improved cryopreservation protocol for pineapple apices using encapsulation-vitrification. *CryoLetters* 25(6):405-414.
- Gnanapragasam, S. and I.K. Vasil. 1992. Cryopreservation of immature embryos, embryonic callus and cell suspension cultures of gramineous species. *Plant Sci.* 83:205-215.
- Golmirzaie, A.M. and A. Panta. 2000. Advances in potato cryopreservation at the International Potato Center, Peru. p. 250-254. *In* F. Engelmann and H. Takagi (eds.) *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm - Current Research Progress and Applications*. International Plant Genetic Resources Institute.
- González-Benito, M.E., I. Clavero-Ramírez, and J.M. López-Aranda. 2004. Review: The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops. *Spanish J. Agric. Res.* 2(3):341-351.
- Grout, B.W.W. 1995. Introduction to the *in vitro* preservation of plant cells, tissues and organs. p. 1-17. *In* B. Grout (ed.) *Genetic Preservation of Plant Cells In Vitro*. Springer Lab Manual. Berlin-Heidelberg.
- Haggman, H.M., L.A. Ryyanen, S.T. Aronen, and J. Krajakova. 1998. Cryopreservation of embryogenic cultures of Scots pine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 54:45-53.
- Halmagyi, A., G. Fischer-Kluver, G. Mix-Wagner, and H.M. Schumacher. 2004. Cryopreservation of *Chrysanthemum morifolium* (*Dendranthema grandiflora* Ramat.) using different approaches. *Plant Cell Rep.* 22:371-375.
- Hermanto, C., A. Sutanto, Jumjunidang, and H.S. Edison, 2008. Survey reports of the occurrence and severity of banana wilts and associated factors in Indonesia.
- Hirai, D. and A. Sakai. 1999a. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. *Potato Res.* 42:153-160.
- Hirai, D. and A. Sakai. 1999b. Cryopreservation of *in vitro*-grown axillary shoot-tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation vitrification. *Plant Cell Rep.* 19:150-155.
- Huang, Y., Q. Wang, R. Gamez-Pastrana, Y. Martinez-Ocampo, C.I. Beristain, and M.T. Gozales-Arno. 2004. An improved cryopreservation protocol for pineapple apices using encapsulation-vitrification. *CryoLetters* 25(6):405-414.
- Kaczmarczyk, A., B. Funnekotter, and A. Menon. 2011. Current issues in plant cryopreservation. p. 417-438. *In* I.Y. Abdurakhmonov (ed.) *Plant Breeding*. Intech Open Access Publisher. Croatia. www.intechopen.com.
- Kaeppeler, S.M., H.F. Kaeppeler, and Y. Rhee. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol. Biol.* 43:179-188.
- Kartha, K.K. 1985. Meristem culture and germplasm preservation. p. 116-134. *In* K.K. Kartha (ed.) *Cryopreservation of Plant Cell and Organs*. Cue Press. Florida.
- Keller, E.R., A. Kaczmarczyk, and A. Senula. 2008. Cryopreservation for plant genebanks: a matter between high expectations and cautious reservation. *Cryo Letters* 29:53-62.
- Kumar, K.K., S. Maruthasalam, M. Loganathan, D. Sudhakar, and P. Balasubramanian. 2005. An improved Agrobacterium-mediated transformation protocol for recalcitrant elite Indica rice cultivars. *Plant Mol. Biol. Rep.* 23:67-73.
- Leunufna, S. 2004. Improvement of the *in vitro* maintenance and cryopreservation of yams (*Dioscorea* spp.). Dissertation, Martin Luther Universität Halle-Wittenberg. Berlin. 120 p.
- Leunufna, S. and E.R.J. Keller. 2003. Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.). *Plant Cell Rep.* 21:1159-1166.
- Li, D-Z. and H.W. Pritchard. 2009. The science and economics of ex situ plant conservation. *Trends in Plant Sci.* 14(11):614-621.
- Mariska, I., Suwarno, dan Djoko S. Damardjati. 1996. Pengembangan konservasi *in vitro* sebagai salah satu bentuk pelestarian plasma nutfah di dalam bank gen. Seminar Penyusunan Konsep Pelestarian *Ex Situ*

- Plasma Nutfah Pertanian. Bogor, 18 Desember 1996. Balitbio. Bogor
- Mix-Wagner, G., A.J. Conner, and R.J. Cross. 2000. Survival and recovery of asparagus shoot tips after cryopreservation using the "droplet" method. *New Zealand J. Crop Hort. Sci.* 28:283-287.
- Niino, T., A. Sakai, and K. Nojiri. 1992. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 28:261-266.
- Nishizawa, S., A. Sakai, Y. Amano, and T. Matsuzawa. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Sci.* 91:67-73.
- Okuno, K., K. Shirata, T. Niino, and M. Kawase. 2005. Plant genetic resources in Japan: Platforms and destinations to conserve and utilize plant genetic diversity. *JARQ* 39(4):231-237.
- Panis, B. and N.T. Thinh. 2009. Cryopreservation of *Musa* germplasm. INIBAB Technical Guidelines. 44 p.
- Panis, B., H. Schoofs, S. Remy, L. Sagi, and R. Swennen. 2000. Cryopreservation of banana embryogenic cell suspensions: An aid for genetic transformation. p. 103-109. *In* F. Engelmann and H. Takagi (eds.) *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. International Plant Genetic Resources Institute. Rome-Italy.
- Paulet, F., F. Engelmann, and J.C. Glazmann. 1993. Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp.) hybrids using encapsulation-dehydration. *Plant Cell Rep.* 12:525-529.
- Perez, R.M., O. Mas, L. Navarro, and N. Duran-Vila. 1999. Production and cryoconservation of embryogenic cultures of mandarin and mandarin hybrids. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 55:71-74.
- Prasetyorini. 1999. *Preservasi Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. Ex Kurz. melalui teknik kultur *in vitro*. Disertasi, Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Priadi, D. 2006. Viabilitas benih wijen local (*Sesamum indicum* L.) setelah kriopreservasi dan penyimpanan pada suhu rendah (-40°C). *J. Ilmu-ilmu Pertanian Indonesia* 8(2):120-125.
- Reed, B. 2008. *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer. 513 p.
- Reed, B.M., J. De Noma, and Y. Chang. 2000. Application of cryopreservation protocols at a clonal gen-ebank. p. 246-249. *In* F. Engelmann and H. Takagi (eds.) *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. International Plant Genetic Resources Institute. Rome-Italy.
- Roostika, I. dan I. Mariska. 2004. Pemanfaatan teknik kriopreservasi dalam penyimpanan plasma nutfah tanaman. *Bul. Plasma Nutfah* 9(2):10-18.
- Roostika, I., I. Mariska, dan N. Sunarlim. 2004a. Penyimpanan ubi kayu (*Manihot utilissima*) secara kriopreservasi dengan teknik vitrifikasi. *J. Bioteknologi Pertanian* 9(1):8-13.
- Roostika, I., I. Mariska, G.A. Wattimena, dan N. Sunarlim. 2004b. Penerapan teknik vitrifikasi pada penyimpanan ubi jalar (*Ipomea batatas* (L) Lam.) secara kriopreservasi. *J. Penelitian Pertanian* 23(1):117-122.
- Roostika, I., I. Mariska, G.A. Wattimena, N. Sunarlim, dan M. Kosmiatin. 2004c. Kriopreservasi ubi jalar (*Ipomea batatas* (L) Lam.) secara enkapsulasi-vitrifikasi. *J. Penelitian Pertanian* 22(3):159-166.
- Roostika, I., R. Megia, dan I. Darwati. 2007. Kriopreservasi tanaman purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.) dengan teknik vitrifikasi. *Berita Biologi* 8(6):429-431.
- Roostika, I., S. Rahayu, dan N. Sunarlim. 2008. Kriopreservasi tanaman obat langka purwoceng dengan teknik enkapsulasi-vitrifikasi. *B. Plasma Nutfah* 14(2):49-56.
- Roostika, I., F. Damayanti, and Witjaksono. 2011. Medium-term and long-term storage of banana embryogenic calli and somatic embryos by minimal growth and cryopreservation technique. Seminar Science and Technology Research Grant. Indonesia Toray Science Foundation. February 11th. Jakarta.
- Sakai, A. 1993. Cryogenic strategies for survival of plant culture cells and meristem cooled to-196°C. *Cryopreservation of Plant Genetic Resources*. Japan International Cooperation Agency. p. 5-26.
- Sakai, A., S. Kobayashi, and I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.* 9:30-33.
- Schneider, H. 2010. Determining the effectiveness of cryotherapy to eliminate plant virus in potato. Thesis. Spring. 23 p.
- Sudarmonowati, E. 2000. Cryopreservation of tropical plants: Current research status in Indonesia. *In* F. Engelmann and H. Takagi (eds.) *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. International Plant Genetic Resources Institute. Rome-Italy.
- Sudarmonowati, E. 2001. Cryopreservation of garlic (*Allium sativum*) cv. Lumbu Hijau using vitrification technique. *Annales Bogorienses* 8(1):39-46.
- Towill, L.E. and R.L. Jarret. 1992. Cryopreservation of sweet potato (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) shoot tips by vitrification. *Plant Cell Rep.* 11:175-178.
- Vendrame, W.A., V.S. Carvalho, J.M.M. Dias, and I. Maguire. 2008. Pollination of dendrobium hybrids using cryopreserved pollen. *Hort. Sci.* 43(1):264-267.
- Wang, Q. and J.P.T. Valkonen. 2012. Cryopreservation of shoot tips: Novel pathogen eradication method. *Trends Sci.* 14(3):119-122.
- Wang, Q.C., R. Gafny, R. Sahar, I. Sela, M. Mawassi, and E. Tanne. 2002. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell suspensions by

- encapsulation-dehydration and subsequent plant regeneration. *Plant Sci.* 162:551-8.
- Wang, Q., M. Mawassi, P. Li, R. Gafny, I. Sela, and E. Tanne. 2003. Elimination of grape vine virus A (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. *Plant Sci.* 165:321-327.
- Wang, Q.C., P. Li, U. Hanania, N. Sahar, M. Mawassi, and R. Gafny. 2005. Improvement of Agrobacterium-mediated transformation efficiency and transgenic plant regeneration of *Vitis vinifera* L. by optimizing selection regimes and utilizing cryopreserved cell suspensions. *Plant Sci.* 68:565-571.
- Wang, B., Z. Zhang, Z. Yin, C. Feng, and Q. Wang. 2012. Novel and potential application of cryopreservation to plant genetic transformation. *Biotechnol. Adv.* 30:604-612.
- Withers, L.A. 1985. Cryopreservation and storage of germplasm. p. 169-190. *In* D.A. Dixon (ed.) *Plant Cell Cult.* IRL Press. Washington.
- Yin, M.H. and S.R. Hong. 2010. A simple cryopreservation protocol of *Dioscorea bulbifera* L. embryogenic calli by encapsulation-vitrification. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 101:349-58.
- Zeliang, P.K. and A. Pattanayak. 2011. Fundamental cryobiology and basic physical, thermodynamical and chemical aspects of plant tissue cryopreservation. p. 41-56. *In* I.Y. Abdurakhmonov (ed.) *Plant Breeding.* Intech Open Access Publisher. Croatia. www.intechopen.com
-