

ARTUR KRYSZCZUK

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Młochowie

Kriokonserwacja — nowoczesna metoda długotrwałego przechowywania materiału roślinnego

Cryopreservation — a modern method of long-term storage of plant material

Kriokonserwacja jest to metoda przechowywania zamrożonego materiału biologicznego w bardzo niskich temperaturach, najczęściej w ciekłym azocie (-196°C). W pracy dokonano przeglądu literatury na temat kriokonserwacji materiału roślinnego pochodzącego z kultur *in vitro*, z uwzględnieniem metod, warunków procesu i możliwości szerokiego zastosowania w bankach genów. Zestawiono wyniki uzyskane przez autorów zajmujących się kriokonserwacją różnych gatunków roślin.

Słowa kluczowe: kriokonserwacja, bank genów, kultury *in vitro*

Cryopreservation is a method of storage of frozen biological material in a very low temperature, usually in liquid nitrogen (-196°C). The paper is a review of literature concerning cryopreservation of plant material from *in vitro* culture with regard to methods, conditions and possibility of application in gene banks. Results of cryopreservation of different plant species were compared.

Keywords: cryopreservation, gene bank, *in vitro* cultures

WSTĘP

Wskutek rozwoju cywilizacji i postępu technicznego drastycznie zmniejsza się różnorodność biologiczna. Często niemożliwe jest zapobieganie jej degradacji przez ochronę organizmów *in situ*, czyli w ich naturalnym środowisku. W tej sytuacji trzeba stosować ochronę *ex situ* polegającą na działalności banków genów, których podstawowym zadaniem jest utrzymywanie i rozwijanie w miarę możliwości kolekcji istniejących gatunków. Wiele gatunków roślin utrzymywanych w bankach genów rozmnażanych jest z nasion i w takiej formie może być przechowywane przez długi okres. Problem stanowi przechowywanie roślin rozmnażanych wegetatywnie lub roślin, które tworzą nasiona nie nadające się do długotrwałego przechowywania. Najczęściej używaną metodą utrzymywania w bankach genów takich gatunków jest tworzenie kolekcji polowych. Utrzymanie kolekcji polowej wymaga dużych nakładów pracy, występuje również ryzyko zniszczenia

kolekcji przez patogeny, szkodniki lub czynniki pogodowe. Kolekcja taka nie jest dostępna przez cały rok.

Inną metodą przechowywania gatunków roślin jest gromadzenie ich w kolekcjach *in vitro*. Dzięki uprawie roślin w sterylnych warunkach, na sztucznych pożywkach w pokojach fitotronowych możliwe jest ograniczenie szkodliwego wpływu czynników naturalnych na utrzymywaną kolekcję, środowisko, w którym rosną rośliny może być ściśle kontrolowane. Metoda przechowywania roślin *in vitro*, mimo znacznej przewagi nad polowym bankiem genów, również nie jest wolna od wad. Jest pracochłonna, a w przechowywanym materiale występuje ryzyko wystąpienia zmian somaklonalnych, czy infekcji mikrobiologicznej.

Kolejnym krokiem w udoskonalaniu długotrwałego przechowywania materiału roślinnego wydaje się być metoda kriokonserwacji roślin. Polega ona na zamrożeniu tkanek roślinnych i przechowywaniu ich w bardzo niskich temperaturach, najczęściej w ciekłym azocie (-196°C). Zamrożony materiał nie podlega żadnym zmianom, może więc być przechowywany przez nieograniczony czas.

Celem pracy jest przedstawienie niektórych aspektów zastosowania kriokonserwacji do długotrwałego przechowywania eksplantatów roślinnych pozyskanych z kultur *in vitro*.

PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU ROŚLINNEGO DO ZAMRAŻANIA

Dla każdego gatunku przed rozpoczęciem badań dotyczących kriokonserwacji konieczne jest określenie metodyki rozmnażania i regeneracji *in vitro* materiału roślinnego przeznaczonego do przechowywania w niskich temperaturach. W praktyce zamraża się najczęściej: merystemy, zarodki somatyczne, kalus, protoplasty, zawiesinę komórkową. Eksplantaty przeznaczone do zamrożenia powinny być w tej samej fazie rozwojowej i wieku oraz tej samej wielkości. Komórki eksplantatów powinny być jak najmniej zróżnicowane. Gwarantuje to podobny wpływ czynników procesu kriokonserwacji (stosowanych krioprotektantów i temperatury) na wszystkie komórki eksplantatu i podobną reakcję tychże komórek na wymienione czynniki.

Wpływ na efektywność kriokonserwacji może mieć wiek kultury przeznaczonej do zamrażania (Bouafia i in., 1996), a także sposób postępowania z materiałem roślinnym znajdującym się w kulturach *in vitro*. Hartowanie materiału w niskich temperaturach, modyfikacja składu pożywki, czy zmiana rodzaju i intensywności światła mogą w znacznym stopniu zwiększyć odporność na stres wywołany przez substancje chemiczne używane w procesie kriokonserwacji oraz przez sam zabieg zamrażania i rozmrażania materiału (Benson i in., 1989; Harding i in., 1991; Vendenbussche i De Proft, 1998).

PODSTAWOWE ZAŁOŻENIA KRIOKONSERWACJI

Podstawowym celem kriokonserwacji jest kontrolowane odwodnienie komórek materiału roślinnego przygotowywanego do zamrożenia. Zapobiega to powstawaniu wewnątrzkomórkowych kryształków lodu, które niszczą struktury komórkowe, co zwykle prowadzi do śmierci komórki i jest główną przyczyną niepowodzenia zamrażania (Starck

i in., 1993). Należy także pamiętać o toksycznym wpływie wielu używanych krioprotektantów i szoku, jakim jest dla komórek utrata dużych ilości wody. Te czynniki również mogą powodować zamieranie komórek, dlatego należy kontrolować ich wpływ na tkankę roślinną przygotowywaną do zamrożenia.

Krioprotektanty to związki chemiczne używane w procesie kriokonserwacji mające za zadanie zminimalizowanie szkodliwego wpływu zamrażania i rozmrażania na komórki roślinne. Można je podzielić na dwie grupy:

- przenikające do wnętrza komórki przez błony komórkowe: dimetylosulfotlenek (DMSO), glicerol, glikol propylenowy,
- nie przenikające przez błony komórkowe: cukry, glikol polietylenowy.

Kriokonserwacja składa się z kilku etapów: przygotowania materiału roślinnego do zamrażania, jego zamrożenia, rozmrożenia oraz traktowania po rozmrożeniu.

Przygotowanie do zamrażania rozpoczyna się zwykle od wyłożenia eksplantatów na pożywkę wzbogaconą w cukry (sacharoza, mannitol, sorbitol), czasami DMSO. Etap ten trwa od kilku godzin (Bouafia i in., 1996) do kilku dni (Towill, 1990). Sarkar i Naik (1998) oraz Hirai i Sakai (1999) uważają, że inkubacja eksplantatów na pożywce bogatej w cukry zwiększa tolerancję materiału roślinnego na odwodnienie, które następuje podczas dalszych etapów kriokonserwacji. Withers (1987) uważa, że etap ten ma również inne znaczenie, bo następuje wówczas inicjacja regeneracji, co ma szczególne znaczenie w wypadku eksplantatów takich jak merystemy (regeneracja w miejscach cięcia). Fretz i Lörz (1996), opisując kriokonserwację traw stwierdzają natomiast, że wykładanie eksplantatów na pożywkę wzbogaconą w cukry nie zawsze jest potrzebne.

Eksplantaty są poddawane następnie działaniu krioprotektantów. W zależności od wybranej metody kriokonserwacji i schematu postępowania używa się jednego krioprotektanta lub mieszaniny kilku związków. Inkubacja w roztworze krioprotektantów trwa od kilkunastu minut do kilku dni. Proces ten czasami prowadzi się w temperaturze ok. 0° C (Meijer i in., 1991; Matsumoto i in., 1997; Mandal i Dixit, 2000), aby zmniejszyć szkodliwy wpływ krioprotektantów na traktowany materiał roślinny.

W zależności od metody kriokonserwacji materiał roślinny zamrażany jest dwuetapowo lub jednoetapowo. Zamrażanie dwuetapowe polega na schłodzeniu materiału roślinnego do -35 lub -40° C a następnie przeniesieniu go do ciekłego azotu. Zamrażanie jednoetapowe polega na bezpośrednim zanurzeniu eksplantatów w ciekłym azocie.

Różne są również sposoby rozmrażania materiału roślinnego. Zwykle po wyjęciu z ciekłego azotu eksplantaty rozmraża się przez zanurzenie w wodzie lub płynnej pożywce o temperaturze od 21° C do 45° C (Meijer i in., 1991; Reed, 1993; Yamada i in., 1993; Hirai i Sakai, 1999). Czasami stosuje się rozmrażanie w temperaturze pokojowej (Kendall, 1993; Bouafia i in., 1996; Mandal i in., 1996).

Materiał roślinny zwykle zamraża się w roztworze krioprotektantów, w którym był inkubowany. W takim przypadku po rozmrożeniu krioprotektanty należy usunąć. Jeśli krioprotektanty są używane w dużym stężeniu mogą być toksyczne dla eksplantatów, należy więc przemyć materiał roślinny płynną pożywką.

Następnym etapem jest regeneracja roślin z materiału roślinnego poddanego kriokonserwacji. Proces ten odbywa się z wykorzystaniem pożywek regeneracyjnych przystosowanych do używanego typu eksplantatów.

METODY KRIOKONSERWACJI

Ze względu na sposób zamrażania metody kriokonserwacji możemy podzielić na dwuetapowe i jednoetapowe.

Metoda dwuetapowa, nazywana też metodą powolnego zamrażania polega na ściśle kontrolowanym, powolnym schładzaniu tkanki roślinnej. Podczas zamrażania roztworu, w którym znajdują się eksplantaty, woda przekształca się w kryształki lodu a stężenie pozostałej, niezamarzniętej części roztworu wzrasta. Hipertoniczny roztwór wymusza wypływ wody z komórek eksplantatu. Temperaturę obniża się do -35° lub -40° C. W tej temperaturze, przy odpowiednio dobranych parametrach procesu, cytozol zamarza nie tworząc kryształów lodu. Proces ten nie jest obojętny dla komórek, dlatego zwykle przed zamrożeniem materiał rośliny poddawany jest działaniu krioprotektantów w niewielkim stężeniu. Zamarznięty materiał roślinny przenosi się do ciekłego azotu. Po wyjęciu z ciekłego azotu materiał roślinny rozmraża się w temperaturze pokojowej lub w ciepłej wodzie. Po usunięciu roztworu krioprotektantów eksplantaty wykłada się na pożywkę regeneracyjną.

Obecnie odchodzi się od metod bazujących na powolnym zamrażaniu materiału roślinnego. Na skuteczność takich metod ma wpływ wiele czynników, często zupełnie niezależnych od badacza i trudnych do przewidzenia. Proces odwadniania eksplantatów podczas powolnego zamrażania zależy w znacznym stopniu od budowy i składu chemicznego komórek. W związku z tym metodyka musi być zmieniana i przystosowana, dla każdego gatunku a nawet odmiany (Steponkus i in., 1992). Metoda powolnego zamrażania wymaga drogiego, specjalistycznego sprzętu umożliwiającego ściśle kontrolowane obniżanie temperatury.

Wśród jednoetapowych metod kriokonserwacji należy wyróżnić dwie, obecnie najczęściej stosowane i intensywnie rozwijane: witryfikację i zamrażanie kapsułkowanych eksplantatów. Cechami łączącymi obie metody jest zamrażanie polegające na zanurzeniu materiału roślinnego w ciekłym azocie. Dzięki temu metody te są łatwe do wykonania i mogą być zastosowane do zamrażania wielu gatunków bez konieczności znacznych modyfikacji procedur. Metody te są tanie, ponieważ nie wymagają zastosowania drogiego sprzętu służącego do kontrolowania powolnego zamrażania. Podczas stosowania witryfikacji lub zamrażania kapsułkowanych eksplantatów nie występuje problem wrażliwości na chłód niektórych gatunków roślin. Metody te mogą być stosowane do zamrażania tkanek lub organów, ponieważ ich powodzenie nie zależy od budowy zamrażanego materiału w tak dużym stopniu jak ma to miejsce podczas stosowania powolnego zamrażania (Steponkus i in., 1992).

Witryfikacja polega na poddaniu materiału roślinnego procesom zapewniającym, przekształcenie wody w amorficzny stan, tzw. zeszklenie, podczas zanurzania eksplantatów w ciekłym azocie. Wykluczone jest wówczas tworzenie kryształów lodu.

Proces rozpoczyna się od wyłożenia materiału roślinnego na pożywkę z dużą ilością cukru. Zwykle jest to sacharoza, choć Sarkar i Naik (1998) sugerują, że dodanie mannitolu może znacznie podwyższyć przeżywalność eksplantatów po rozmrożeniu.

Następnie materiał roślinny inkubuje się w roztworze krioprotektantów. Zwykle inkubacja jest dwuetapowa. Pierwszy (wprowadzający) etap polega na dodaniu do pożywki krioprotektantów w stężeniu 1–2 M. Służy on zwiększeniu koncentracji roztworu komórkowego. W ten sposób przygotowany materiał roślinny jest w stanie przeżyć następny etap, czyli odwadnienie. Polega on na inkubacji eksplantatów w roztworze krioprotektantów o stężeniu ok. 8 M, co prowadzi do usunięcia z komórki 90% osmotycznie aktywnej (wolnej) wody. Często, w celu zmniejszenia toksycznego wpływu krioprotektantów na tkankę roślinną, stosuje się różne roztwory krioprotektantów w fazie wprowadzającej i w fazie odwadniania (Hirai i in., 1998; Hirai i Sakai, 1999), jednak nie jest to regułą. Sarkar i Naik (1998) stosują z powodzeniem ten sam roztwór, stopniowo zwiększając jego stężenie, zaś Steponkus i wsp. (1992) polecają witrifikację jedno-stopniową. Jest to metoda skuteczna w odniesieniu do merystemów ziemniaka.

Materiał roślinny umieszczony w roztworze krioprotektantów zamraża się przez zanurzenie w ciekłym azocie. Eksplantaty rozmraża się zanurzając w cieczy o temperaturze do 38° C. Roztwór krioprotektantów należy usunąć natychmiast po rozmrożeniu, a eksplantaty przemyć płynną pożywką. Aby zapobiec nagłemu osmotycznemu przepływowi wody do komórek używa się pożywek zawierających duże stężenie sacharozy (1,2 M). Materiał roślinny płucze się kilkakrotnie w ciągu 15–30 minut, a następnie wyklada na pożywkę regeneracyjną.

Tak jak inne metody kriokonserwacji mrożenie kapsułkowanego i odwodnionego materiału roślinnego ma na celu zwiększenie koncentracji roztworu komórkowego i pozbawienie komórek ok. 80–90% wody. Jednak w metodzie tej jedynym używanym krioprotektantem jest sacharoza, a odwodnienie uzyskuje się przez suszenie materiału roślinnego.

Proces rozpoczyna się od wyłożenia eksplantatów na pożywkę z dużą ilością cukru. Po kilku (kilkunastu) godzinach materiał roślinny zanurza się w płynnej pożywce nie zawierającej wapnia, ale wzbogaconej o alginat sodowy. Następnie za pomocą pipety pobiera się kroplę roztworu zawierającą materiał roślinny i wkrapla do pożywki zawierającej wapń, w której kapsułki twardnieją. Tak przygotowany materiał roślinny inkubuje się w płynnej pożywce o wysokim stężeniu sacharozy. Etap ten trwa od kilkunastu godzin do kilku dni. Następnie, po wyłożeniu na otwartą szalkę, kapsułkowane eksplantaty suszy się w komorze z laminarnym przepływem powietrza (Engelmann i in., 1995) lub z użyciem żelu krzemionkowego (Bouafia i in., 1996; Martinez i in., 1999). Metoda suszenia nie ma większego znaczenia, niezwykle ważna natomiast jest zawartość wody w materiale przeznaczonym do zamrażania. Największą efektywność regeneracji eksplantatów po rozmrożeniu (ok. 80%) osiągnano, gdy materiał roślinny wysuszono do ok. 20% świeżej masy (Bouafia i in., 1996; Paul i in., 2000). Kolejno, materiał roślinny zamraża się przez bezpośrednie zanurzenie w ciekłym azocie. Po wyjęciu eksplantaty najczęściej rozmraża się w temperaturze pokojowej, czasami stosuje się rozmrażanie w ciepłej wodzie (Niino i

Sakai, 1992; Vandenbussche i De Proft, 1998). Rozmrożone eksplantaty wykłada się na pożywkę regeneracyjną.

Zwykle materiał roślinny pozostawiano w kapsułkach, gdyż nie hamowały one wzrostu i regeneracji (Paulet i in., 1993; Martinez i in., 1999), jednak Matsumoto i wsp. (1998) wykazali, że kapsułki ograniczały rozwój merystemów zatrwanu po rozmrożeniu.

Metoda kapsułkowania zasadniczo przeznaczona jest do przechowywania zorganizowanych struktur roślinnych takich jak merystemy i zarodki somatyczne. Kapsułkowanie używane było jednak również do zawiesiny komórkowej (Bachiri i in., 1995; Shibli i in., 2001).

Czasami łączy się dwie metody kriokonserwacji: witryfikację i mrożenie kapsułkowanego materiału roślinnego. Wówczas przed poddaniem materiału roślinnego witryfikacji zamyka się go w kapsułkach alginowych. Ma to na celu ochronę eksplantatów przed uszkodzeniami i ułatwienie manipulacji nimi (Hirai i Sakai, 1999).

Istnieją przykłady zastosowania innych metod kriokonserwacji, w których materiał roślinny zamraża się przez zanurzenie w ciekłym azocie. Metod tych jednak nie można zakwalifikować jako witryfikację lub mrożenie kapsułkowanego i suszonego materiału roślinnego. Materiał roślinny jest inkubowany przez jeden dzień w płynnej pożywce, traktowany krioprotektantami w stężeniu niższym niż ma to miejsce podczas witryfikacji (zwykle jest to DMSO w stężeniu ok. 10%), następnie jest zamrażany przez zanurzenie w ciekłym azocie. Eksplantaty rozmraża się zanurzając w ciekłej pożywce. Następnie materiał roślinny wykłada się na pożywkę regeneracyjną (Mix-Wagner, 1996; Schäfer-Menuchr i in., 1996; Mix-Wagner, 1999). Schäfer-Menuchr (1996) nazywa swoją metodę oraz jej podobne ultra szybkim zamrażaniem, zaś Sarkar i Naik (1998) metodą zamrażania kropelek.

PERSPEKTYWY ROZWOJU KRIOKONSERWACJI

W ostatnich latach metoda przechowywania materiału roślinnego w bardzo niskich temperaturach przechodzi intensywny rozwój. Opublikowano szereg prac przedstawiających metody kriokonserwacji różnych gatunków roślin. Najczęściej używane są metody bazujące na zamrażaniu przez zanurzenie w ciekłym azocie: witryfikacja i kapsułkowanie z wysuszeniem. Dzięki odchodzeniu od procedur opartych na powolnym zamrażaniu materiału roślinnego kriokonserwacja staje się dostępna dla wielu ośrodków badawczych, ponieważ jej stosowanie nie wymaga drogiego sprzętu. Nowoczesne metody są proste w zastosowaniu i uniwersalne, dzięki czemu mogą być w łatwy sposób modyfikowane.

Kriokonserwacją zajmuje się wiele placówek badawczych na całym świecie. Rośnie ilość gatunków roślin, które mogą być przechowywane w ciekłym azocie. Z dużym powodzeniem zamrażano gatunki takich rodzajów, jak: *Cantharanthus*, *Ipomea*, *Limonium*, *Lilium*, *Mentha*, *Solanum* i wielu innych (tab. 1). Nie bez znaczenia jest również intensywny rozwój technik *in vitro*, dzięki czemu możemy obecnie zamrażać w ciekłym azocie wiele form kultur *in vitro*: merystemy, zarodki somatyczne, kalus czy zawiesinę komórkową (tab. 1).

Tabela 1

Zestawienie gatunków roślin przechowywanych w ciekłym azocie i użytych metod kriokonserwacji
List of plant species stored in liquid nitrogen and cryopreservation methods used

Metoda kriokonserwacji Method of cryopreservation	Rodzaj/Gatunek Genus/ Species	Materiał roślinny Plant material	Autor Author
Kapsułkowanie z wysuszeniem Encapsulation-dehydration	<i>Beta vulgaris</i> (L.)	merystemy meristems	Vandenbussche, De Proft, 1998
	<i>Catharanthus roseus</i> (L.)	zawiesina komórkowa cell suspension	Bachiri i in., 1995
	<i>Daucus carota</i> (L.)	zarodki somatyczne somatic embryos	Dereuddre i in., 1991
	<i>Limonium</i> sp.	merystemy meristems	Matsumoto i in., 1998
	<i>Saccharum</i> sp.	merystemy meristems	Paulet i in., 1993
	<i>Solanum phureja</i> (L.)	merystemy meristems	Bouafia i in., 1996
Kapsułkowanie z wysuszeniem + witrifikacja Encapsulation-dehydration + vitrification	<i>Fragaria</i> × <i>ananasa</i> (Duch.)	merystemy meristems	Hirai i in., 1998
	<i>Limonium</i> sp.	merystemy meristems	Matsumoto i in., 1998
Witrifikacja Vitrification	<i>Citrus sinensis</i> (Osb.)	zawiesina komórkowa cell suspension	Sakai i in., 1990
	<i>Colocasia esculenta</i> ([L.] Schott)	merystemy meristems	Takagi i in., 1997
	<i>Ipomea batatas</i> ([L.] Lam.)	merystemy meristems	Towill i Jarret, 1992
	<i>Lilium japonicum</i> (Thunb.)	merystemy meristems	Matsumoto i in., 1995
	<i>Limonium</i> sp.	merystemy meristems	Matsumoto i in., 1998
	<i>Mentha aquatica</i> × <i>M. spicata</i> (L.)	merystemy meristems	Towill, 1990
	<i>Nicotiana tabacum</i> (L.)	zawiesina komórkowa cell suspension	Reinhoud i in., 1995
Dwustopniowa: powolne zamrażanie do -35° -40° C, następnie -196° C Two step freezing: slow freezing to -35° -40° C, then -196° C	<i>Hordeum vulgare</i> (L.)	zawiesina komórkowa, kalus cell suspension callus	Fretz i Lörz, 1995
	<i>Triticum aestivum</i> (L.)	zawiesina komórkowa cell suspension	Reinhoud i in., 1995
	<i>Nicotiana tabacum</i> (L.)	zawiesina komórkowa cell suspension	Reinhoud i in., 1995
	<i>Rubus</i> sp.	merystemy meristems	Reed, 1993
	<i>Larix decidua</i> (Mill.) <i>Picea glauca</i> (Moench) <i>Pinus strobus</i> (L.)	zawiesina komórkowa cell suspension	Charest i in., 1996

Mimo znacznego postępu w badaniach dotyczących kriokonserwacji nie może być ona uznana za standardową metodę przechowywania materiału roślinnego, jaką są kolekcje polowe i kultury *in vitro*. Stale niewiele jest przykładów zastosowania zamrażania materiału roślinnego jako rutynowej metody używanej w bankach genów. Do długotrwałego przechowywania materiału roślinnego kriokonserwację stosują Instytut Hodowli Roślin (Institut für Pflanzenbau) w Brunszwiku w Niemczech i Laboratorium Przechowywania Nasion (National Seed Storage Laboratory) w Fort Collins w USA. Prace

nad zastosowaniem kriokonserwacji do przechowywania merystemów ziemniaka trwają w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Młochowie. Konieczne jest dalsze doskonalenie metod przechowywania zasobów genowych w ultra niskich temperaturach i prowadzenie badań na dużą skalę w bankach genów. Dzięki temu będzie możliwe tanie i mało pracochłonne przechowywanie bardzo dużej ilości genotypów na niewielkiej przestrzeni. Wobec ciągle postępujących niekorzystnych zmian w środowisku i związanej z tym wzrastającej roli banków genów wydaje się to logiczną konsekwencją.

LITERATURA

- Bachiri Y., Gazeau C., Hansz J., Morisset C., Dereuddre J. 1995. Successful cryopreservation of suspension cells by encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 43: 241 — 248.
- Benson E., Harding K., Smith H. 1989. Variation in recovery of cryopreserved shoot-tips of *Solanum tuberosum* exposed to different pre- and post-freeze light regimes. *Cryo-Letters* 10: 323 — 344.
- Bouafia S., Jelti N., Lairy G., Blanc A., Bonnel E., Dereuddre J. 1996. Cryopreservation of potato shoot tips by encapsulation-dehydration. *Potato Res.* 39: 69 — 78.
- Charest P. J., Bonga J., Klimaszewska K. 1996. Cryopreservation of plant tissue cultures: the example of embryogenic tissue from conifers. In K. Lindsey (ed.) *Plant Tissue Culture Manual*: C9: 1 — 27.
- Dereuddre J., Hassen N., Blandin S., Kaminski M., 1991. Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen: 2. Thermal analysis. *Cryo-Letters* 12: 135 — 148.
- Engelmann F., Benson E. E., Chabrilange N., Gonzales Arnao M. T., Mari S., Michaux-Ferriere N., Paulet F., Glaszmann J. C., Charrier A. 1995. Cryopreservation of several tropical plant species using encapsulation/dehydration of apices. In: M. Terzi et al. (eds.), *Current issues in plant molecular and cellular biology*: 315 — 320.
- Fretz A., Lörz H. 1995. Cryopreservation of *in vitro* cultures of barley (*Hordeum vulgare* L. and *H. murinum* L.) and transgenic cells of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Plant Physiol.* 146: 489 — 496.
- Fretz A., Lörz H. 1996. Cryopreservation of *in vitro* cultures of *graminaceous* species. In: S. M. Jain, S. K. Sopory i R. E. Veilleux (eds.), *In vitro* haploid production in higher plants. Vol. 2: 339 — 352.
- Harding K., Benson E., Smith H., 1991. The effects of pre-freeze *in vitro* culture period on the recovery of cryopreserved shoot-tips of *Solanum tuberosum*. *Cryo-Letters* 12: 17 — 22.
- Hirai D., Shirai K., Shirai S., Sakai A. 1998. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) by encapsulation-vitrification. *Euphytica* 101: 109 — 115.
- Hirai D., Sakai A. 1999. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. *Potato Res.* 42: 153 — 160.
- Kendall E. J. K., Kartha K. K., Qureshi J. A., Chermak P. 1993. Cryopreservation of immature spring wheat zygotic embryos using an abscisic acid pretreatment. *Plant Cell Rep.* 12: 89 — 94.
- Mandal B. B., Chandel K. P. S., Dwivedi S. 1996. Cryopreservation of yam (*Dioscorea* spp.) shoot apices by encapsulation-dehydration. *Cryo-Letters* 17: 165 — 174.
- Mandal B. B., Dixit S. 2000. Cryopreservation of shoot-tips of *Dioscorea deltoidea* Wall. - an endangered medicinal plant. *IPGRI Newsletter for Asia, the Pacific and Oceania*, No. 33: 23.
- Martinez D., Tames R. S., Revilla M. A. 1999. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot-tips of hop (*Humulus lupulus* L.) using encapsulation/dehydration. *Plant Cell Rep.* 19: 59 — 63.
- Matsumoto T., Sakai A., Yamada K. 1995. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of lily by vitrification. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 41: 237 — 241.
- Matsumoto T., Nako Y., Takahashi C., Sakai A. 1997. Induction of *in vitro* cultured masses of shoot primordia of hybrid statice and its cryopreservation by vitrification. *Hort Science* 32: 309 — 311.
- Matsumoto T., Takahashi C., Sakai A., Nako Y. 1998. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of hybrid statice by three different procedures. *Scientia Horticulturae* 76: 105 — 114.

- Meijer E. G. M., van Iren F., Schrijnemakers E., Hensgens L. A. M., van Zijderveld M., Schilperoort R. A. 1991. Retention of the capacity to produce plants from protoplasts in cryopreserved cell lines of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep.* 10: 171 — 174.
- Mix-Wagner G. 1996. Management of the *in vitro* genebank of old potato cultivars at the Institute of Crop Science in Braunschweig. *Landbauforschung Völkenrode* 1: 5 — 9.
- Mix-Wagner G. 1999. The conservation of potato cultivars. *Potato Res.* 42: 427 — 436.
- Niino T., Sakai A. 1992. Cryopreservation of alginate-coated *in vitro*-grown shoot tips of apple, pear and mulberry. *Plant Sci.* 87: 199 — 206.
- Paul H., Daigny G., Sangwan-Norreel B. S. 2000. Cryopreservation of apple (*Malus X domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation-dehydration or encapsulation-vitrification. *Plant Cell Rep.* 19: 768 — 774.
- Paulet F., Engelmann F., Glaszmann J. C. 1993. Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids) using encapsulation/dehydration. *Plant Cell Rep.* 12: 525 — 529.
- Reed B. M. 1993. Responses to ABA and cold acclimation are genotype depended for cryopreserved blackberry and raspberry meristems. *Cryobiology* 30: 179 — 184.
- Reinhoud P. J., Schrijnemakers E. W. M., van Iren F., Kijne J. W. 1995. Vitrification and heat-shock treatment improve cryopreservation of tobacco cell suspensions compared to two-step freezing. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture* 42: 261 — 267.
- Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I. 1990. Cryopreservation of nuclear cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.* 9: 30 — 33.
- Sarkar D., Naik P. S. 1998. Cryopreservation of shoot tips of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) clones by vitrification. *Annals of Botany* 82: 455 — 461.
- Shibli R. A., Haagenson D. M., Cunningham S. M., Berg W. K., Volenec J. J. 2001. Cryopreservation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cells by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Rep.* 20: 445 — 450.
- Schäfer-Menuchr A. 1996. Refinement of cryopreservation techniques for potato. Final Report for the period September 1, 1991 August 31, 1996.
- Schäfer-Menuchr A., Müller E., Mix-Wagner G. 1996. Cryopreservation: an alternative for the long-term storage of old potato varieties. *Potato Res.* 39: 507 — 513.
- Steponkus P. L., Langis R., Fujikawa S. 1992. Cryopreservation of plant tissues by vitrification. In: Steponkus P. L. (ed.) *Advances in low-temperature biology*. JAI press Ltd.: 1 — 62.
- Starck Z., Chołuj D., Niemyska B. 1993. Fizjologiczne reakcje roślin na niekorzystne czynniki środowiska. *Rozprawy naukowe i monografie*. Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
- Takagi H., Thien Thinh N., Islam O. M., Senboku T., Sakai A. 1997. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. *Plant Cell Rep.* 16: 594 — 599.
- Towill L. E. 1990. Cryopreservation of isolated mint shoot tips by vitrification. *Plant Cell Rep.* 9: 178 — 180.
- Towill L. E., Jarret R. L. 1992. Cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.) shoot tips by vitrification. *Plant Cell Rep.* 11: 175 — 178.
- Yamada T., Sakai A., Matsumura T., Higuchi S. 1993. Plant regeneration of meristematic callus of white clover (*Trifolium repens* L.) cooled to -196° C by vitrification. *Euphytica* 70: 197 — 203.
- Vandenbussche B., De Proft M. P. 1998. Cryopreservation of *in vitro* sugar beet shoot tips using the encapsulation-dehydration technique: influence of abscisic acid and cold acclimation. *Plant Cell Rep.* 17: 791 — 793.
- Withers L. A. 1987. The low temperature preservation of plant cell, tissue and organ cultures and seeds for genetic conservation and improved agricultural practice. In: *The effect of low temperatures on biological systems*. B. W. W. Grout, G. J. Morris (eds.), Edward Arnold, New York: 389 — 409.