

## BIOTEHNOLOGIJA U OČUVANJU BILJNIH GENETSKIH IZVORA\*

H. RUKAVINA, I. KOLAK i Z. ŠATOVIĆ

Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu  
Zavod za sjemenarstvo

Faculty of Agriculture, University of Zagreb  
Department for Seed Science and Technology

### SAŽETAK

Upotreba tehnika kulture *in vitro* povećava mogućnosti prikupljanja, *ex situ* čuvanja i razmjene biljnih vrsta koje tvore kratkoživuće sjeme kao i vegetativno propagirajućih vrsta. *In vitro* tehnike čuvanja, u koje ubrajamo održavanje kultura usporenim rastom (srednjeročno čuvanje) i krioprezervaciju (dugoročno čuvanje) pružaju veliku prednost u čuvanje takvih problematičnih vrsta. Također, *in vitro* tehnike pružaju mogućnost eliminacije patogena i prema tome omogućuju čuvanje i razmjenu zdravog biljnog materijala.

Ključne riječi: očuvanje nasljedne plazme, *in vitro* tehnike čuvanja, krioprezervacija.

### GUBITAK GENETSKE VARIJABILNOSTI - OSNOVE OPLEMENJIVANJA BILJA

Nagli razvoj oplemenjivanja bilja i širenje novih kultivara boljih agronomskih svojstava potisnuo je iz proizvodnje veliki broj lokalnih populacija i tzv. "primitivnih kultivara" (Goodman, 1990a).

S druge strane, uslijed nagle i neumjerene industrijalizacije, urbanizacije, nekontroliranog iskorištavanja, ratova i prirodnih nepogoda mnogim biljnim vrstama kao i specifičnim lokalnim populacijama prijeti uništenje i izumiranje (Hawkes, 1990).

Tako se suzila genetska varijabilnost kod mnogih kulturnih vrsta, osnova daljnjeg napretka u oplemenjivanju bilja (Goodman, 1990b; Goodman i Castilo Gonzales, 1991), a uništenjem pojedinih specifičnih lokalnih populacija postoji velika opasnost od potpunog gubitka nekih vrlo važnih gena koje često sadrže samo jedan varijetet neke biljne vrste. Spomenut ćemo samo primjere Etiopskog ječma, koji predstavlja jedini izvor visoke rezistentnosti na BYDV, te pšenice PI 178383, lokalne populacije iz istočne Turske, izvora

\* Rad je izložen na Međunarodnom znanstvenom Simpoziju "Kvalitetnim sjemenom i kultivarom u Europu IV" održanom od 15. do 20. veljače 1998. u Opatiji.

multiple rezistentnosti na fiziološke rase crtičave rđe, snijeti i sniježne plijesni (White et al., 1989).

Od otprilike 265.000 procijenjenih biljnih vrsta na zemlji, kroz povijest čovječanstva uzgajano je ili sakupljano za hranu samo otprilike njih 7000. Od toga, samo 20 vrsta trenutno pokriva 90% svjetskih potreba za hranom, a samo tri vrste - pšenica, kukuruz i riža pokrivaju više od polovice svjetskih potreba (Zedan, 1995).

Navedeni podatak nameće zaključak da budućnost čovječanstva ovisi o poboljšanju iskorištavanja vrlo malog broja biljnih vrsta.

Još više zabrinjava činjenica da napretkom u oplemenjivanju bilja ishrana čovječanstva ovisi o sve manjem broju kultivara tj. poljodjelstvo iskorištava vrlo usku genetsku osnovu. Modernim oplemenjivanjem uz pomoć biotehnologije, uporedo s povećanjem priroda, smanjuje se raznolikost unutar vrsta. Kod nekih je vrsta genetska osnova modernih kultivara toliko sužena da su zapravo svi kultivari koji se mogu naći na tržištu u vrlo uskom srodstvu (Goodman, 1990a), a što povećava opasnost od bolesti epidemijskih razmjera (pojava rase *T. Helminthosporium maydis* 1970. godine u SAD).

Genetska varijabilnost, taj "sirovi materijal" na kojem oplemenjivači rade, biti će potraban i dalje, bez obzira na nove tehnologije u manipulaciji genima. Usprkos brzom razvoju biotehnologije nije vjerojatno da će doći do prestanka konvencionalnog oplemenjivanja bilja. Čak što više, moglo bi se reći da će klasično oplemenjivanje ojačati primjenom novih biotehnoloških metoda (Roberts, 1989).

Iako je problem gubitka genetske varijabilnosti i nestanka mnogih korisnih gena postavljen već '20 i '30 godina ovog stoljeća, u središte znanstvenog interesa ušao je '60 godina uz znanstvenike kao što su: Kuckuck, Harlan, Zohary, Bennett i Hawkes (prema Robertsu, 1989). Oni su zaključili da moderni, genetski uniformni i visokoprinosi kultivari brzo nadomještaju genetski heterogene lokalne populacije iz centara genetske raznolikosti. Na poticaj navedenih stručnjaka, koncem '60 godina Savjetodavna skupina za međunarodna istraživanja u poljoprivredi (Consultative Group of International Agricultural Researce - CGIAR) izrađuje program očuvanja biljnih genetskih izvora u svijetu, te početkom '70 godina utemeljuje svjetsku banku biljnih gena. Kontrolu tj. objedinjavanje sakupljanja, očuvanja i razmjene biljne germinacijske plazme u svijetu '80 godina preuzima Međunarodni ured za biljne genetske izvore (IBPGR - International Board for Plant Genetic Resources) utemeljen pri FAO-u. Od tada pa do danas, širom svijeta jača pokret s ciljem osnivanja banaka gena, a u svrhu čuvanja biljnih genetskih izvora, razmjene i njihove eventualne uporabe u oplemenjivanju (Roberts, 1989).

#### VRSTA NASLJEDNE PLAZME KOJA SE ČUVA U BANKAMA BILJNIH GENA

U bankama biljnih gena čuvaju se "stare sorte" ili lokalne populacije poljoprivrednog kulturnog bilja i divlji srodnici kultiviranih biljnih vrsta, koji su

često izvor korisnih gena, naročito otpornosti na bolesti i hladnoću. S druge strane, često se prekidaju određeni oplemenjivački programi pa se nasljedna plazma takvih oplemenjivačkih materijala čuva za eventualnu buduću uporabu u oplemenjivanju (Douglass et al., 1988).

Razvojem biotehnoloških metoda često se regeneriraju različiti somaklonovi *in vitro*, a predstavljaju genetsku varijabilnost koju bi bilo šteta izgubiti. Također, sve je više transgenih kombinacija kojih nema u prirodi, a mogu se izdvojiti i upotrijebiti u istraživanjima (Bajaj, 1979., cit. Pavlina i Vrdoljak, 1994). Razvitak mikropropagacijskih tehnika, npr. kultura meristema i mikrotuberizacija kod krumpira, također mogu dobro poslužiti kao rješenje akseničnog čuvanja gen-fonda krumpira u bankama gena i biti pogodan oblik za razmjenu biljnog materijala (Hussey i Stacey 1984, cit. Pavlina, 1994).

#### METODE ČUVANJA NASLJEDNE PLAZME - POTREBA ZA NOVIM TEHNOLOGIJAMA

Konvencionalne banke gena čuvaju uglavnom sjeme: kratkoročno, srednjeročno ili dugoročno, ovisno o vrsti sjemena (čuvanje sjemena na niskim temperaturama uz mali postotak vlage). Uz neke prednosti dugoročnog čuvanja sjemena, primjerice, sjeme mnogih biljnih vrsta može preživjeti dugoročni način čuvanja, to je relativno jeftina metoda, osigurana je međunarodna razmjena genetskog materijala, ovakav način čuvanja ima i brojne nedostatke: sjeme brojnih biljnih (naročito drvenastih) vrsta ne može preživjeti dugoročni period čuvanja, sjeme većine tropskih vrsta ne može biti čuvano niti godinu dana klasičnim načinom čuvanja, potpuno neriješen problem dugoročnog čuvanja vegetativno propagirajućih kultura, tijekom dugoročnog čuvanja sjemena opažena su oštećenja kromosoma i promjene u frekvenciji gena (Roberts, 1988.; Bonner, 1990.; USDA, 1990).

Nemogućnost dugoročnog čuvanja sjemena pojedinih biljnih vrsta zahtjeva obnavljanje uzgojem novog sjemena. Taj postupak zahtjeva velike površine za uzgoj, znatna materijalna sredstva, a kod heterozigotnog materijala i primjenu metoda koje će osigurati da se neki poželjni geni ne izgube iz populacije (Pavlina i Vrdoljak, 1994).

Navedeni razlozi potakli su znanstvenike da detaljnije istraže neke nove metode i tehnologije čuvanja germinacijske plazme kako bi se otklonili nedostaci klasičnog načina čuvanja, a k tome osiguralo čuvanje onih kultura koje ne mogu biti čuvane klasičnim postupcima (tropske i vegetativno propagirajuće kulture).

Brzim napretkom biotehnologije, naročito posljednjih petnaestak godina, postaje sve više očito da će ova znanost i čuvanje biljnih genetskih izvora postati komplementarne i sinergističke grane.

Područja koja najviše obećavaju jesu: mikropropagacija, eliminacija virusa u kulturi meristema, metode rane identifikacije genotipa, te svakako najvažnije,

*in vitro* čuvanje genofonda i krioprezervacija (Chang et al., 1988.; Day, 1988.; Flavell, 1991.).

*In vitro* metoda čuvanja podrazumijeva kombinaciju *in vitro* tehnika uzgoja (najčešće na hranidbenoj podlozi sa reduciranim hranivima) sa čuvanjem na nižim temperaturama (-3 do -12°C, sa ili bez svjetla) koje još uvijek dopuštaju rast biljnih stanica ili tkiva (Towill i Ros, 1988).

Ova tehnologija odnosi se na čuvanje materijala oslobođenog virusa, te se načelno može uspostaviti od bilo kojeg tipa eksplantata (Withers i Williams, 1986). Najčešće se u svrhu regeneracije biljaka koriste meristemski i vegetacijski vršci, te pupovi. Duljine čuvanja ovom metodom, prije nego što se ukaže potreba za subkultiviranjem, variraju od nekoliko tjedana, mjeseci i, u nekim slučajevima, godina. Primjeri duljine čuvanja prije subkultiviranja uključuju: 16 mjeseci za češnjak, 4 godine za jabuku, 1 godinu za kivi i 18 mjeseci za krušku (Towill i Ros, 1988).

Prvi uspješni rezultati čuvanja germinacijske plazme ovom metodom datiraju iz kraja '60 godina (Galzy, 1969, cit. Withers i Williams, 1986) kada su uspješno kultivirani i održavani meristemi vrste *Vitis rupestris*. Danas u svijetu postoji nekoliko aktivnih *in vitro* gen banaka gdje se kulture održavaju usporenim rastom. Primjeri za to su kolekcije kasave, krumpira i slatkog krumpira (IBPGR, 1986).

Iako se navedena metoda pokazala uspješnom pri čuvanju germinacijske plazme velikog broja biljnih vrsta (posebice vegetativno propagirajućih kultura) njen je veliki potencijalni problem pojava genetske nestabilnosti, tj. somaklonske promjenjivosti u regeneriranim biljkama, te ipak relativno česta potreba za subkultiviranjem povezana sa troškovima (Williams, 1988).

Zbog navedenih razloga, znanstvena istraživanja sve se više okreću takvoj metodi dugoročnog čuvanja germinacijske plazme koje će mitotske rekombinacije, diobu stanica i metaboličku aktivnost stanice dovesti u stanje potpune inaktivnosti i isključiti pojavu mutacija, dok će čuvana nasljedna plazma i dalje ostati vijabilna (Chang Jong, 1988.; Gotsch i Rieder, 1995). To je moguće postići krioprezervacijom - tehnikom čuvanja nasljedne plazme u tekućem dušiku na -196°C (Pavlina i Vrdoljak, 1994). Na ultraniskim temperaturama moguće je čuvati i sjeme, no *sensu stricto* ova metoda podrazumijeva dugoročno čuvanje *in vitro* kultiviranih eksplantata (Towill i Ros, 1988).

U daljnjem toku rada navode se primjeri samo nekih vrsta krioprezerviranih eksplantata.

#### *Neorganizirane stanične strukture*

Kao što je već ranije navedeno, razvoj biotehnoških metoda, poglavito transfera gena ili "genetskog inženjeringa", omogućio je dobivanje transgenih kombinacija neorganiziranih staničnih struktura velikog broja biljaka, ali u svim slučajevima još nije omogućena njihova uspješna regeneracija u biljku. Takve neorganizirane strukture korisno je sačuvati duži period dok se ne pronađu

odgovarajući postupci njihove regeneracije, a također bi same po sebi mogle biti interesantne u eventualnim budućim genetskim istraživanjima. Istraživanja kriogenog čuvanja neorganiziranih staničnih struktura započela su još '60 godina na lanu (Quatrano, 1968, cit. Pavlina i Vrdoljak, 1994). Od tada pa do danas slijedili su rezultati i na brojnim drugim kulturama. Od primjera novijeg datuma, Fretz i Lörtz, (1995) navode uspješnu krioprezervaciju embriogene suspenzije i kalusa ječma koristeći predkultiviranje s različitim krioprotektantima. Najveće rate preživljavanja (kao i regeneracije fertilnih biljaka) postignute su predkultiviranjem uzoraka s abscizinskom kiselinom. Razvijena je i tehnika uspješnog kriogenog čuvanja embriogene suspenzije različitih kultivara banane (Panis, 1995). Sa kalusom jabuke postižu se već i do 80% rate preživljavanja (IPGRI, 1995).

#### *Pelud*

Pelud se uglavnom čuva radi olakšanja hibridizacije materijala čija cvatnja pada u različito vrijeme. Također, čuvanje peluda može biti korisno i u svrhu čuvanja nasljedne plazme (Hoekstra, 1995).

Towill i Roos, (1988) navode da pelud različitih biljnih vrsta može biti tolerantan i osjetljiv na desikaciju. Tip peluda tolerantan na desikaciju podnosi sušenje do niskog sadržaja vlage što omogućuje njegovu uspješnu krioprezervaciju. Primjeri ovakvog tipa peluda uključuju grejp, maslinu, neke *Prunus* vrste, avokado, pistacio i orah.

Tip peluda osjetljiv na desikaciju (npr. pelud mnogih članova porodice *Poaceae*) gubi vijabilnost tijekom sušenja, te je stoga neprikladan za krioprezervaciju (zbog mogućnosti smrzavanja vode u stanici). Ipak, neki radovi ukazuju na mogućnost uspješnog čuvanja peluda kukuruza na ultraniskim temperaturama (Shi et al., 1995). Pavlina i Vrdoljak, (1994) navode da je moguće i uspješno čuvanje peluda raži i *Triticalea*.

I pelud nekih drugih biljnih vrsta, koji je inače nepogodan za krioprezervaciju, preživio je čuvanje u tekućem dušiku, primjerice pelud šećerne repe (Hacker et al., 1986) i prosa (Hanna et al., 1986).

#### *Meristemi ili vegetacijski vršci i pupovi*

Prema Towillu i Roosu, (1988) prilikom krioprezervacije pupova različitih biljnih vrsta pojavljuju se dvije različite strategije.

Prva koristi sposobnost aklimatizacije pojedinih biljnih vrsta na vrlo niske temperature. Pupovi takvih biljnih vrsta izoliraju se sa grana, dok su još u dormantnom stadiju, te kontroliranim postupkom zamrzavanja i odmrzavanja mogu preživjeti čuvanje u tekućem dušiku. Ova bi tehnika trebala biti upotrebljiva u svrhu čuvanja germinacijske plazme jabuke, kruške, borovnice, *Prunus* vrsta, ribiza i nekih drugih biljnih vrsta.

Druga strategija koristi se dodatkom različitih krioprotektanata (dimetilsulfoksid ili njegove kombinacije sa saharozom, glukozom, polietilen

glikolom ili prolinom) kako bi poboljšala preživljavanje vrsta koje su manje ili uopće nisu otporne na niske temperature.

Prema slobodnom izboru, iz krioprezerviranih pupova mogu se izolirati meristemski vršci i kultivirati u svrhu razvoja izdanaka (Moruguchi et al., 1985). Vršni meristem izdanaka sadrži genetički uniformnu populaciju stanica (izuzev himera) i zadržava tu uniformnost nakon što se vegetacijski vršak s meristemom izolira i razvije u izdanak. Vrijednost vršnog meristema kao kulture u čuvanju genofonda bila je jasno pokazana u čuvanju matičnjaka krumpira i jagoda (Jelaska, 1987a).

Vršni meristemi zeljastih vrsta kao što su npr: karanfil, kasava, slanutak, *Digitalis*, grašak, kikiriki, jagoda (Towill i Roos, 1988), krumpir (Harding i Benson, 1994; Schäfer-Menhur et al., 1994; Towill, 1983), bijela djetelina (Yamada, 1993), te drvenastih kao što su npr. jabuka i kruška (Katano et al., 1983; Moriguchi et al., 1985; Sakai, 1986; Chen i Kartha, 1987; Towill i Roos, 1988), mogu preživjeti čuvanje u tekućem dušiku.

S meristemima breskve i vinove loze za sada se postižu niske rate preživljavanja (Pavlina i Vrdoljak, 1994).

#### *Zigotni i somatski embriji*

Zigotni embriji izoliraju se iz sjemenke ili sjemenog zametka po završenoj oplodnji (Jelaska, 1987b). Između svih organiziranih staničnih struktura Pavlina i Vrdoljak, (1994), izdvajaju ih kao najpogodniji eksplantat za krioprezervaciju radi mogućnosti oporavka iz hipokotila, te meristema (stabličnog i korijenskog). Prema Whittersu (1995), istraživanja su usmjerena u prvom redu prema biljnim vrstama kod kojih se iz sjemena biljke vrlo teško regeneriraju, a osim toga čuvanjem uz niski sadržaj vlage njihovo sjeme gubi vijabilnost. U tu grupu spadaju neke šumske vrste (*Castanea*, *Quercus*) i tropske biljke (kokos, citrusi, mango, kakao i sl.).

Assy Bach et al., (1987) ističu krioprezervaciju zigotnih embrija kokosa kao vrlo prihvatljivu metodu čuvanja germinacijske plazme ove kulture. Uspješno su krioprezervirani i zreli i nezreli embriji kokosa (Assy Bach i Engelmann, 1992. a i b).

Osim na tropskim vrstama istraživanja su provedena i na mnogim drugim. Postignuti su uspjesi u krioprezervaciji zigotnih embrija ječma, *Brasice napus*, (Withers, 1995), graška (Mycock et al., 1995), te kukuruza, graha, *Triticalea*, breskve, kave (Pavlina i Vrdoljak, 1994), te brojnih drugih vrsta.

Somatska embriogeneza koristi se kao alternativni put regeneracije u kulturi tkiva. Prvi put su je u kulturi tkiva opisali Steward i Reinert '60 godina (cit. Jelaska 1987a). Do danas je zapažena kod velikog broja biljnih vrsta, te se može zaključiti da je taj tip regeneracije općenito moguć kod svih biljnih vrsta. Embrioidi su značajni zbog mogućnosti vegetativne propagacije velikog broja vrsta. Osim toga njihovom enkapsulacijom omogućilo bi se prenošenje velikih količina embrioida iz uzgojnih tikvica direktno u polje. Tako bi se sintetskim sjemenom moglo rukovati isto kao i prirodnim. No, embriogeneza i tehnologija

enkapsulacije još su uvijek u fazi istraživanja. Do danas su uspješno krioprezervirani somatski embriji mrkve (Withers, 1995), kave i kasave (prema Pavlina i Vrdoljak, 1994).

## BIOTEHNOLOGIJA U ČUVANJU GENOFONDA U BUDUĆNOSTI

U budućim istraživanjima mogle bi biti upotrebljene još dvije tehnologije koje bi uvelike potpomogle čuvanju materijala koji se teško čuva konvencionalnim metodama.

Prva je krioprezervacija sintetskog sjemena, uz uvijet poboljšanja tehnike indukcije i enkapsulacije somatskih embrija polimerima, kada bi regeneracija sintetskog sjemena trebala biti uspješna (Redenbaugh et al., 1987).

Druga je mogućnost čuvanja nukleinskih kiselina, u prvom redu ekstrahirane DNA. Ova strategija mogla bi biti upotrebljena pri čuvanju genetske raznolikosti malo poznatih divljih vrsta kakve pretežno rastu u tropima.

Na kraju je potrebno istaknuti da problem kriogenog čuvanja nasljedne plazme još uvijek predstavlja održanje unutarnje stabilnosti (genetske stabilnosti) organiziranih staničnih struktura izloženih kriogenom protokolu, te njihova regeneracija bez (ili s minimalnim) formiranjem kalusa ili razvojem adventivnih pupova.

Kao eksperimentalni materijal za ispitivanje pojave mutacija tijekom krioprezervacije korišteni su mikroorganizmi (Towill i Roos, 1988; Withers, 1995), ali takvim eksperimentima još uvijek nisu dobiveni jasni odgovori na pitanja: da li ekstremno dugo čuvanje biljnog materijala u tekućem dušiku ili sam kriogeni postupak izazivaju mutacije.

## BIOTECHNOLOGY IN PLANT GENETIC RESOURCES CONSERVATION

### SUMMARY

The use of *in vitro* culture techniques enlarges the options available for the collecting, *ex situ* conservation and exchange of plant species which produce no or short-lived (recalcitrant) seeds or which are vegetatively propagated. *In vitro* storage techniques, including slow growth for the long term, present great advantages for the conservation of the genetic resources of problem species. In addition, *in vitro* techniques offer the possibility of eliminating pathogens and thus conserving and exchanging germplasm in a disease-free conditions.

Key words: germplasm preservation, *in vitro* techniques, cryopreservation.

LITERATURA - REFERENCES

1. Assy Bah, B., et al. 1987: Use of zygotic embryo culture to collect germplasm of coconut (*Cocos nucifera* L.). *FAO/IBPGR Newsletter* 71: 4-10.
2. Assy Bah, B. i Engelmann F. 1992. a: Cryopreservation of immature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Cryoletters* 13: 67-71.
3. Assy Bah, B. i Engelmann F. 1992. b: Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plants. *Cryoletters* 13: 117-126.
4. Bonner, F. T. 1990: Storage of seeds: Potential and limitations for germplasm conservation. *Forest Ecology and Management*, 35, 35-43.
5. Chang, T. T., et al. 1988: Management and utilization of plant germplasm collections. U: *Biotic Diversity and Germplasm Preservation, Global Imperatives*, 127-160, Beltsville, USA.
6. Chang Yong, S. 1988: Microbial germplasm. U: *Biotic Diversity and Germplasm Preservation, Global Imperatives*, 241-274, Beltsville, USA.
7. Chen, T. i Kartha, K. K. 1987: Cryopreservation of woody species. U: *Cell and Tissue Culture in Forestry*, vol. 2, 305-319, Dordrecht.
8. Day, P. R. 1988: The impact of biotechnology on conventional germplasm conservation and use. U: *Biotic Diversity and Germplasm Preservation, Global Imperatives*, 379-403, Beltsville, USA.
9. Douglass, et al. 1988: Systematics, diversity, and germplasm. U: *Biotic Diversity and Germplasm Preservation, Global Imperatives*, 3-12, Beltsville, USA.
10. Flavell, R. B. 1991: Molecular biology and genetic conservation programmes. *Biological Journal of the Linnean Society* 43: 73-80.
11. Fretz, A. i 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.). *Jornal of Plant Physiology* 146, 489-496, Hamburg.
12. Goodman, M. M. 1990. a: What genetic and germplasm stocks are worth conserving? *Genetic Resources at Risk: Scientific Issues, Techonogies, and Funding Policies*. Oakland, SAD, 1-10.
13. Goodman, M. M. 1990. b: Genetic and Germplasm Stock Worth conserving. *Journal of Heredity* 81, 11-16.
14. Goodman, M. M. i Castillo-Gonzales, F. 1991: Plant Genetics: Politics and realities. *Forum for Applied Research and Public Policy* 3, 74-85.
15. Gotsch, N. i Rieder, P. 1995: Biodiversity, Biotechnology, and Institutions Among Crops: Situation and Outlook. *Journal of Sustainable Agriculture*, vol. 2., 5-40.
16. Hanna, W. W. et al. 1986: Longterm storage of pearl millet pollen. *J. Hered.* 77: 361-362.
17. Harding, K. i Benson, E.E. 1994: A study od growth, flowering, and tuberisation in plants derived from cryopreserved potato shoot-tips: implications for in vitro germplasm collections. *Cryo-letters* 15, 59-66, Nottingham.
18. Hawkes, 1990: What are genetic resources and why should they be conserved? *Impact of science on society*, no. 158., 97-106.
19. Hecker, R. J., et al. 1986: Storage of sugarbeet pollen. *Euphytica* 35: 777-783.
20. Hoekstra, F. A. 1995: Collecting pollen for genetic resources conservation. U: *Collecting Plant Genetic Diversity*, IPGRI, Rome 527-550.
21. IBPGR 1986: *Design, Planning and Operation of In Vitro Genebanks*, Rome.
22. IPGRI 1995: *European Malus Germplasm*, Rome.
23. Jelaska Sibila (a), 1987: Kultura tkiva i stanica - nove mogućnosti razmnožavanja biljaka. U: *Hrana i razvoj*, 233-238.
24. Jelaska Sibila (b), 1987: Kultura embrija i megagametofita. *Semenarstvo* 4-6, 271-275.



25. Katano, M., et al. 1983: Survival of dormant apple shoot tips after immersion in liquid nitrogen. HortSci. 18: 707-708.
26. Moriguchi, T., et al. 1985: Freezepreservation of dormant pear shoot apices. Jpn.J. Breed. 35: 169-199.
27. Mycock, D.J. et al. 1995. Cryopreservation of somatic embryos of four species with and without cryoprotectant pre-treatment. Annals of Botany 75, 331-336, Johannesburg.
28. Panis, B. 1995: Criopreservacija of Musa germplasm. Infomusa 4, 17-20.
29. Pavlina, Renata 1994: Mikropropagacija: mogućnosti njene primjene u hrvatskoj poljoprivredi. Siemenarstvo 5, 317-326.
30. Pavlina, Renata i Vrdoljak, Antonija 1994: Krioprezervacija nasljedne plazme. Siemenarstvo 6, 501-517.
31. Redenbaugh, K., et al. 1987: Encapsulation of somatic embryos in syntenic seed coats. Hort. Sci. 22: 803-809.
32. Roberts, E. H. 1988: Seed Aging: The Genome and Its Expression. U: Senescence and Aging in Plants, 456-498.
33. Roberts, E. H. 1989: Seed storage for genetic conservation. Plants today, vol. 2., 12-18.
34. Sakai, A. 1986: Cryopreservation of germplasm of woody plants. U: Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol.1, 113-129, Berlin.
35. Schäfer-Menuhr, et al. 1994. Long-term storage of old potato varieties by cryoconservation of meristems in liquid nitrogen. Landbauforschung Völkenrode 44 301-313, Braunschweig.
36. Shi, S.X., et al. 1994. The effect of long term preservation of maize pollen under ultra-low temperature on the agronomic characters of its progeny. Beijing Agriculture Sciences 12, 14-15, Beijing.
37. Towill, L. E. 1983: Improved survival after cryogenic exposure of shoot-tips derived from in vitro plant cultures of potato. Cryobiology 20: 567-573.
38. Towill, E. L. i Roos, E. E. 1988: Techniques for preserving of plant germplasm. U: Biotic Diversity and Germplasm Preservation, Global Imperatives, 379-403, Beltsville, USA.
39. USDA, 1990: Seeds for Our Future, Beltsville, USA.
40. White, G. A. 1989: History and Operation of the National Plant Germplasm System. Plant Breeding Reviews, vol. 7, 6-56.
41. Williams, T. J. 1988: Plant germplasm preservation: a global perspective. U: Biotic Diversity and Germplasm Preservation, Global Imperatives, 81-96, Beltsville, USA.
42. Withers, L. A. i Williams J. T. 1986: In vitro conservation. IBPGR Research highlights, Rome, 1-21.
43. Withers, L. A. 1995: Collecting in vitro for genetic resources. U: Collecting Plant Genetic Diversity, IPGRI, Rome, 511-526.
44. Yamada, T. 1993. Cryopreservation of forage crops. JICA Ref Series 6, 87-105, Nagasaka.
45. Zedan, H. 1995: Loos of plant diversity: a call for action. U: Collecting Plant Genetic Diversity, IPGRI, Rome.

**Adrese autora - Authors' adresses:**  
dipl. inž. Hrvoje Rukavina  
prof. dr. sc. Ivan Kolak  
mr. sc. Zlatko Šatović  
Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu  
Zavod za sjemenarstvo  
Svetošimunska 25  
HR - 10 000 Zagreb

**Primljeno - Received:**  
15. 03. 1998.