

## KRIOPREZERVACIJA NASLJEDNE PLAZME

Renata PAVLINA,<sup>1)</sup>  
Antonija VRDOLJAK<sup>2)</sup>

Pregledni znanstveni rad  
Primljeno: 7. 06.1994.

### SAŽETAK

Za veći broj vrsta je postignuta regeneracija nakon dužeg čuvanja na vrlo niskim temperaturama različitih biljnih djelova, kao što su: protoplasti, stanične suspenzije, tkiva i organa. Ti rezultati upućuju na mogućnost primjene krioprezervacije za očuvanje vrijedne i rijetke nasljedne plazme, posebice vegetativno razmnožavajućih vrsta.

U ovom radu je dat pregled mogućnosti kultiviranja različitih eksplantata i njihovog dugoročnog čuvanja kod vrlo niskih temperatura.

Ključne riječi: krioprezervacija, dugoročno čuvanje nasljedne plazme kod vrlo niskih temperatura.

### CRYOPRESERVATION OF GERMPLASMS

Renata PAVLINA,  
Antonija VRDOLJAK

Scientific review  
Received: 7. 06. 1994.

### SUMMARY

As entire plants have recently been regenerated from frozen cultures of protoplasts, cells, tissues and organs, which were stored at super-low temperatures for various lengths of time, that suggests the possibility of utilizing cryogenic methods for the conservation of important and rare germplasm, especially of vegetatively propagated plants. In this paper there are a review of possibilities for culturing various explants and their storing at super-low temperatures for long-term conservation.

Kew words: cryopreservation, long-term conservation at super low temperatures

### UVOD

Porastom ljudske populacije uništavaju se pojedini prirodni resursi, koji izvor korisnih gena. Ovo se, poglavito odnosi na devastiranje divljih kultiviranih vrsta često se potiskuju "stari genotipovi" (2) sa zanimljivim agronomskim značajkama, koje bi mogli u budućnosti koristiti pri kreiranju genotipova za neke

<sup>1)</sup> Doc. dr. Renata Pavlina, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

<sup>2)</sup> Dipl. inž. Antonija Vrdoljak, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

nove ekološke prilike druge pristupe proizvodnji. Razvitkom in vitro tehnika sve je više somaklonova (3) i transgenih kombinacija (4) kojih nema u prirodi, a mogu se izdvojiti, uskladištiti i upotrijebiti za istraživanja (Bajaj, 1979). Po vrstama i visokoj gospodarskoj vrijednosti sličnih mnogobrojna skupina vegetativno propagirajućih kultura (5) čije je dugoročno čuvanje klasičnim metodama gotovo nerješiv problem. Ako spominjemo činjenicu da do danas oko deset tisuća vrsta direktno koristi čovjek, a što je ne zaboravimo, tek neznatan postotak od ukupnog broja vrsta koje nastavljaju svijet, i da od toga broja samo oko tisuću ima neku ekonomsku vrijednost, da bi ih svega sto pedeset bilo uistinu uključeno u proizvodnju (Thorpe, 1986), onda moramo biti svjesni toga da drastično smanjujemo biljni pokrov po vrstama i broju primjeraka. Stoga je imperativ na sustavu i kvalitetan način sakupiti i sačuvati postojeći gen-fond barem korisnih biljaka i njihovih divljih srodnika od propadanja. Upravo su navedene činjenice bile razlozi radi kojih su Ujedinjeni narodi 60-tih godina ovog stoljeća započeli akciju za izradu programa u kojima bi se definirali standardni postupci snimanja stanja, razradile metode za istraživanja, ocjenjivanja, čuvanje, te uporabu biljnih resursa (Harry i Thorpe, 1991). Ti su programi predviđali čuvanje i onog dijela nasljedne plazme, koji trenutačno nije uključen u aktualne oplemenjivačke programe (Bajaj, 1979). Savjetodavna skupina za međunarodna istraživanja u poljoprivredi (The Consultative Group of International Agricultural Research - CGIAR) je poduprta of FAO-a. Izradila Razvojni program, te utemeljila godine 1971. Svjetsku banku biljnih gena, a godine 1984. je utemeljen Međunarodni ured za biljne genetske resurse (IBPGR - International Board for Plant Genetic Resources), s ciljem sakupljanja, konzerviranja i razmjene biljnog materijala diljem svijeta (Juma 1989; prema Harry i Thorpe, 1991). Klasične banke biljnih gena konzerviraju, uglavnom, sjeme. Zbog ograničene mogućnosti dugoročnog očuvanja klijavosti, sjeme se, ovisno o vrsti, svakih nekoliko godina sije i klasično, uzgojem novog sjemena obnavlja. Taj postupak zahtijeva velike površine za uzgoj i znatna materijalna sredstva, a kod heterozigotnog materijala i primjenu metoda koje će osigurati da se ne izgube neki poželjni geni iz populacije. Dakako, da pri tom moramo biti svjesni činjenice da je mala vjerojatnost potpune fenotipske podudarnosti čak i dijela potomaka s heterozigotnim donatorom sjemena, a k tome klasične genske banke nemaju uopće, riješen problem dugoročnog čuvanja vegetativno - propagirajućih kultura i in vitro proizvedenih novih genskih kombinacija. Sve su to razlozi zbog kojih se sve više istražuju metode koje bi otklonile nedostatke čuvanja klasičnim postupcima. Tako su se i razvile metode in vitro uzgoja, u relativno malom volumenu potencijalno velikog broja, budućih organizama, uglavnom istog početnog genotipa. Kombiniranje in vitro tehnika s čuvanjem na nižim temperaturama usporava metabolizam i diobu stanica, pa se tako smanjio broj in vitro presađivanja i time izdaci za održavanje aktivnog pogona, ali nije dugoročno otklonjena potreba takvog zahvata. No, razvitak svekolikih tehnika in vitro uzgoja različitih biljnih dijelova, svakako je doprinio ostvarenju ideje dugoročnog čuvanja biljnog materijala krioprezervacijom.

## KRIOPREZERVACIJA KAO METODA DUGOROČNOG ČUVANJA NASLJEDNE PLAZME

Krioprezervacija podrazumijeva konzerviranje nasljedne plazme zamrzavanjem na  $-196^{\circ}\text{C}$ , u tekućem dušiku, u uvjetima u kojima se jako uspori ili potpuno inaktivira metabolizam u stanicama i biljni materijal dovodi u fazu potpunog mirovanja (Bajaj, 1979). Za potpuni uspjeh ove metode kod neke vrste mora se posebno istražiti kultiviranje pojedinih biljnih dijelova *in vitro*, pronaći primjeren postupak zamrzavanja, odmrzavanja, te svakako, uspješne regeneracije u biljku. Do danas je krioprezervirano nešto manje od 100 vrsta, najvećma iz umjerene i tropske zone (Thorpe, 1990), uključujući mono i dikotiledone, te konifere (Kantha, 1985; Dereuddre i Engelmann, 1987). Krioprezervirani su razni biljni materijali (Engelmann, 1992) i može se već zaključiti da se lakše konzerviraju neorganizirane stanične strukture (stanične suspenzije, protoplasti, kalusi), nego već organizirane (meristemi, somatski i zigotni embriji; Dereuddre, 1992), ali kod prvospomenutih je naglašeniji problem regeneracije (Assy-Bah i Engelmann, 1991).

## IZBOR POČETNOG BILJNOG MATERIJALA ZA KRIOPREZERVACIJU

Sjeme, gomolji i lukovice su uglavnom uzorci biljnog materijala koji se mogu kratkoročno ili srednjoročno čuvati u klasičnim gen - bankama. Uzorci za dugoročno čuvanje krioprezervacijom bitno se razlikuju od uzoraka koji se čuvaju klasičnim načinom. Krioprezervirati se mogu različiti eksplantati, koji su *in vitro* uzgojeni ili od intaktne biljke izdvojeni biljni dijelovi. Nabrojiti ćemo samo neke od njih:

### **(1) Kalusne, protoplastne i stanične suspenzijske kulture (u prirodi postojećih ili genetskim inženjerstvom dobivenih transgenih kombinacija).**

Ovo su pogodni sustavi za manipuliranje na ultra-niskim temperaturama, što se posebice odnosi na protoplaste, kod kojih je eliminirana napetost stanica za vrijeme "zamrzavanja", pa je manja mogućnost ozljede, te stoga viša stopa preživljavanja (Bajaj, 1979). To su sustavi koji su pogodni za genske manipulacije, pa se transgene kombinacije "zamrzavanjem" protoplasta ili staničnih suspenzija mogu "trajno", dugoročno sačuvati za neke buduća istraživanja. Od prvih istraživanja takve vrste na lanu (Quatrano, 1968), slijedili su brojni primjeri na javoru (Sugawara i Sakai, 1974), tvrdači (Mazur i Hatmann, 1978), mrkvi (Latta, 1971), soji (Bajaj, 1976), duhanu (Finkle i sur, 1975) i mnogim drugim kulturama. Ova istraživanja doprinose boljem razumijevanju temeljnih mehanizama prilagodbe na hladnoću na staničnoj razini, ali omogućuju i dobivanje na hladnoću tolerantnih i na mraz otpornih biljaka. U slučaju krioprezerviranja protoplasta, stanica ili kalusa mora se riješiti problem regeneracije cijelih biljaka iz tih sustava, da bi krioprezervacija imala i praktičnu, a ne samo istraživačku vrijednost.

## (2) Pelud i peludni embrioidi

Još od istraživanja Bredemann-a i sur. (1974; prema Bahah-u, 1979) zamrzavanje peluda je izazivalo znanstvenu znatiželju mnogih znanstvenika (Visser, 1955; Linskens, 1964; Roberts, 1975; prema Bajaj, 1979). Glavna zamisao zamrzavanja peluda na ultra- niskim temperaturama sadržavala je ideju o dugoročnom očuvanju vijabilnosti oprašivača koji bi mogao poslužiti u križanjima prostorno udaljenih, a vremenski različito cvatućih roditelja. Smrzavanjem bi se eliminiralo i prenošenje nekih bolesti oprašivanjem, a oprašivač bi bio na raspoloženju kada i gdje želimo. Navest ćemo samo nekoliko primjera uspješne krioprezervacije peluda. Danas se uspješno čuva na ultraniskim temperaturama pelud kukuruza, raži i Triticale (Barnabas i sur, 1992). Pelud grožđa su Ganeshan i sur., (1992a) uspješno čuvali sedam godina, pelud limuna zadržao je za 5-togodišnjeg čuvanja kljavost, a pelud manga nakon dvogodišnje krioprezervacije (Ganeshan i sur, 1992), a ispitivanja su još uvijek u tijeku.

Moguće je inducirati razvitak embrioida iz peluda (direktno ili preko kalusa kao međufaze), čijim bi se zamrzavanjem konzervirao jednostruki (haploidni) komplet genskih uputa. Regeneracijom haploidnih biljaka iz embrioida i njihovom dihaploidizacijom dobivaju se najhomozigotni organizmi u prirodi. No, haploidne in vitro kulture tendiraju k diploidskoj selekciji stanica, koje su nastale endomitozama, pa diploidne stanice obrastu (zbog brže mitotske diobe) haploidnu staničnu nakupinu (Sacristan, 1971). Kako su same haploidne kulture od velike vrijednosti u istraživanjima stanične genetike, to je nužno imati i održati stabilne haploidne sustave i za genetsko istraživačke, ali i oplemenjivačke svrhe. Dodavanjem različitih stabilizirajućih sredstava, kao što je bio parafluorofenilanin (Gupta i Carlson, 1972) nije postignuta stabilna haploidna in vitro kultura, ali krioprezervacija haploidnih in vitro kultura (peludnih embrija = embrioida, ili izoliranih antera) dala je vrlo povoljne rezultate kod duhana i petunije (Bajaj, 1979). Mladi embrioidi u globularnoj fazi su andorgenezom regenerirali biljke, dok diferencirani embriji (srolika faza) samo su djelomično preživljavali uz dugu laganu fazu u mitotskoj aktivnosti, čije trajanje (lag faza) je pozitivno korelirano sa stupnjem razvitka embrioida. Svakako je moguće zaključiti da se krioprezervacijom peludnih embrioida mogu dugoročno sačuvati haploidi.

## (3) Zigotni i somatski embriji

Dok je u krioprezervaciji postignut vidan napredak neorganiziranih staničnih struktura (protoplasta, staničnih suspenzija još ima poteškoća u manipulaciji organiziranim tkivima (plodovima, zigotnim i somatskim embrijima. (Dereuddre, 1992). Razlog ovim razlikama je činjenica da je kod neorganiziranih tkiva dovoljno da preživi krioprezervaciju oko 50% stanica, dok kod organiziranih treba nakon krioprezervacije normalno funkcionirati kompletan organ ili njegov pretežiti dio, pa su tu zahtjevi veći i teže im je udovoljiti.

Kod embrija je mogućnost oporavka iz dva vršna meristema (stabljičnog korijenskog) i iz hipokotila, pa je i regeneracija uspješnija nego iz još organizira-

njih struktura, zato su embriji između svih organiziranih struktura najpogodniji materijal za krioprezervaciju. Krioprezervacija zigotnih embrija je posebno pogodna metoda za očuvanje nasljedne plazme onih kultura koje se vrlo teško održavaju sjemenom i vrlo su nepodesne za čuvanje konvencionalnim metodama. Tu naročito spadaju neke tropske kulture kao što su kokos (Chin i sur, 1989), mango, lan, neke palme (Grout i sur, 1983), fikus, kod kojih se u čuvanju sniženjem vlage, sjeme oštećuje i gubi njegova vijabilnost (Kartha, 1992). Zigotni embriji (izolirani iz sjemenke) ili sjemenog zametka nakon oplodnje jajne stanice su organi koji osiguravaju relativno jednostavnu regeneraciju nakon krioprezervacije, ali postoje poteškoće oko krioprezerviranja tih embrija, jer su to već morfološki dobro definirane strukture s više različitih staničnih tipova. Oni imaju nešto manje vode od somatskih embrija, što zigotnim embrijima daje prednost kod krioprezervacije. Dugoročno se smrzavaju prije kultiviranja in vitro. Ovisno o razvojnom stadiju oni mogu biti znatno veći od somatskih embrija čak i veći od 1 cm, npr. kod kokosovog embrija (Engelmann, 1992). Kod zigotnih embrija sačuvana je struktura embrija, tako da se biljka nakon odmrzavanja direktno može regenerirati iz svakog pojedinačno embrija ili pojedinih njegovih dijelova. Kendall i sur. (1993) su uspješno krioprezervirali nezrele embrije proljetne pšenice koristeći predkultiviranje s abscisinskom kiselinom. Uspješno su kultivirani i zigotni embriji vrste Vigna (Normah i Vengadasalam, 1992), kave (Engelmann, 1992), kokosa (Assy-Bah i Engelmann, 1992), limuna, graha, graška (Engelmann, 1992), kakaa (Contreras i sur, 1992), divljeg kestena (Pence i Dresser, 1988), vrste Brassica napus (Withers, 1982), pastirske torbice (Monnier i Laddet, 1980), bukve (Pence i Dresser, 1988), ječma (Withers, 1982), graha (Zavala i Sussex, 1986), graška (Mycock i sur, 1989), breskve (de Boucaud i Brison, 1991), hrasta (Pence i Dresser, 1988), Triticale (Bajaj, 1983), kukuruza (Delvallee i sur, 1989)...

Somatski embriji (zvani embrioidi) razvijaju se gotovo isključivo in vitro: direktno ili iz kalusnih, nediferenciranih stanica (kalusa razvijenog iz meristema, peluda, vegetacijskih vršaka, kotiledona, staničnih suspenzija...). Somatski embriji su klonsko potomstvo zato se može očekivati međusobno genetski identične pa stoga i idealne sustave vegetativnog propagiranja i kloniranja. Metoda je ne samo brža od klasične propagacije sjemenom već omogućava da su potomci identični majčinskoj biljci, donoru tkiva za in vitro somatsku embriogenezu (Bajaj, 1979), posebno ako je embriogeneza direktna bez kalusne međufaze.

Somatski embriji su od važnosti jer nude mogućnost vegetativne propagacije velikog broja vrsta, ali i zbog mogućnosti proizvodnje sintetskog sjemena.

Krioprezervacija somatskih embrija je vrlo pogodan sustav čuvanja konifera i drugih vrsta koje imaju dugačak regeneracijski ciklus (Kartha i sur, 1988). Pojava somatske embriogeneze je istraživana i kod nas na bundevi (Jelaska, 1972, 1974), kukuruзу (Pavlina i Jelaska, 1990; Pavlina, 1991, Pavlina 1992), a takva istraživanja su karika u lancu do krioprezervacije ovih struktura. Engelmann i sur. (1985) navode somatsku embriogenezu kao pogodni sustav za propagaciju, ali i prezervaciju uljane palme. Uspješno su krioprezervirani somatski embriji mrkve

(Withers, 1979), kave (Bertrand-Desbrunais, 1991; prema Engelmann, 1992) i kasave (Sudarmonowati i Henshaw, 1990).

#### (4) Meristemski vršci ili vegetacijski vršci

Još od Morel i Martinovih istraživanja (1952), ovom se metodom uzgaja zdravo potomstvo od biljaka zaraženih virusima, viroidima i/ili drugim patogenima. Metoda je komercijalizirana za masovnu propagaciju elitnih voćaka, ukrasnog grmlja, drveća i cvijeća.

Meristemski vršci imaju barem tri značajne mogućnosti koje ih izdvajaju kao vrlo pogodan eksplantat za krioprezervaciju. Prvo, oni se mogu progresivno, masovno propagirati, tako da se od jednog vrška može uzgojiti i do 10 biljaka (Pierik, 1991). Drugo, uzgoj ide bez kalusne međufaze, što omogućuje genetsku stabilnost. Upravo je to razlog zašto se uzimaju meristemi s haploidnih biljaka, da se ovim putem umnoži haploidni genotip, koji se zbog nepravilne gametogeneze teško sjemenom razmnožava i održava. I treće, ovom metodom je osigurano zdravo potomstvo (Jelaska i Šutina, 1977; Šutina i Jelaska, 1978), pa zamrzavamo nezaražen materijal. Metoda krioprezervacije vegetacijskih vršaka naći će svoj puni smisao u čuvanju vegetativnopropagirajućih kultura, u očuvanju njihove genetske raznolikosti, u očuvanju kultura koje ne proizvode vijabilno sjeme ili čije je sjeme teško čuvati konvencionalnim metodama (Kartha, 1992). Općenito se vjerovalo da će se sve navedene prednosti in vitro kultiviranja vegetacijskih vršaka moći jednostavno i uspješno iskoristiti u krioprezervaciji zato što su vršci građeni od malih stanica, s gustom citoplazmom, tankih stijenki za koje se mislilo da će uspješno podnositi zamrzavanje na ultra-niskim temperaturama. Nažalost zaredali su se neuspjesi i u vrlo ograničnom broju istraživanja je bilo zadovoljavajuće preživljavanje (Haskins i Kartha, 1980). Nakon prvih neuspjeha zadovoljavajuća krioprezervacija meristema je postizana primjenom različitih metoda krioprezervacije kod konifera (Langis i sur, 1990; Dereudde, 1992; Thamoury i sur, 1992), krizantema i gipsofile (Fukai i sur, 1991). Kohmura i sur. (1992) istražuju mogućnosti krioprezerviranja pupova asparagusa i graška (McAdams i sur, 1991), a za jabuku (Tyler i Stushnoff, 1988), krušku (Dereudde i sur, 1990) i dud (Niino i Sakai, 1992) to je obećavajuća metoda čuvanja. S breskvom se, za sada, postižu još niske rate preživljavanja, svega 10-20%, pa se intenzivno radi na poboljšanju metode (Paulus i sur, 1992).

S vinovom lozom su eksperimentirali Ganeshan i Alexander, (1990; prema Ganeshan i sur., 1992a), a 30 postotnu generaciju loze i 80 postotnu regeneraciju kruške postižu Plessis i sur. (1992). Danas se vrlo uspješno krioprezerviraju meristemi jagode (Kartha i sur, 1989).

#### POSTUPAK KRIPREZERVACIJE EKSPLANTATA

Postupak zamrzavanja bi mogli pregledno prikazati u 6 faza.

1. Faza: suspenzija eksplantata (protoplasta, stanica, tkiva i organa) u tekući medij u kušalici ili Erlenmayer-tikvici uz hlađenje u ledenoj kupki sve do sedi-

mentiranja eksplantata se odvoji višak tekućine iznad istaloženog eksplantata i potom odpipetira 1 ml koncentrirane suspenzije protoplasta ili stanica, ili odvoji 20 - 100 embrija ili vegetacijskih vršaka. Uzorak se prebaci u sterilnu kušalicu.

## 2. Faza: predkultiviranje uzorka

Uzorak eksplantata biljnog podrijetla uvijek u stanici sadrži vode koja se lako kristalizira, a vodeni kristalići mogu u tolikoj mjeri razoriti stanicu da ona ne preživi odmrzavanje (Engelmann, 1992). Stoga su sva predkultiviranja zapravo postupci pripreme stanice kako do te kristalizacije ne bi ni došlo u toku smrzavanja ili odmrzavanja. Svi ti postupci imaju za cilj djelomičnu dehidraciju stanice u svrhu sprječavanja oštećenja od kristala vode u njoj. Danas se u literaturi navode tri klasična postupka predkultiviranja uzorka za krioprezervaciju:

### 2.1.) sušenje uzorka

#### 2.1.1.) desikacija uzorka,

#### 2.1.2.) dehidracija enkapsuliranog uzorka.

2.2.) ododavanje supstanci (krioprotektanata) uzorku, što se u novije doba podvodi pod pojam vitrifikacije,

### 2.3.) kombinacija djelovanja krioprotektanata i desikacije.

#### 2.1.1.) Desikacija uzorka

Tehnika uključuje sušenje uzorka u struji protočnog sterilnog zraka u laminaru u trajanju od dva do četiri sata što je u svezi s veličinom eksplantata. najčešće se koristi za isušivanje embrija, pa će za nezrele kraće trajati, nego za veće, zrele embrije. na duljinu sušenja utjecat će temperatura i vlažnost zraka, a vlaga bi se morala sniziti u tkivu s 50 - 60% na 10-16% (Engelmann, 1992). Dalja dehidracija dovela bi do gubitka životnosti stanice, jer bi se javila oštećenja zbog dehidracije. Kako su uvjeti sušenja u laminaru promjenljivi to i rezultate ovakve dehidracije nije moguće uvijek ponoviti. Stoga Uragami i sur. (1990) preporučuju upotrebu silikagela za dehidraciju aksilarnih (pazušnih) pupova asparagusa, koja omogućuje dobivanje konzistentnijih rezultata sušenja.

#### 2.1.2. Dehidracija enkapsuliranog uzorka (umjetnog sjemena).

U najnovije vrijeme Dereuddre (1992) preporuča dehidraciju zaštićenog vegetacijskog vrška ili somatskog embrija.

Uzorci se suspenziraju u hranjivu otopinu uz dodatak 3% Na- alginata. Sterilnom pipetom se suspenzija prebaci na podlogu kojoj je dodano 100 mM CaCl<sub>2</sub>

Kuglice od oko 4 mm u promjeru, koje sadrže nekolimo (1 - 3 somatska embrija ili vegetacijska vrška) rekultiviraju se nakon nekoliko dana na hranidbenu podlogu koja sadrži 0,3 - 1,5 M saharoze. Kuglaste nakupine se potom suše u struji sterilnog zraka na sobnoj temperaturi do 6 sati, do vlažnosti 19 - 20 %. Iza sušenja ovakvo umjetno sjeme se prebacuje u posebne kušalice ( u kojima nema tekućine) i hladne se direktnim uranjanjem kušalice u tekući dušik ili se hlade stupnjevito (u 2 faze): od 20°C na - 40°C, - 80°C ili -150°C, u prvom potezu, a potom se uzorak uranja u tekući dušik na - 196°C.

2.2.) Vitrifikacija - uz uporabu krioprotektanata

Vitifikacija je pojava formiranja čvrste, staklu nalik strukture koja se formira ispod temperature smrzavanja.

Jedan od najčešćih krioprotektanata je dimetilsulfoksid (DMSO) kojeg su još Lovelock i Bishop (1959) koristili kao antifriz za životinjske stanice. Međutim, DMSO u koncentraciji od 10 - 15 % narušen metabolizam proteina, pa se mora koristiti u nižim i za uzorak primjerenim koncentracijama (Bajaj, 1979). Često se koriste i drugi protuzamrzivači kao što su glicerol, saharoza, sorbitol, manitol i polietilenglikol, sami ili u kombinaciji.

Latta (1971) je dokazao da je sam DMSO u koncentraciji od 5% neodgovarajući protuzamrzivač, ali da je kombinacija DMSO (2,5%), glicerola (2,5%) i saharoze (6,5%) bila zadovoljavajuća za preživljavanje stanica vrste *Ipomea*.

Odvojena uporaba krioprotektanata je bolja za preživljavanje somatskih embrija vrste *Citrus sinensis* (Marin i Duran-Vila, 1988).

Točna uloga saharoze u dehidraciji je nepoznata. Misli se da, kao i drugi krioprotektanti, tako i saharoza mijenja strukturu vode formirajući vodikove mostove i povisujući viskozitet otopine oko uzorka, pospješuje stvaranje staklaste tvorevine, a sprečava kristalizaciju pri zamrzavanju i odmrzavanju (Franks, 1985; prema Dereuddre, 1992). Uspješnije je dugoročno čuvanje staničnih suspenzija ako su one dispergirane u tekućem krioprotektivnom sredstvu, dok je enkapsulirana dehidracija bolji predtretman za krioprezerviranje meristemskih vršaka, zigotnih i somatskih embrija.

### 2.3. Kombinirana metoda predtretmana

Ova metoda uključuje desikaciju iza koje slijedi tretman s krioprotektantima. U nekih vrsta se pokazala bolja od pojedinačne desikacije ili samo obrade krioprotektantima, npr. kod krioprezerviranja embrija graška (Mzcock i sur. 1990; prema Engelmann, 1992.).

### 3. Faza: Zamrzavanje uzorka

Ultra-dubokim zamrzavanjem stanica se mora dovesti u stanje mirovanja, glede metaboličkih i mitotskih aktivnosti. Metode dubokog zamrzavanja bi se mogle svrstati u tri temeljne skupine.

#### 3.1. Metode naglog zamrzavanja direktnim uranjanjem u tekući dušik.

Ovom metodom se zbog vrlo velike brzine zamrzavanja, 4800°C/min i naglog odmrzavanja, 9000°C/min kod nekih vrsta kao što je metvica (Towill, 1990) postižu vrlo dobri rezultati u preživljavanju (57% vegetacijskih vršaka). Ova metoda se pokazala pogodnom i za stanice mrkve (Sakai, 1971; prema Bajaj, 1979). Bajaj (1977 a i b) je dokazao da je moguće naglo zamrzavanje stanica krumpira i konoplje, a Seibert (1976) je to isto dokazao za meristeme karanfila.

#### 3.2. Dvofazno zamrzavanje ili predzamrzavanje

Progresivno se uzorak smrzava brzinom oko 0,5°C/min od 20°C na -40°C, -80°C ili -150°C, prije uranjanja u tekući dušik na -196°C (Dereuddre, 1992).

#### 3.3. Stupnjevito zamrzavanje

Uzorak se sporo zamrzava u malim temperaturnim obrocima brzinom 1 do



5°C u minuti. Za stanične suspenzije je pogodna krioprezervacija upravo ovom metodom i to s brzinom hlađenja 2°C/min, a što su već svojim istraživanjima dokazali Latta (1971), Dougal i Wetherell (1974), Henshow (1975), Nag i Street (1975; prema Bajaj, 1979). Postupno hlađenje je imalo još bolji uspjeh, ako su biljke donori tkiva ili organa za krioprezervaciju rasle pod hladnim uvjetima uzgoja, a jednako pozitivno je djelovalo na povećan postotak preživljavanja predkultiviranje vegetacijskih vršaka loze u otopini saharoze prije krioprezervacije (Plessis i sur. 1991).

Pogrešno bi bilo zaključiti da je neka od metoda krioprezervacije najbolja. Jednoznačni zaključak o primjeni samo jedne od ovih metoda bio bi ishitren, jer je uspješna primjena nekog tipa zamrzavanja uvelike ovisna o vrsti, kulturi s kojom eksperimentiramo, a možda i još više o vrsti eksplantata i njihovom fiziološkom statusu. Stoga treba koristiti iskustva iz prethodnih i dopuniti ih vlastitim istraživanjima.

#### 4. Faza: Čuvanje duboko zamrznutih kultura

Temperatura čuvanja mora biti konstantna temperatura tekućeg dušika -196°C. Duljine čuvanja nakon koje će biti zadovoljavajuće preživljavanje su još u fazi ispitivanja. Za somatske embrije palme Engelmann (1991) prema Engelmann, (1992) tvrdi da su zadovoljavajuće preživljavali nakon 15 mjeseci čuvanja u tekućem dušiku.

#### 5. Faza: Odmrzavanje

Ono može biti vrlo naglo (9000°C/min) kao što je Towill (1990) odmrzavao vegetacijske vrške metvice i postigao 57% preživljavanje, a može biti i postupno u vodenoj kupelji na temperaturi 40°C. Neke kulture jednako dobro podnose naglo i postupno odmrzavanje bez oštećenja, kao što je slučaj sa somatskim embrijima uljane palme (Engelmann, 1992).

#### 6. Faza: Prilagodba kultura po odmrzavanju

Kultiviranje nakon odmrzavanja se unekoliko razlikuje od standardnih postupaka za iste uzorke koji nisu zamrzavani. Nekim se kulturama reducira šećer u hranidbenoj podlozi i uzgajaju se u mraku, što rezultira povećanom regeneracijom (Bertrand - Desbrunais, 1991; po Engelmann, 1992), nekima se dodaje auksin u otopinu što simulira replifikaciju stanica (Engelmann i sur., 1985), dok je kod zigotnih embrija inicijalni rast najčešće brz, ali se razlike javljaju u odnosu na kontrolu u kasnijim fazama razvitka.

## ZAKLJUČAK

Već je Bajaj (1979) upozoravao na potencijalne mogućnosti uporabe metode zamrzavanja biljnog materijala kod ultra-niskih temperatura ističući prednosti manipuliranja i konzerviranja biljnog materijala pred životinjskim u moralnom, socijalnom i zakonskom pogledu. Stoga bi valjalo razvijati mogućnosti i iskoristiti prednosti konzerviranja gen-fonda na niskim temperaturama, a to su:

- krioprevencija omogućuje dugoročno čuvanje biljnog materijala, što je sigurno najveća prednost pred klasičnim čuvanjem nasljedne plazme;

- dugoročno čuvanje na niskim temperaturama (-196°C) usporava ili zaustavlja metabolizam u stanicama, ali je još uvijek očuvan morfologenetski potencijal i totipotentnost biljne stanice;

- moguće je dugoročno konzerviranje vegetativno-propagirajućih kultura, što je klasičnim postupcima čuvanja gotovo nemoguće postići;

- moguće je dugoročno čuvati ili u zamrznutom obliku razmjenjivati u prirodi nezaražen ili kultiviranjem in vitro uzgojen zdrav sadni materijal;

- duboko zamrzavanje je i test na hladnoću već postojećih genotipova.

- štedi se ljudski rad koji bi bio uložen pri klasičnoj obnovi sjemena u sjemenskim zbirnama;

- štedi se prostor: vanjski uzgojni prostor (nužan za sjetvu poradi sjemena) i unmutarnji (laboratorijski i uzgojni) u odnosu na isključivo in vitro održavanje banke biljnih gena.

- štedi se na troškovima održavanja; čak kada se ide na in vitro održavanje, koje ima svoje prednosti pred klasičnim poljskim, nužno je barem povremeno rekultiviranje, i time trošak, što bi se krioprezervacijom svelo na dugoročno spremanje nasljedne plazme i otklonila potreba povremene obnove.

- krioprezervacijom bi se mogla održavati genetska stabilnost konzerviranog materijala

- moguće je dugoročno pohranjivanje peluda ili peludnih embrija bez gubitka njihove vijabilnosti (Roberts, 1975; prema Bajaj, 1979).

Višestruka je korist od krioprevencije peluda:

a) u svrhu dugoročnog konzerviranja nasljedne plazme,

b) za ostvarenje udaljenih križanja kada su križane biljke prostorno udaljene i/ili se vremenski ne poklapaju njihove fenofaze cvatnje.

c) često je pelud oslobođen nekih patogena, pa se njegovim čuvanjem ujedno čuva i zdrav biljni materijal.

d) to je potencijalno uvijek pristupačan izvor oprašivača korištenih u klasičnim oplemenjivačkim programima.

Nabrojene su samo neke moguće prednosti i mogućnosti primjene metode dugoročnog čuvanja biljnih materijala na vrlo niskim temperaturama, u odnosu na klasične postupke konzerviranja nasljedne plazme. Dobri rezultati postignuti su u čuvanju slabije organiziranih biljnih struktura, iz kojih slijede postupci regeneracije i in vitro manipulacije.

Stoga će sve to potencijalne mogućnosti, koje pruža krioprezervacija postati realnost u široj primjeni tek kada će se razviti uspješnije tehnike in vitro biljne regeneracije i propagacije za većinu poljoprivrednih kultura, a posebice vegetativno propagirajućih kulturnih vrsta.

## LITERATURA - REFERENCES

1. Assy - Bah, B.F. Engelman (1992): Cryopreservation of mature embryos for the long - term conservation of coconut (*Cocos nicifera* L.) III th Eucarpisa Congres, July 6 - 11 th 1992, Angers - France, 407 - 408.

2. Bajaj, Y.P.S. (1976): Gene preservation through freeze - storage of plant cell, tissue and organ culture. *Acta Horticulturae* 63, 75 - 84.
3. Bajaj, Y.P.S. (1977a): Initiation of shoots and callus from potato - tuber sprouts and axillary buds frozen at - 196 C. *Crop Improv.* 4, 48 - 53.
4. Bajaj, Y.P.S. (1977b): Clonal multiplication and cryopreservation of cassava through tissue culture. *Crop Improv.* 4, 198 - 204.
5. Bajaj, Y.P.S. (1979): Tehnology and prospects of Cryopreservation of Germplasms. *Euphytica* 28, 267 - 285.
6. Bajaj, Y.P.S. (1983): Cryopreservation of germplasm of cereals - Progres and prospects. *Proc 6 th Inti Wheat Genet. Symp., Kyoto, Japan*, 565 - 574.
7. Beata Barnabas, M. Kovacs, G. Kovacs (1992): Long term cryopreservation of graminaceous pollen. *III th Eucarpia Congress, July 6 - 11 th 1992, Angers - France*, 409 - 410.
8. de Boucaud, M. T., Brison (1991): Cryopreservation of embryonic axes of *Prunus persica* L. *Batsch Proc. Cryo.* 91, KU Leuven, 7 - 12 July 1991, 102.
9. Chin, H.F., B. Krishnapillay, Y. L. Hor (1989): A note on the cryopreservation of embryos from young coconuts (*Cocos nicifera* var Mawa). *Pertanika* 12, 183 - 186.
10. Contreras, J. S., A. Abdelnour Esquivel, M. Dufour (1992): Cryopreservation of zygotic and somatic Embryos of cacao (*Theobroma cacao* L.) *XIIIth Eucarpia Congress, July 6 - 11 th 1992, Angers - France*, 411 - 412.
11. Delvallee I, J. Guillaud, M. Beckert, C. Dumas (1989): Cryopreservation of immature maize embryos after freeze - hardening in the air and in vitro. *Plant Sci.* 60, 129 - 136.
12. Dereuddre J., F. Engelmann (1987): The use of cryopreservation for selting up banks of plant germplasm. *Proc. Coll Franco - Britannique IAPTC Avers 8 - 9 oct. 1987*, 48 - 78.
13. Dereuddre J., C. Scottez Y. Arnaud, M. Duron (1990): Effets d' un durcissement au froid des vitroplants de Poivier (*Pyrus communis* L. cv. Beurre Hardy) sur la resistance des apex axillaires a une congelation dans l' azote liquide. *CR Acad. Sci., Ser III* 310, 265 - 272.
14. Dereuddre, J. (1992): Cryopreservation of In Vitro Cultures of Plant Cells and Organs by Vitrification and Dehidration. In: Y. Dattee, C. Dumas and A. Gallais (Eds): *Reproductive Biology and Plant Breeding*, pp 291 - 300 Springer - Verlag, Berlin, N. York, Budapest.
15. Dougal, D. K., D. F. Wetherell (1974): Storage of wild carrot cultures in the frozen state. *Cryobiology* 11, 410-415.
16. Engelmann, F. (1992): Cryopreservation of Embryos. In: Y. Datte, C. Dumas and A. Gallais (Eds.): *Reproductive Biology and Plant Breeding*, pp 281-290 Springer - Verlag, Berlin, N. York, Budapest.
17. Engelmann, F., Y. Duval, J. Dereuddre (1985): Survie et proliferation d'embryons somatiques de Palmier a huile (*Elaeis guinensis* Jacq) apres congelation dans l'azote liquide. *C. R. Acad. Sci. Paris* 301 Ser III, 111-116.

18. FAO (1980): Production yearbook, FAO Rome.
19. Finkle, B. J., Y. Sugawara, A. Sakai (1975): Freezing of carrot and tobacco suspension cultures. *Plant Physiol* 56 (Suppl.), 80.
20. Fukai, S., M. Goi, M. Tanaka (1991 a): Cryopreservation of shoot tips of Caryophyllaceae ornamentals. *Euphytica* 56, 149-153.
21. Fukai, S., M. Goi, M. Tanaka (1991 b): Cryopreservation of shoot tips of *Chrysanthemum morifolium* and related species native in Japan *Euphytica* 54, 201-204.
22. Ganeshan, S., M. P. Alexander, P. E. Rayasekharan (1992 b): Long term cryogenic preservation of fruit pollen for haploid gene resources conservation. XIIIth Eucarpia Congress, July 6-11 th, Angers - France, pp 415-416.
23. Ganeshan, S., R. Dore Swamy, D. G. Krishnappa (1992 a): In vitro culture, storage and cryogenetic effects on grapevine shoot tips and auxiliary buds encapsulated in sodium alinate. XIIIth Eucarpis Congress, July 6-11 th 1992, Angers - France, pp 419-420.
24. Grout, B. W. W., K. Shelton, H. W. Pritchard (1983): Orthodox behaviour of oil palm seed and cryopreservation of the excised embryo for genetic conservation. *Ann - Bot.* 52, 381-384.
25. Gupta, N., P. S. Carlson (1972): Preferential growth of haploid plant cells in vitro. *Nature New Biol.* 239, 86.
26. Harry, I. S. i Thorpe T. A. (1991): Tissue cultures: in vitro biosphere reserves. *Nature and Resources (UNESCO)* 27 (3), 18-22.
27. Haskins, R. H. and K. K. Kartha (1980): Freeze - preservation of pea meristems: cell survival. *Can J. Bot* 58, 833-840.
28. Henslow, G. G. (1975): Technical aspects of tissue culture storage for genetic conservation. In. *Crop genetic resources for today and tomorrow. Intern. Biol. Programme*, pp 349-357. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
29. Jelaska, S. (1972): Embryoid formation by fragments of cotyledons and hypocotyls in *Cucurbita pepo*. *Planta.* 103, 278-280.
30. Jelaska, S. (1974): Embryogenesis and organogenesis in explants. *Physiol. Plant.* 31, 257-261.
31. Jelaska, S. i Šutina (Pavlina) R. (1977): Maintained culture of multiple plantlets from carnation shoot tips. *Acta Horticulturae* 78, 333-340.
32. Kartha, K. K. (ed.) (1985): *Cryopreservation of plant cells and organs.* SCR Press Inc. Boca Raton, Florida.
33. Kartha, K. K., L. C. Fowke, N. L. Leung, K. L. Caswell, I. Hakman (1988): Induction of somatic embryos and plantlets from cryopreserved cell cultures of white spruce (*Picea glauca*). *J. Plant Physiol.* 132, 529-539.
34. Kartha, K. K., R. N. Chibbar, F. Georges, N. Leung, K. Caswell, E. Kendall, J. Quershi (1989): Transient expression of chloramphenicol acetyl-transferase (CAT) gene in barley cell cultures and immature embryos through microprojectile bombardment. *PlantCell Repts.* 8, 429-432.
35. Kartha, K. K. (1992): Use of Cryopreservation in Breeding Programs. In: Y.

- Dattee, C. Dumas, A. Gallais (Eds.): Reproductive Biology and Plant Breeding, pp 301-310, Springer - Verlag, Berlin 9, 12, N. York, Budapest. pp 301-310.
36. Kendall, E. I., Kartha, K. K., Quereshi, J. A., Chermak, P., (1993): Cryopreservation of immature spring wheat zygotic embryos using an abscisic acid pretreatment. *Plant Cell Reports* 12, (2), 89-94.
  37. Kohmura, H., A. Sakai, S. Chokyu, T. Yakuwa (1992): Cryopreservation of in vitro cultured multiple bud clusters asparagus (*Asparagus officinalis* L.) cv. Hiroshimagreen ( $2n=30$ ) by the techniques of vitrification. *Plant Cell Reports* 11, 433- 437.
  38. Langis, R., B. Schnabel, E. D. Earle, P. L. Steponkus (1989): Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification. *Cryo - Letters* 10, 421-428.
  39. Latta, R. (1971): Preservation of suspension cultures of plant cells by freezing. *Can. J. Bot.* 49, 1253-1254.
  40. Lovelock, J. E. i M. W. H. Bishop (1959): Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide. *Nature* 183, 1394-1395.
  41. Marin, M. L. i N. Duran - Vila (1988): Survival of somatic embryos and recovery of plants of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb) after immersion in liquid nitrogen. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 14, 51-57.
  42. Mazur, R. A. i J. X. Hatmann (1978): Freezing of plant cells and protoplasts. In: W. R. Sharp i sur. (Eds.): *Plant cell and tissue culture principles and applications*. Ohio State Univ. Press, Columbus.
  43. McAdams, S., D. Ratnasabapathi, R. A. Smith (1991): Influence of days of culture on cryoprotectant - supplemented medium and of terminal freezing temperature on the survival of cryopreserved pea shoot tips. *Cryobiology* 28, 288-293.
  44. Monnier, M. i C. Leddet (1980): Action du saccharose sur la resistance au gel des embryons immatures de capselle. *Bull Soc. Bot. Fr.* 127, 71-77.
  45. More A., A. Abdelnour, V. Villalobos (1991): Cryopreservation of *Musa* zygotic embryos. Proc. 4-th IBPNet Conf. *Biotechnology for Tropical Crop Improvement in Latin America*, San Jose, Costa Rica 14-18 january 1991, pp 81.
  46. Morel, G., C. Martin (1952): Guerison de dahlias atteints d'une maladie a virus. *CR Acad Agric. Fr.* 41, 471-474.
  47. Mycock, D. J., P. Berjak, F. C. Blakeway, P. Watt (1989): Development of model system for cryostorage: applicatibility to recalcitrant material. Proc. Intl. Conf. *The Impact of Biotechnology in Agriculture* Amiens France 10 - 12 july 1989, CP1.
  48. Nino, T., A. Sakai (1992): Cryopreservation of alginate coated in vitro - grown shoot tips of apple, pear and mulberry. *Plant Science (Limenck)* 87, 199-206.
  49. Normah, M. N., M. Vengadasalam (1992): Effects on moisture content on cryopreservation of *Coffea* and *Vigna* seeds and embryos. *Cryo - letters* 13,

- 199-208.
50. Paulus, V., M. Brison, M. Th. De Boucard, F. Dosba (1992): Preliminary results of Cryopreservation of peach meristems, XIIIth Eucarpia Congress, July 6-11th 1992, Angers - France pp 425-426.
  51. Pavlina, R. (1991): Heterotic effects of somatic embryogenesis and callogenesis in some hybrids of maize (*Zea mays* L) in vitro. *Acta Horticulturae* 289, 255-256.
  52. Pavlina, R. (1992): Induction and Heritability of Somatic Embryogenesis in Embryo Culture of Maize (*Zea mays* L.). Book of Abstracts XIIIth EUCARPIA Congress, 6-11 July 1992, Angers- France, pp 375-376.
  53. Pavlina R., Jelaska, S. (1990): Heritability of callus growth in maize (*Zea mays* L.) embryo culture. Abstracts VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Amsterdam, June 24-29, 1990, pp 240.
  54. Pence, V. C., B. L. Dresser (1988): Embryo cryostorage as a technique for germplasm preservation of several large-seeded tree species. *Abst. Beltsville Symp in Agr. Res XIII Biotic Diversity and Germplasm Preservation-Global Imperatives*, 9-11 May 1988, 24.
  55. Plessis, P., C. Scottez, C. Laddet, J. Dereuddre (1992): Cryopreservation by encapsulated-dehydration of two woody plants (*Vitis vinifera* L. and *Pyrus communis* L) XIIIth Eucarpia Congress July 6-11th 1992, Angers-France, pp 427-428.
  56. Quatrano, R. S. (1968): Freeze-preservation of cultured flax cells utilizing dimethyl sulfoxide. *Plant Physiol.* 43, 2057-2061.
  57. Sacristan, M. D. (1971): Karyotypic changes in callus cultures from haploid plants of *Crepis capillaris* (L.) Wallr. *Chromosoma* 33, 273-283.
  58. Seibert, M. (1976): Shoot initiation from carnation Shoot apices frozen to -196°C. *Science* 191, 1178-1179.
  59. Sudarmonowati, E. i G. G. Henshaw (1990): Cryopreservation of Cassava somatic embryos, and embryogenic tissue *Abstr. VIIth Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*, June 24-29, Amsterdam, pp 378.
  60. Sugawara, Y., A. Sakai (1974): Survival of suspension- cultured Sycamore cells cooled to the temperature of liquid nitrogen. *Plant Physiol* 54, 722-724.
  61. Šutina (Pavlina), R. i S. Jelaska (1978): Meriklonalno razmnožavanje karanfila. *Hortikultura* 45, 41-45.
  62. Tamoury M., J. Ralambosoa, J. Dereuddre (1992): Cryopreservation of Ca-alginate encapsulated shoot-tips of carnation by vitrification and dehydration. XIIIth Eucarpia Congress, July 6-11th 1992, Angers-France, pp 431-432.
  63. Towill, L. E. (1990): Cryopreservation of isolated mint shoot tips by vitrification. *Plant Cell Reports* 9, 178-181.
  64. Tyler N. J., C. Stushnoff (1988): Dehydration of dormant apple buds at different stages of cold acclimation induce cryopreservability in different cultivars. *Can. J. Plant. Sci* 68, 1169-1176.
  65. Uragami A, Sakai, i M. Nagai (1990): Cryopreservation of dried axillary buds

- from plantlets of *Asparagus officinalis* L. Grown in vitro. *Plant Cell Reports* 9, 328-331.
66. Withers, L. A. (1979): Freeze preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Daucus Carvota*). *Plant Physiol* 63, 460-467.
67. Withers, L. A. (1982): The development of cryopreservation techniques for plant cell, Tissue and organ culture. *Proc. 5th Intl. Congr. Plant Tissue Culture*, Fujiwara A Ed Tokyo, 793-794.
68. Zavala, M. E., I. M. Sussex (1986): Survival of developing wheat embryos and bean axes following cryoprotection and freezing in liquid nitrogen. *J. Plant. Physiol.* 122, 193-197.