

ZABEZPIECZANIE ZASOBÓW GENOWYCH CZOSNKU POSPOLITEGO (*ALLIUM SATIVUM* L.) W KRIOBANKU GENÓW

PRESERVATION OF GARLIC (*ALLIUM SATIVUM* L.) GENETIC RESOURCES IN CRYOBANK

Marta Olas-Sochacka

Instytut Ogrodnictwa
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice
marta.olas@inhort.pl

Abstract

As a part of the multiannual programme on preservation of gene bank resources, financed by the Polish Ministry of Agriculture and Rural Development, works related with garlic (*Allium sativum* L.) cryopreservation are carried out. Every year, new garlic accessions are deposited in liquid nitrogen. Currently 168 garlic accessions are maintained in cryobank: 82 accessions from Polish collection, 51 from Czech collection and 34 from German collection. In 2016, 10 garlic accessions (7 bolting and 3 non-bolting) were cryopreserved using vitrification method. Shoot tips (1.5 mm) were isolated from garlic bulbils (bolting accessions) and cloves (non-bolting accessions). Explants were treated in loading solution (2 M glycerol; 0.4 M sucrose) for 20 minutes and PVS3 solution (50% glycerol w/v; 50% sucrose w/v) for 120 minutes. After this time shoot tips were immersed in liquid nitrogen. The survival rate was determined two weeks after rewarming and regeneration rate six weeks after rewarming. Average survival rate of non-bolting accessions was 95.6%, regeneration rate was 80%. In case of bolting accessions average survival rate was 82% and regeneration rate 70%.

Key words: cryopreservation, vitrification, *Allium sativum*, garlic, Tripartite Cryopreservation Genebank

WSTĘP

Na mocy porozumienia podpisanego 28 marca 2011 roku przez trzech partnerów (Czechy, Niemcy, Polska) w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach został powołany Trójstronny Kriobank Genów. W kriobanku są gromadzone obiekty czosnku pospolitego (*Allium sativum* L.) pochodzące z europejskich kolekcji polowych. Kolekcja polowa czosnku zgromadzona w Instytucie Ogrodnictwa obejmuje 570 obiektów i stanowi olbrzymie źródło cech morfologicznych i użytkowych. Czosnek pospolity jest rośliną jednoroczną, rozmnażaną wegetatywnie. Dlatego istnieje niebezpieczeństwo utraty niektórych genotypów na skutek działania czynników biotycznych i abiotycznych. Krioprezerwacja okazała się podstawowym i niezbędnym narzędziem

do zabezpieczenia tak cennej różnorodności biologicznej. To bezpieczna i opłacalna metoda długoterminowego zabezpieczania materiału roślinnego w temperaturze ciekłego azotu ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), w której wszelkie podziały komórkowe i procesy metaboliczne ulegają drastycznemu spowolnieniu. Ciekły azot, wbrew powszechnemu przekonaniu, nie powoduje jednak całkowitego zatrzymania wszystkich podziałów komórkowych, reakcji fizycznych i chemicznych w komórce (Engelmann 2011; Mikuła i in. 2013). Procedury krioprezerwacji zostały opracowane dla bardzo różnorodnego materiału roślinnego, począwszy od nasion, pąków spoczynkowych, zawieszin komórkowych, kalusa, stożków wzrostu po zarodki zygocytyczne i somatyczne wielu gatunków roślin. Różnorodne techniki krioprezerwacji sprawdzają się dla około 100 gatunków roślin (Harding 2004). Dotychczas poddano krioprezerwacji zarodki zygocytyczne i osie zarodkowe 100 różnych gatunków roślin, zarodki somatyczne około 40 gatunków klimatu tropikalnego i umiarkowanego (Engelmann 2011). Dzięki rozwojowi różnorodnych technik krioprezerwacja stała się jedyną możliwą metodą długoterminowego zabezpieczania zasobów genowych dla „problematicznych” grup roślin: niewytwarzających nasion – banan, czosnek, wytwarzających nasiona typu recalcitrant – bardzo wrażliwe na odwodnienie, np. dąb szypułkowy, dąb bezszypułkowy, jawor, klon, genotypów roślin tropikalnych i wodnych – kawa, kakaowiec, kauczukowiec (Halmagyi i in. 2004; Kaczmarczyk i in. 2011; Panis i in. 2005; Mikuła i in. 2013). Innym ważnym powodem wykorzystania kriokonserwacji jest ochrona gatunków roślin zagrożonych wyginięciem, zwłaszcza gdy nasiona występują rzadko lub są wątpliwej jakości (Decruse i in. 1999; Touchell i in. 2002; Mandal i Dixit-Sharma 2007; Mallon i in. 2008; Paunescu 2009; Sen-Rong i Ming-Hua 2009).

Dotychczas wykorzystano metodę krioprezerwacji do zabezpieczenia 82 obiektów czosnku pospolitego pochodzącego z kolekcji Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach. W ramach Programu Wieloletniego na lata 2015–2020, koordynowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, zaplanowano zabezpieczanie kolejnych obiektów czosnku pospolitego w ciekłym azocie. W niniejszej pracy zaprezentowano wyniki przeżywalności i regeneracji 10 obiektów czosnku poddanych krioprezerwacji w 2016 roku, które zostały wytypowane do długoterminowego przechowywania.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań było 10 odmian miejscowych czosnku pospolitego (*Allium sativum* L.): 7 obiektów tworzących pędy kwiatostanowe (424K, 485K, 491K, 492K, 644K, 645K, 657K) i 3 obiekty nietworzące pędów kwiatostanowych (812S, 828S, 105K). Materiał do badań został zebrany w sezonie wegetacyjnym 2015/2016. W 2015 roku zebrano główki czosnku nietwo-

rzącego pędów kwiatostanowych, natomiast w 2016 roku zebrano cebulki powietrzne. Oba rodzaje materiału roślinnego poddano krioprezerwacji w 2016 roku. W tabeli 1 zamieszczono wykaz i pochodzenie obiektów poddanych kriokonserwacji, które zostały pozyskane podczas ekspedycji organizowanych przez Instytut Ogrodnictwa.

Materiał roślinny stanowiły cebulki powietrzne (obiekty tworzące pędy kwiatostanowe) i ząbki czosnku (obiekty nietworzące pędów kwiatostanowych). Pozbawiony łuski materiał roślinny płukano pod bieżącą wodą, następnie traktowano 70% etanolem przez 30 sekund, 3% roztworem podchlorynu sodu z kilkoma kroplami Tween20[®] przez 20 minut, po czym materiał roślinny przepłukiwano 3–4 razy wodą destylowaną.

Stożki wzrostu wielkości 1,5 mm izolowano pod mikroskopem stereoskopowym. Z każdego obiektu izolowano 150 eksplantatów. Eksplantaty układano na plastikowe płytki Petriego wypełnione pożywką MS (Murashige i Skoog 1962) zestaloną 1% agarą, wzbogaconą o 0,1 mg·dm⁻³ NAA (kwas α -naftylooctowy), 0,5 mg·dm⁻³ 2iP (N6-izopentenylo-adenina) oraz 10% sacharozę. Odczyn pożywki ustalano na poziomie pH 5,8. Na każdej płytce umieszczano po 50 eksplantatów i do następnego dnia zostawiano je w komorze fitotronowej, w ciemności, w temperaturze 20 °C.

Tabela 1. Wykaz i pochodzenie obiektów czosnku pospolitego poddanego krioprezerwacji w 2016 roku umieszczonych w Międzynarodowym Kriobanku Genów
Table 1. List and origin of garlic accessions cryopreserved in 2016 maintained in the International Cryobank

Numer obiektu Accession number	Nr kolekcyjny Collection number	Rok włączenia do kolekcji Acquisition year	Miejsce zebrania Collection site	Kraj pochodzenia Origin country
105K	54/80	1980	Tarnopol	Ukraina
424K	UKRZAK99-116	1999	Bronka	Ukraina
485K	WUKR06-0303	2006	Braga	Ukraina
491K	WUKR06-0423	2006	Kolomyia	Ukraina
492K	WUKR06-0424	2006	Kolomyia	Ukraina
644S	LITZAP12-097	2012	Rēžiūkai	Litwa
645S	LITZAP12-098	2012	Bitėnai	Litwa
657S	POLUNE13-08	2013	Ocice	Polska
812S	POLBIL10-47	2010	Woroniec	Polska
828S	LITLIT11-268	2011	Bajorai	Litwa

Krioprezerwacja – metoda witrifikacji

Wyzolowane dzień wcześniej eksplantaty umieszczono w kriofiolkach o pojemności 2 ml, po dziesięć eksplantatów w każdej. Eksplantaty traktowano roztworem wstępnym (2M glicerol i 0,4 M sacharoza) przez 20 minut. Następnie stożki wzrostu traktowano roztworem witrifikacyjnym PVS3 (50% glicerol w/v, 50% sacharoza w/v) przez 120 minut. Po tym czasie roztwór PVS3 usuwano, a eksplantaty zalewano 0,5 ml świeżego roztworu i bezpośrednio zanurzano w ciekłym azocie. Dziesięć kriofiolek umieszczano w dewarze do długoterminowego przechowywania. Pięć kriofiolek stanowiło kontrolę (50 eksplantatów). Na podstawie tych eksplantatów oceniano przeżywalność i regenerację obiektu. Kontrolne kriofiolki pozostawały w ciekłym azocie przynajmniej przez godzinę. Tkankę roślinną rozmrażano w łaźni wodnej w temperaturze 40 °C przez 2–3 minuty, usuwano roztwór PVS3 i przepłukiwano roztworem 1,2 M sacharozy przez 10 minut. Eksplantaty osuszano na sterylnych krążkach bibuły, przenoszono na płytki Petriego wypełnione pożywką MS zestaloną 1% agarem, wzbogaconą o 0,1 mg·dm⁻³ NAA, 0,5 mg·dm⁻³ 2iP oraz 3% sacharozę. Na każdej płytce umieszczano po 50 eksplantatów i pozostawiano w komorze fitotronowej do regeneracji przez 7 dni w ciemności, następnie płytki wykładano na półki w komorze fitotronowej z temperaturą 25/20 °C (dzień/noc) i 16-godzinnym fotoperiodem (intensywność oświetlenia 60 μmol·s⁻¹·m⁻²).

Ocena przeżywalności i regeneracji eksplantatów po mrożeniu

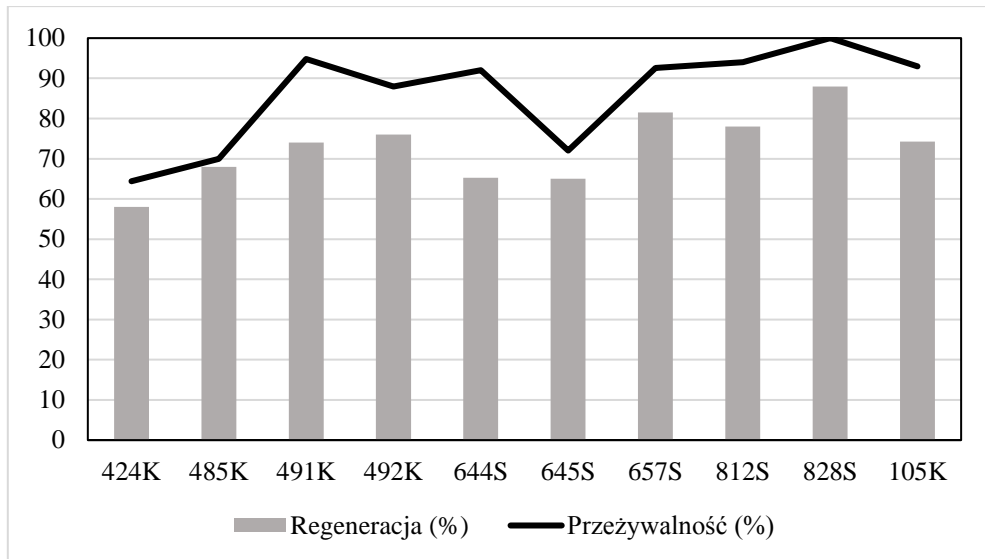
Po dwóch tygodniach od rozmrożenia oceniano przeżywalność przez określenie wartości procentowej przez stosunek liczby eksplantatów zielonych, wykazujących cechy żywotności do 50 eksplantatów kontrolnych. Natomiast regeneracja oceniana była po sześciu tygodniach od rozmrożenia przez określenie wartości procentowej przez stosunek liczby roślin prawidłowo uformowanych (niewykazujących cech uwodnienia, w których wyraźnie można wydzielić korzeń, pęd i liście) do 50 eksplantatów wyjściowych (kontrolnych).

WYNIKI

Na wykresie 1 zaprezentowano wyniki przeżywalności i regeneracji stożków wzrostu siedmiu obiektów tworzących pędy kwiatostanowe (424K, 485K, 491K, 492K, 644S, 645S, 657S) oraz trzech obiektów nietworzących pędów kwiatostanowych (812S, 828S, 105K).

Spośród obiektów tworzących pędy kwiatostanowe najwyższą przeżywalność i regenerację uzyskał obiekt 675S, wynosiła ona odpowiednio 92,6 i 81,5%. Najśłabsze wyniki osiągnął obiekt 424K – przeżywalność wynosiła 64,4%, a regeneracja 58%. W przypadku obiektów nietworzących pędów kwiatostanowych najwyższe wyniki uzyskał obiekt 828S – przeżywalność wynosiła 100%, a regeneracja 88%. Obiekty 812S i 105K również osiągnęły

bardzo wysokie wartości przeżywalności i regeneracji, dla obiektu 812S było to odpowiednio 94 i 78%, a dla 105K – 93 i 74,3%. Średnie wartości przeżywalności i regeneracji dla obiektów tworzących pędy kwiatostanowe to odpowiednio 82 i 70%, a dla obiektów nietworzących pędów kwiatostanowych – 95,6 i 80%.



Rys. 1. Wyniki przeżywalności i regeneracji eksplantatów czosnku pospolitego (*Allium sativum* L.) pochodzących z form tworzących pędy kwiatostanowe oraz form nietworzących pędów kwiatostanowych, poddanych krioprezewacji w 2016 roku

Fig. 1. Survival and regeneration rate of bolting and non-bolting garlic (*Allium sativum* L.) accessions cryopreserved in 2016

DYSKUSJA

W literaturze dotyczącej krioprezewacji stożków czosnku metodą wiotryfikacji z zastosowaniem roztworu PVS3 można znaleźć informacje, że regeneracja jednego genotypu pochodzącego z Korei wynosiła 90,7% po traktowaniu roztworem PVS3 przez 150 minut (Baeck i in. 2003), podczas gdy Kim (2005) dla tego samego genotypu osiągnął wynik regeneracji 80,4% po 120 minutach w roztworze PVS3. Keller (2005) testował sześć genotypów pochodzących z niemieckiej kolekcji polowej i skupił się na ocenie regeneracji stożków wzrostu pochodzących z kultur *in vitro* (3,5-letniej i 10-miesięcznej) poddanych różnym warunkom prekultury (2 miesiące prekultury w temperaturze: 25 °C, 2 °C, 25 °C w dzień i –1 °C w nocy, przy fotoperiodzie 16 h światło/8 h noc). Najlepsze efekty, 70% regeneracji, osiągnął dla stożków wzrostu pochodzących z dziesięciomiesięcznej kultury po uprzedniej prekultury w temperaturze +2 °C oraz 25 °C w dzień i –1 °C w nocy. Baeck i in.

(2003) testował również wpływ wielkości eksplantatów na regenerację. Spośród eksplantatów o trzech różnych średnicach: 1,5 mm, 3 mm i 4,5 mm, najlepsze rezultaty osiągnął dla eksplantatów o średnicy: 1,5 mm i 3 mm (regeneracja na poziomie 73,9% i 90,7%). Dla eksplantatów o wielkości 4,5 mm regeneracja wynosiła zaledwie 19,6%. W prezentowanych wynikach własnych regeneracja wyniosła 70% dla obiektów tworzących pędy kwiatostanowe i 80% dla obiektów nietworzących pędów kwiatostanowych. Wyniki te korespondują z wynikami uzyskanymi przez Olas-Sochacką i Kotlińską (2010) dla obiektów tworzących pędy kwiatostanowe, wówczas regeneracja dziesięciu obiektów po krioprezerwacji wynosiła 62,8%. Natomiast w przypadku obiektów nietworzących pędów kwiatostanowych średnia regeneracja wynosiła 23,6% (Olas-Sochacka, Kotlińska 2012), co stanowi znaczną różnicę w odniesieniu do aktualnie prezentowanych wyników (80%). Faktem jest, że w prezentowanej pracy poddano krioprezerwacji zaledwie trzy obiekty nietworzące pędów kwiatostanowych, w pracy z 2012 roku takich obiektów było dziesięć, mimo to regeneracja sięgała wówczas 40%.

W literaturze nie ma dostępnych prac porównujących efekty krioprezerwacji dla dwóch rodzajów materiału – cebulek powietrznych i ząbków czosnku, są natomiast prace nad krioprezerwacją stożków wzrostu pochodzących z ząbków czosnku lub z kultur *in vitro*. Baeck i in. (2003) testowali jeden genotyp metodą witrifikacji (roztwór PVS3) izolując eksplantaty z ząbków czosnku i otrzymali regenerację na poziomie 82%, natomiast Volk i in. (2006) stosując roztwór PVS2 osiągnęli 35% regenerację. W przypadku eksplantatów pochodzących z kultur *in vitro* Keller (2005) otrzymał najwyższą wartość regeneracji 70% (metoda witrifikacji, roztwór PVS3), natomiast Kim i in. (2004) – 57% (metoda witrifikacji, roztwór PVS2).

Metoda witrifikacji jest bardzo dobrze poznana i powszechnie stosowaną techniką krioprezerwacji. W opracowaniu pod redakcją Reed (2008) można znaleźć publikacje dotyczące witrifikacji 75 gatunków roślin, których regeneracja wynosi od 0 do 100%, np. *Allium sativum* L. – regeneracja 0–100% (Makowska i in. 1999), *Beta vulgaris* – regeneracja 60–100% (Vandenbussche i in. 2000), *Dianthus caryophyllus* – regeneracja 100% (Langis i in. 1990), a w przypadku *Oryza sativa* – regeneracja zaledwie 1% (Watanabe, Steponkus 1995).

Zastosowany w badaniach protokół witrifikacji został opracowany w oparciu o obszerną monografię pod redakcją Barbary Reed (2008) oraz o doświadczenie realizatorów projektu EURALLIVEG finansowanego z funduszy Unii Europejskiej (lata realizacji 2017–2011), którego wymiernym rezultatem było m.in. powołanie w 2011 roku Międzynarodowego Kriobanku Genów. Działania podjęte w ramach projektu są kontynuowane w Programie Wieloletnim, zadanie 1.3, nadzorowanym przez Ministerstwo Rolnictwa

i Rozwoju Wsi pt. Gromadzenie, zachowanie w kolekcjach *ex situ*, kriokonserwacja oraz charakterystyka, ocena, dokumentacja i udostępnianie zasobów genowych i informacji w zakresie roślin warzywnych, sadowniczych, ozdobnych i miododajnych oraz spokrewnionych dzikich gatunków. Dotychczas zgromadzono w ciekłym azocie 168 obiektów czosnku, z czego 82 obiekty pochodzą z kolekcji polskiej, 51 – z czeskiej i 34 obiekty z kolekcji niemieckiej. Zastosowana technika krioprezerwacji umożliwia sukcesywne powiększanie zdeponowanej w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach kriokolekcji czosnku pospolitego oraz pozwala na szybkie odtworzenie kolekcji polowej, jeśli zajdzie taka potrzeba. Należy również zwrócić uwagę na fakt, że wszystkie obiekty czosnku poddane kriokonserwacji spełniały standardy ustalone dla pierwszego w Europie Międzynarodowego Kriobanku Genów rodzaju *Allium*. Standardy te dotyczą liczby i sposobu przechowywania stożków wzrostu czosnku pospolitego w ciekłym azocie. Każdy z obiektów z kolekcji banku genów wykazał regenerację powyżej 30%, co oznacza, że 100 eksplantatów czosnku powinno być przechowywanych w ciekłym azocie. W sytuacji, gdy regeneracja eksplantatów wynosi 10–30%, należy umieścić w ciekłym azocie 200 eksplantatów, natomiast gdy regeneracja jest niższa od 10%, wówczas taki obiekt nie może być długoterminowo przechowywany.

WNIOSKI

1. Zdolność przetrwania stresu ultraniskiej temperatury i regeneracja eksplantatów czosnku zależy od genotypu.
2. Regeneracja wszystkich prezentowanych w pracy obiektów poddanych procedurze krioprezerwacji wynosiła powyżej 30%. Każdy obiekt spełnia standardy opracowane dla kriobanku genów.
3. Do długoterminowego zabezpieczenia wyżej wymienionych obiektów w ciekłym azocie wystarczy sto eksplantatów czosnku.

Literatura

- Baek H.J., Kim H.H., Cho E.G., Chae Y.A., Engelmann F. 2003. Importance of explant size and origin and of preconditioning treatments for cryopreservation of garlic shoot apices by vitrification. *CryoLetters* 24: 381–388.
- Decruse S.W., Seeni S., Pushpangadan P. 1999. Cryopreservation of alginate coated shoot tips of *in vitro* grown *Holostemma annulare* (Roxb.) K. Schum, an endangered medicinal plant: Influence of preculture and DMSO treatment on survival and regeneration. *Cryo-Letters* 20: 243–250.
- Engelmann F. 2011. Cryopreservation of embryos: an overview. W: Thorpe T., Yeung E. (red.), *Plant Embryo Culture. Methods in Molecular Biology* 710: 155–184. DOI: 10.1007/978-1-61737-988-8_13.
- Halmagyi A., Fischer-Klüver G., Mix-Wagner G., Schumacher H.M. 2004. Cryopreservation of *Chrysanthemum morifolium* (*Dendranthema grandiflora*

- Ramat.) using different approaches. *Plant Cell Reports* 22(6): 371–375. DOI: 10.1007/s00299-003-0703-9.
- Harding K. 2004. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. *Cryo-Letters* 25: 3–22.
- Kaczmarczyk A., Rokka, V.-M., Keller E.R.J. 2011. Potato shoot tip cryopreservation. A review. *Potato Research* 54: 45–79. DOI: 10.1007/s11540-010-9169-7.
- Keller E.R.J. 2005. Improvement of cryopreservation results in garlic using low temperature preculture and high-quality *in vitro* plantlets. *CryoLetters* 26(6): 357–366.
- Kim H.H., Kim J.B., Baek H.J., Cho E.G., Chae Y.A., Engelmann F. 2004. Evolution of DMSO concentration in garlic shoot tips during a vitrification procedure. *CryoLetters* 25: 91–100.
- Kim H.H., Yoon J.W., Kim J.B., Engelmann F., Cho E.G. 2005. Thermal analysis of garlic shoot tips during a vitrification procedure. *CryoLetters* 26: 33–44.
- Langis R., Schabel-Preikstas B.J., Earle E.D., Steponkus P.L. 1990. Cryopreservation of carnation shoot tips by vitrification. *Cryobiology* 27(6): 657–658.
- Makowska Z., Keller J., Engelmann F. 1999. Cryopreservation of apices isolated from garlic (*Allium sativum* L.) bulbils and cloves. *Cryo-Letters* 20(3): 175–182.
- Mallón R., Bunn E., Turner S.R., González M.L. 2008. Cryopreservation of *Centaurea ulreia* (Compositae) a critically endangered species from Galicia (Spain). *CryoLetters* 29: 363–370.
- Mandal B.B., Dixit-Sharma S. 2007. Cryopreservation of *in vitro* shoot tips of *Dioscorea deltoidea* Wall., an endangered medicinal plant: effect of cryogenic procedure and storage duration. *CryoLetters* 28: 461–470.
- Mikuła A., Makowski D., Tomiczak K., Rybczyński J.J. 2013. Kultury *in vitro* i krioprezewacja w zachowaniu różnorodności roślin – standardy dla banku genów. *Polish Journal of Agronomy* 14: 3–17.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Panis B., Piette B., Swennen R. 2005. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. *Plant Science* 168: 45–55. DOI: 10.1016/j.plantsci.2004.07.022.
- Olas-Sochacka M., Kotlińska T. 2010. Krioprezewacja zasobów genetycznych czosnku pospolitego (*Allium sativum* L.) tworzącego pędy kwiatostanowe. *Nowości Warzywnicze* 50: 69–74.
- Olas-Sochacka M., Kotlińska T. 2012. Krioprezewacja zasobów genowych czosnku pospolitego (*Allium sativum* L.) nie tworzącego pędów kwiatostanowych. *Nowości Warzywnicze* 54–55: 113–120.
- Paunescu A. 2009. Biotechnology for endangered plant conservation: a critical overview. *Romanian Biotechnological Letters* 14: 4095–4103.
- Reed B.M., Schumacher L., Dumet D., Benson E.E. 2005. Evaluation of a modified encapsulation–dehydration procedure incorporating sucrose pretreatments for the cryopreservation of *Ribes* germplasm. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 41: 431–436. DOI: 10.1079/ivp2005664.

- Sen-Rong H., Ming-Hua Y. 2009. High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of in vitro grown shoot tips of rare and endangered plant *Emmenantherys henryi* Oliv. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 99: 217–226. DOI: 10.1007/s11240-009-9598-7.
- Touchell D.H., Turner S.R., Bunn E., Dixon K.W. 2002. Cryostorage of somatic tissues of endangered Australian species. W: Towill L.E., Bajaj Y.P.S. (red.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 50: 357–372. DOI: 10.1007/978-3-662-04674-6_25.
- Vandenbussche B., Weyens G., De Proft M. 2000. Cryopreservation of in vitro sugar beet (*Beta vulgaris* L.) shoot tips by a vitrification technique. *Plant Cell Reports* 19: 1064–1068. DOI: 10.1007/s002990000232.
- Volk G.M., Walters C. 2006. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. *Cryobiology* 52(1): 48–61. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2005.09.004.
- Watanabe K., Steponkus P.L. 1995. Vitrification of *Oryza sativa* L. cell suspensions. *Cryo-Letters* 16: 255–262.

Badania zostały wykonane w ramach programu wieloletniego, finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, zadanie 1.3 „Gromadzenie, zachowanie w kolekcjach *ex situ*, kriokonserwacja oraz charakterystyka, ocena, dokumentacja i udostępnianie zasobów genowych i informacji w zakresie roślin warzywnych, sadowniczych, ozdobnych i miododajnych oraz spokrewnionych dzikich gatunków”.