

Dugotrajno čuvanje germplazme voćaka primenom *in vitro* tehnika za krioprezervaciju vrhova izdanaka u Institutu za voćarstvo, Čačak

Tatjana Vujović*, Đurđina Ružić, Tatjana Anđelić, Darko Jevremović, Bojana Vasilijević

Institut za voćarstvo, Kralja Petra I br. 9, 32000 Čačak, Republika Srbija

*E-mail: tvujovic@institut-cacak.org

Primljeno: 31. oktobra 2022. godine; prihvaćeno: 03. novembra 2022. godine

Rezime. Krioprezervacija predstavlja savremenu metodu za dugotrajno čuvanje biljnog materijala na ultra niskim temperaturama (tečni azot, -196 °C). Ova metoda je komplementarna konvencionalnim metodama čuvanja jer značajno snižava troškove i rizike vezane za održavanje biljnih kolekcija u poljskim uslovima (*ex situ*). Program primene ove strategije za dugotrajno očuvanje biljnih genetičkih resursa iniciran je i u Institutu za voćarstvo, Čačak u okviru Odeljenja za fiziologiju voćaka pre više od jedne decenije. Istraživanja su fokusirana na optimizaciju protokola za različite *in vitro* tehnike krioprezervacije koje se baziraju na direktnom potapanju biljnog materijala u tečni azot i njihovu primenu u čuvanju genetičkih resursa kontinentalnih voćaka. Primjenjene tehnike podrazumavaju primenu hemijske (vitifikacija, „droplet“ vitifikacija, „V cryo-plate“) ili fizičke dehidracije (inkapsulacija-dehidracija, „D cryo-plate“) biljnog materijala pre potapanja u tečni azot. Tehnika inkapsulacije-dehidracije je uspešno primenjena u krioprezervaciji džanarike i sorte kupine Čačanska bestrna. Ispitivanje primene tehnike vitifikacija kod vrsta roda *Prunus* i *Malus* pokazalo je da se značajno povećanje kapaciteta regeneracije vrhova izdanaka podloge za trešnju Gisela 5 i sorte jabuke Gala Must posle otapanja iz tečnog azota može postići variranjem dužine dehidracije i/ili vrste korišćenih vitifikacionih rastvora. Optimizacija protokola za tehniku „droplet“ vitifikacije postignuta je ispitivanjem uticaja različitih vitifikacionih rastvora, dužine tretmana, temperature dehidracije i dužine osmotske rehidracije kod predstavnika rodova *Prunus* (autohtone sorte šljive Crvena Ranka, Sitnica i Požegača, džanarika, podloga za tešnju Gisela 5), *Malus* (jabuka Gala Must) i *Rubus* (kupina Čačanska bestrna). Poslednjih godina, inicirana su takođe i istraživanja primene novorazvijenih „V cryo-plate“ i „D cryo-plate“ tehnika krioprezervacije. Ove tehnike omogućavaju prevazilaženje izvesnih ograničenja vezanih za nedovoljnu dehidraciju biljnog tkiva, oštećenje i gubitak biljnog materijala tokom pripreme za krioprezervacione protokole, kao i manipulativnih problema u protokolima drugih tehnika vitifikacije. Korišćenjem navedenih tehnika uspešno su krioprezervirani vrhovi izdanaka različitih genotipova autohtonih šjiva (Crvena Ranka, Požegača, Sitnica, Moravka, Belošljiva), džanarike, podloge za trešnju Gisela 5, sorte jagode Clery, borovnice Toro i mongolske borovnice (*Amelanchier alnifolia*) koji su gajeni u uslovima kulture *in vitro*.

Dosadašnji rezultati postignuti u ovim istraživanjima predstavljaju značajan doprinos uspostavljanju optimizirane tehnologije dugotrajnog čuvanja biljnog materijala primenom različitih tehnika krioprezervacije. Ovaj pregled istraživanja daje dobru osnovu za dalju optimizaciju protokola koje će biti moguće direktno primeniti u buduću program uspostavljanja *in vitro* banke gena (germplazme) voćnih biljnih vrsta koje se gaje u Srbiji.

Ključne reči: inkapsulacija-dehidracija, vitifikacija, „droplet“ vitifikacija, „V cryo-plate“ metoda, „D cryo-plate“ metoda

Uvod

Napredak postignut u biljnoj biotehnologiji, naročito u oblasti primene tehnika kulture tkiva *in vitro* i molekularne biologije, omogućio je kontinualnu proizvodnju biljnog materijala, selekciju elitnih primeraka, eliminaciju patogena i sistemskih infekcija, kolekcionisanje, kao i kratkotrajno (short-term), srednje duго (medium-term) i dugotrajno (long-term) čuvanje biljnih genetičkih resursa (Cruz-Cruz *et al.*, 2013). Očuvanje biljnog biodiverziteta je takođe veoma značajno sa stanovišta održivog korišćenja bioloških resursa, ali i za klasične i moderne programe oplemenjivanja. Nove tehnike čuvanja biljnog materijala bazirane na primeni biotehnologije, uključujući različite *in vitro* tehnike, predstavljaju komplementarni pristup konvencionalnim *ex situ* metodama čuvanja i obezbeđuju dodatnu sigurnost za tako uspostavljene kolekcije biljnih vrsta.

Počev od osnivanja, u Laboratoriji za kulturu tkiva Instituta za voćarstvo, Čačak uspešno su korišćene neke od *in vitro* metoda u cilju uspostavljanja *in vitro* kolekcije namenjene kratkom i srednje dugom čuvanju germplazme voćaka („slow growth storage“). Ove tehnike se baziraju na redukciji metaboličke aktivnosti *in vitro* kultura kroz modifikovanje sastava hranljive podloge i/ili uslova za gajenje *in vitro* izdanaka (Lambardi & Ozudogru, 2013), što omogućava produženje intervala između uzastopnih transplantacija kultura, odnosno produžava trajanje jedne subkulture. Tehnika čuvanja na hladnom (+5 °C, u uslovima potpunog mraka) tzv. „cold storage“ je uspešno primenjena kod vegetativnih podloga za trešnju i višnju Gisela 5 (*Prunus cearsus* × *P. canescens*) i Tabel Edabriz (*P. cearsus*) (Ružić & Cerović, 1999; Ružić *et al.*, 2015a), autohtonih sorti šljiva (*P. domestica*) Požegača, Sitnica i Crvena ranka (Ružić & Cerović, 1990; Ružić *et al.*, 2012a; Vujović *et al.*, 2020a), generativne podloge za šljivu džanarika (*Prunus cerasifera* Ehrh.) (Ružić *et al.*, 2015b) i jabuke (*Malus* × *domestica* Borkh.) (Ružić *et al.*, 2016). Takođe, ispitivana je imogućnost čuvanja inkapsuliranih vrhova izdanaka („synthetic seed“ – tehnologija „sintetičkih“ semena) na hladnom kod predstavnika roda *Rubus* sa posebnim osvrtom na očuvanje kapaciteta za multiplikaciju i ožiljavanje posle procesa konzervacije (Ružić *et al.*, 2011).

Tokom poslednjih nekoliko decenija, krioprezervacija, tj. čuvanje biljnog materijala na ultra niskim

temperaturama [tečni azot (LN), -196 °C], je postala veoma značajna metoda za dugotrajno čuvanje germplazme biljaka na malom prostoru, uz minimalne zahteve za održavanje i značajno snižene rizike u odnosu na konzervaciju biljnih kolekcija u poljskim uslovima. Ova metoda omogućava teoretski neograničeno dugo čuvanje biljnog materijala jer obezbeđuje zaustavljanje ćelijskih deoba, supresiju svih metaboličkih aktivnosti u ćelijama (Engelmann, 2011), a time i očuvanje genetičkog integriteta ovako konzerviranih genotipova (Wang *et al.*, 2021a). Trenutno, krioprezervacija je jedina sigurna i isplativa opcija za dugotrajno čuvanje različitih biljnih vrsta, uključujući vrste koje proizvode rekalcitrantno seme, vrste koje se isključivo razmnožavaju vegetativnim putem, retke i ugrožene biljne vrste, kao i njihove biotehnološke produkte (Engelmann, 2004). Međutim, široka primena krioprezervacije za dugo čuvanje biljaka podrazumeva dostupnost efikasnih i reproducibilnih protokola koji se mogu primeniti na različite biljne vrste (Panis & Lambardi, 2005). Korišćenje novih tehnika koje se baziraju na fenomenu vitrifikacije, kao što su tehnike vitrifikacije, inkapsulacije dehidracije, inkapsulacije vitrifikacije, „droplet“ vitrifikacije, „V cryo-plate“ i „D cryo-plate“ je proširilo primenu krioprezervacije na veliki broj biljnih vrsta (Engelmann, 2004; Sakai & Engelmann, 2007), uključujući i različite vrste voćaka (Benelli *et al.*, 2013). Vitrifikacija se bazira na uklanjanju vode iz biljnog tkiva fizičkom (desikacija) ili hemijskom dehidratacijom, koja je praćena brzim zamrzavanjem biljnog materijala u tečnom azotu (Kaviani Livani, 2011). Hemijska dehidracija podrazumeva upotrebu hemijskih supstanci – krioprotektanata, koji povećavaju stabilnost ćelijske membrane i viskozitet citoplazme biljne ćelije (Tanaka *et al.*, 2018). Tokom brzog hlađenja, direktnim uranjanjem u tečni azot, ovi visoko koncentrovani rastvori krioprotektanata prelaze u stanje metastabilnog, amorfnoг stakla čime se izbegava stvaranje letalnih kristala leda koji oštećuju ćelijsku membranu. Izuzetno velika viskoznost ćelijskog i međućelijskog sadržaja zaustavlja sve hemijske reakcije zbog nemogućnosti molekulske difuzije što obezbeđuje uspostavljanje dugotrajne metaboličke inaktivnosti i stabilnosti (Burke, 1986).

U proteklom periodu, grupa za kulturu tkiva u okviru Instituta je inicirala i istraživanja koja se odnose na primenu različitih *in vitro* tehnika krioprezerva-

cije (inkapsulacija dehidracija, vitrifikacija, „droplet“ vitrifikacija, „V cryo-plate“ i „D cryo-plate“) za dugotrajno čuvanje različitih vrsta kontinentalnih voćaka (Vujović *et al.*, 2015a). COST 863 akcija (Euroberry Research: from Genomics to Sustainable Production, Quality & Health) i naročito COST 871 (Cryopreservation of Crop Species in Europe) su u tom smislu imale presudan značaj i omogućile saradnju sa institucijama i istraživačima koji su svetski priznati eksperti u ovoj oblasti. Rezultat ovih saradnji su bile dve Short Term Scientific Missions – STSM „The application and the elaboration of the protocol for encapsulation-dehydration, vitrification and droplet vitrification techniques in raspberry (*Rubus idaeus* L.)“ i „Cryopreservation of autochthonous plum genotypes (*P. insititia* L. and *P. cerasifera* Ehrh.) using encapsulation-dehydration and droplet vitrification techniques“ i projekti bilateralne saradnje sa Francuskom i Hrvatskom. Takođe, kroz realizaciju projekta „Conservation and Plum pox virus eradication from Serbian autochthonous plum genotypes using cryo techniques – CryoPlum“ finansiranog sredstvima Fonda za nauku RS (Promis poziv) u poslednje dve godine se intenzivno radilo na optimizaciji protokola za krioprezervaciju 8 autohtonih genotipova šljive i ispitivanju mogućnosti eliminacije virusa šarke primenom krioterapije.

Primena *in vitro* tehnika krioprezervacije u konzervaciji voćaka

Inkapsulacija-dehidracija

Tehnika inkapsulacije-dehidracije je razvijena 90-tih godina prošlog veka od strane Dereuddre *et al.* (1990) i koristila se za krioprezervaciju vrhova *in vitro* izdanaka i somatskih embriona. Sama metoda se zasniva na tehnologiji proizvodnje „sintetičkih“ semena, tj. inkapsulaciji eksplantata u kalcijum alginatnim perlicama (Gonzales-Arnao & Engelmann, 2006). Inkapsulacija omogućava da vrhovi *in vitro* izdanaka, bez opasnosti od značajnog oštećenja ili letalnog efekta, mogu biti podvrgnuti drastičnim tretmanima dehidracije pre samog procesa krioprezervacije. Dehidracija najčešće uključuje prekulturu inkapsuliranih eksplantata u tečnoj hranljivoj podlozi koja sadrži visoke koncentracije saharoze (u trajanju od jednog do sedam dana), nakon čega sledi delimična desikacija u struji sterilnog va-

zduha laminarne komore ili u zatvorenim kontejnerima na silika gelu. Cilj je snižavanje sadržaja slobodne vode u tkivima do oko 20% (u odnosu na svežu masu eksplantata) čime se postiže da ostatak ćelijskog sadržaja vitrifikuje tokom brzog zaleđavanja u LN i time izbegne formiranje letalnih kristala leda. Ova metoda je, do sada, sa uspehom primenjena u krioprezervaciji vrhova *in vitro* izdanaka velikog broja biljnih vrsta tropske i umereno-kontinentalne klimatske zone, kao i ćelijskih suspenzija i somatskih embriona (Gonzales-Arnao & Engelmann, 2006; Engelmann *et al.*, 2008).

U Institutu za voćarstvo, ova tehnika je je uspešno primenjena kod generativne podloge za šljivu džanarika (Ružić *et al.*, 2012b; 2013a; 2015b) i kupine Čačanska bestrna (*Rubus* L. subgenus *Rubus* Watson) (Ružić *et al.*, 2012c; 2013), a izdanci regenerisani iz krioprezerviranih eksplantata oba genotipa su imali normalnu morfologiju karakterističnu za genotip i uspešno su multiplicirani u tri uzastopne supkulture (Sl. 1). Kao početni eksplantati korišćeni su vrhovi *in vitro* izdanaka veličine 2–3 mm, bez listova, inkapsulirani u 3, 5 i 10% Na-alginatu rastvorenom u tečnoj MS hranljivoj podlozi bez CaCl_2 (pH 5,7). Polimerizacija je vršena u tečnoj MS hranljivoj podlozi koja je sadržavala 100 mM CaCl_2 i 0,06 M saharozu. Alginatne perlice sa eksplantatima su pretretirane u tečnoj MS hranljivoj podlozi bez hormona sa 0,75 M i 1 M saharozom, 24 sata, a desikacija je vršena 4 h (procenat vlage ~29%) i 8 h (procenat vlage ~20%) na silika gelu, u klimatizovanoj prostoriji za gajenje biljaka. U eksperimentima je ispitano ukupno 12 kombinacija/tretmana za svaki genotip. Posle čuvanja u LN perlice su direktno postavljane na hranljivi medijum za multiplikaciju, gajene prvih 7 dana u mraku, a potom u uslovima standardnog fotoperioda (16 h svetlost/8 h mrak). Praćeni su sledeći parametri: procenat regeneracije, odnosno udeo eksplantata koji je formirao vijabilne izdanke posle probijanja alginatne perlice i prosečan broj regeneranata po inicijalnom eksplantatu. Kod generativne podloge za šljivu džanariku regeneracija izdanaka je postignuta kod 5 kombinacija/tretmana, a najveći procenat ponovnog rastenja (60%) je dobijen kod vrhova inkapsuliranih u 3% i 5% alginatu (Sl. 2) u kombinaciji sa 8 sati desikacije i pretretmanom u 0,75 M saharozu (Ružić *et al.*, 2012b; 2015b). Kod ovog genotipa visok procenat regeneracije (40%) je uočen i kod eksplantata inkapsuliranih u 3% alginat-

nim perlicama kod kojih je vršena desikacija u trajanju od 4 sata bez obzira na koncentraciju saharoze korišćene u pretretmanu. Postignuti procenti regeneracije kod ovih voćaka su bili niži u odnosu na rezultate dobijene kod drugih vrsta voćaka, npr. *Malus* spp. (90%; Zhao *et al.*, 1999), *Pyrus communis* L. (80%; Dereuddre *et al.*, 1990), ili slični kao kod *Ribes* sp. (60%; Reed & Yu, 1995). Sa druge strane, izdanci sorte kupine Čačanska bestrna krioprezervirani u istim eksperimentalnim uslovima su pokazali znatno manji kapacitet za ponovno rastenje posle otapanja iz LN (regeneracija dobijena kod tri kombinacije tretmana), a procenat regeneracije se kretao od 5,6% do 16,7% (Ružić *et al.*, 2012c; 2013a). Najveće ponovno rastenje kod ovog genotipa je zabeleženo kod vrhova izdanaka inkapsuliranih u 5% alginatu u kombinaciji sa 8 sati desikacije i pretretmanom sa 1 M saharozom. Jedan od razloga dobijanja niske stope regeneracije iz vrhova izdanaka odabranih genotipova može biti taj što su kao početni biljni materijal korišćeni eksplantati koji su izolovani sa izdanaka gajenih u standardnim *in vitro* uslovima. Neki raniji rezultati ukazuju na neophodnost prethodne pripreme/pretretmana matičnih *in vitro* biljaka umereno-kontinentalnih vrsta kroz produženje trajanja supkulture (70 dana; Zhao *et al.*, 1999) ili aklimaciju – gajenje na niskim temperaturama (8 nedelja na 0 °C; Dereuddre *et al.*, 1990). Time se postiže pre-kondicioniranje samih početnog biljnog materijala i povećava verovatnoća preživljavanja tkiva pri izlaganju ekstremno niskim temperaturama (Gonzales-Arnan & Engelmann, 2006).

Vitrifikacija

Tehnika vitrifikacije podrazumeva dehidraciju ćelija ili vrhova *in vitro* izdanaka korišćenjem visoko koncentrovanih (7 M do 8 M) rastvora krioprotektanata tzv. vitrifikacionih rastvora (Plant Vitrification Solutions, PVS), što prethodi direktnom uranjanju eksplantata u LN. Vitrifikacioni rastvori obično predstavljaju smešu penetrirajućih i nepenetrirajućih krioprotektanata (najčešće korišćeni su dimetilsulfoksid, etilen glikol, glicerol i saharoza) koji treba da obezbede dovoljnu dehidraciju eksplantata i zaštitu od kristalizacije preostalih molekula vode tokom zamrzavanja, a da se pri tome izbegne njihov citotoksičan efekat (Kim *et al.*, 2009a). Prema tome, ključni momenat u primeni

ove tehnike je kvantifikovanje dehidracione tolerancije biljnog materijala prema vitrifikacionom rastvoru (Sakai & Engelmann, 2007). U krioprezervaciji biljnih ćelija i tkiva najčešće se koriste vitrifikacioni rastvori koji se baziraju na glicerolu i označeni su kao PVS2 (Sakai *et al.*, 1990) i PVS3 (Nishizawa *et al.*, 1993). PVS2 rastvor sadrži 30% (w/v) glicerol, 15% (w/v) etilen glikol, 15% (w/v) dimetilsulfoksid i 13,7% saharozu, dok PVS3 rastvor uključuje samo 50% glicerol i 50% saharozu. Kim *et al.* (2009a) su, međutim, razvili i čitav niz alternativnih vitrifikacionih rastvora koji predstavljaju ili modifikacije PVS2 rastvora u kojima je povećana koncentracija glicerola i saharoze i/ili smanjena koncentracija dimetilsulfoksida i etilen glikola, ili modifikacije PVS3 rastvora sa smanjenim koncentracijama glicerola i saharoze. Pored izbora adekvatnog sastava i dužine tretmana vitrifikacionim rastvorom, veoma značajan korak u primeni ove metode je i tzv. osmotska priprema (dehidracija) koja podrazumeva inkubiranje eksplantata u rastvorima koji sadrže značajno niže koncentracije krioprotektanata nego PVSs rastvori („loading solutions“ – LS rastvori). Iako mehanizam delovanja LSs nije poznat (Takagi, 2000), ovaj tretman može značajno povećati preživljavanje krioprezerviranih eksplantata jer redukuje citotoksičnost koja bi mogla biti indukovana direktnim izlaganjem tkiva visoko koncentrovanim PVSs. Najčešće se osmotska dehidracija vrši u rastvoru 2 M glicerola i 0,4 M saharoze (20–60 min) (Nishizawa *et al.*, 1993; Matsumoto *et al.*, 1994), ali postoji i čitav niz alternativnih LS rastvora koji su testirani na velikom broju divergentnih biljnih vrsta (Kim *et al.*, 2009b).

Primenom tehnike vitrifikacije u Institutu za voćarstvo su uspešno krioprezervirane vegetativna podloga za trešnju Gisela 5 (Ružić *et al.*, 2014) i sorta jabuke Gala Must (Vujović *et al.*, 2021a). Kao početni eksplantati su korišćeni vrhovi izdanaka veličine 2–3 mm, bez listova. U cilju povećanja preživljavanja i regeneracije nakon otapanja iz tečnog azota, eksplantati su odmah posle izolacije pretretirani sa tečnim MS medijumom sa progresivno rastućom koncentracijom saharoze (0,3 M saharoza 15 h, a zatim 0,7 M saharoza 5 h), u mraku na 23 °C. Osmotska priprema, u trajanju 20 min na sobnoj temperaturi, vršena je sa tečnom MS medijumom bez hormona sa 2 M glicerolom i 0,4 M saharozom. Dehidracija vrhova *in vitro* izdanaka je vršena na ledu sa 100% PVS2 i 90% PVS2 rastvorom – PVS A3 (37,5% glicerol, 22,5% saharoza,

15% etilen glikol, 15% dimetilsulfoksid; Kim *et al.*, 2006a) u trajanju 30–50 min. Po završenoj dehidraciji, eksplantati su smešteni u kriotube napunjene odgovarajućim vitrifikacionim rastvorom i potapane u LN. Osmotska rehidracija („unloading“) je vršena sa tečnim MS medijumom bez hormona sa 1,2 M saharozom (15 min na sobnoj temperaturi). Procenat regeneracije vrhova izdanaka koji su osmotski dehidrirani sa PVS2 rastvorom se kretao u intervalu 8–17% kod vegetativne podloge Gisela 5 i 20–40% kod jabuke Gala Must. Najveća vrednost kod oba genotipa postignuta je posle dehidracije u trajanju od 50 min. Prilikom primene PVS A3 za osmotsku dehidrataciju vrhova izdanaka došlo je do značajno veće regeneracije izdanaka koja se kretala od 39% do 56% (30-minutni tretman) kod podloge Gisela 5 (Sl. 3) i od 15% do 75% (50-minutni tretman) kod sorte jabuke Gala Must (Sl. 4). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se PVS A3-bazirana vitrifikacija može preporučiti za dugotrajno čuvanje ispitanih genotipova u LN. Prema Kim *et al.* (2009a) varijante PVS2 rastvora u kojima je koncentracija glicerola i saharoze povećana su pogodnije za eksplantate koji su srednje veličine, umereno osetljivi na osmotski stres i tolerantni na hemijski toksičnost krioprotektanata.

Suprotno ovim rezultatima, autohtone sorte šljive su pokazale visoku senzitivnost prema PVS2 vitrifikacionom rastvoru. Do sada, primenom ove tehnike kod genotipova Sitnica, Crvena ranka kao i kod džanarika nije se postignuta zadovoljavajuća regeneracija iz eksplantata tehnikom vitrifikacije bez obzira na dužinu dehidracije (neobjavljeni rezultati).

„Droplet“ vitrifikacija

Ova metoda predstavlja kombinaciju tehnike zaleđavanja u kapljici tečnosti („droplet-freezing“; Kartha *et al.*, 1982) i klasične vitrifikacije. Osnovna prednost u odnosu na proceduru klasične vitrifikacije ogleda se u mogućnosti postizanja veoma velike brzine zamrzavanja/odmrzavanja zahvaljujući veoma maloj zapremini (kapljici) rastvora krioprotektanata u kome se nalaze eksplantati (Sakai & Engelmann, 2007; Panis, 2019). Metoda je, prvi put primenjena kod vrhova izdanaka slatkog krompira [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] i bila je bazirana na PVS2 vitrifikaciji (Pennycooke & Towill, 2000). Panis *et al.* (2005) su kasnije izvršili

optimizaciju ove metode i sa uspehom je primenili kod banane. Prosečni procenat regeneracije koji je postignut kod 56 genotipova iz 8 genomskih grupa *Musa* spp. i jedne grupe *Ensete* spp. iznosio je 52,9%. Sa izuzetkom nekih diploidnih genotipova vrste *M. acuminata*, kapacitet za regeneraciju je bio relativno nezavistan od genotipa. U protokolu za ovu metodu eksplantati, koji su prethodno povrgnuti osmotskom pretretmanu u LS rastvoru i dehidraciji u PVS rastvoru, se postavljaju u kaplicu PVS rastvora (15 µl) nanetog na aluminijumsku foliju (približne dimenzije 5 × 20 mm) i trenutno uranjaju u LN. Detaljna procedura „droplet“ vitrifikacije je opisana od strane Wang *et al.* (2021a). Visoke brzine zamrzavanja/odmrzavanja (oko 130 °C s⁻¹) eksplantata se postižu zahvaljujući dobroj termalnoj provodljivosti aluminijuma i direktnom kontaktu između eksplantata i LN tokom zamrzavanja, odnosno između eksplantata i rastvora za osmotsku rehidraciju tokom odmrzavanja eksplantata (Panis *et al.*, 2005). Druge prednosti ove metode su: minimizirana mogućnost povrede eksplantata koji su smešteni na aluminijumsku foliju tokom manipulacije, redukovanje vremena potrebnog za dehidraciju sa PVSs, lako postizanje vitrifikovanog stanja tokom zamrzavanja i izbegavanje devitifikacije tokom odmrzavanja (Kaviani & Kulus, 2022). Sa druge strane, jedan od najvećih nedostataka ove metode je to što zahteva angažovanje veoma obučenog tehničkog kadra i vrlo preciznu kontrolu vremena izlaganja PVSs. Međutim, bez obzira na nedostatke, „droplet“ vitrifikacija je jedna od najšire korišćenih metoda za konzervaciju biljne germplazme u kriobankama (Sakai & Engelmann, 2007; Panis, 2019; Wang *et al.*, 2021a).

Uspostavljanje efikasnih protokola za „droplet“ vitrifikaciju kontinentalnih vrsta voćaka u Institutu za voćarstvo postignuto je variranjem vrste vitrifikacionih rastvora (PVS2, PVS A3 i PVS3), dužine i temperature dehidracije kao i dužine osmotske rehidracije posle otapanja eksplantata iz LN. Inicijalna istraživanja su započeta u okviru STSM koja je sprovedena u Institutu IRD Montpellier, Francuska, i ponovljena su u Institutu za voćarstvo u cilju međulaboratorijskog potvrđivanja i ispitivanja reproducibilnosti primenjenih protokola krioprezervacije (Vujović *et al.*, 2011; 2012). Kao model biljke korišćene su kupina Čačanska bestrna i generativna podloga za šljivu džanarika. U fazi osmotske pripreme eksplantati su tretirani 30 min modifikovanim LS rastvorom koji je sadržavao

1,9 M glicerol i 0,5 M saharozu (Kim et al., 2009b). Dehidracija eksplantata je vršena na sobnoj temperaturi PVS A3 rastvorom (10–30 min) i PVS3 rastvorom (90–120 min), a osmotska rehidracija u rastvoru 0,8 M saharoze (30 min na sobnoj temperaturi). Dobijeni rezultati su pokazali da se PVS3 bazirana dehidracija može sa visokom efikasnošću koristiti kod kupine ‘Čačanska Bestrna’, a postignuti procenti regeneracije su se kretali od 45,8% (120 min tretman) do 70% (60 min tretman). Dehidracija PVS A3 rastvorom je dovela do značajno nižeg procenta regeneracije koji su se kretali od 5% (10 min tretman) do 30% (30 min tretman). Vrhovi *in vitro* izdanaka džanarike su ispoljili visoku senzitivnost preme oba tipa vitrifikacionih rastvora i postignuti procenti regeneracije su se kretali u intervalu 5–20% pri čemu ni vrsta vitrifikacionog rastvora ni dužina tretmana nisu imali značajan uticaj na regeneraciju.

Dalja optimizacija protokola za „droplet“ vitrifikaciju kod sorte kupine Čačanska bestrna (Vujović et al., 2015b) je uključivala: a) skraćivanje vremena dehidracije (40–60 min) na sobnoj temperaturi sa PVS3 rastvorom; b) promenu temperature (na ledu, umesto na sobnoj temperaturi) i dužine trajanja dehidracije (20–40 min) sa PVS A3 rastvorom. Skraćivanjem vremena dehidracije (40 min.) sa PVS3 rastvorom postignuto je povećanje procenta regeneracije na 90,0% (Sl. 5). Sa druge strane, promenom temperature na kojoj je vršena dehidracija sa PVS A3 rastvorom postignuto je takođe značajno povećanje procenta regeneracije krioprezerviranih eksplantata (61,8%), za tretman u trajanju od 40 min. Kod generativne podloge za šljivu džanarika modifikacija protokola za „droplet“ vitrifikaciju uključivala je produženje trajanja dehidracije sa PVS A3 rastvorom (30–50 min), kao i produženje trajanja faze osmotske rehidracije sa 30 na 60 min (neobjavljeni rezultati). Iako su navedene modifikacije protokola kod ovog genotipa uticale na neznatno povećanje procenta regeneracije (20,0–28,2%; Sl. 6) u odnosu na prethodno postignute rezultate, eksplantati su znatno ranije pokazivali prve znake ponovnog rasta, a regenerisani izdanci su se odlikovali bržim rastom i snažnijim habitusom.

Optimizirani protokoli za droplet vitrifikaciju kupine Čačanska bestrna (PVS3 i PVS A3 bazirana dehidracija) poslužili su kao osnova ispitivanje uticaja dužine izlaganja eksplantata tečnom azotu na regenerativnu sposobnost eksplantata (Vujović et al., 2017a).

Dužina čuvanja nije imala značajan uticaj na procenat preživljavanja i regeneracije eksplantata dehidriranih sa oba vitrifikaciona rastvora. Regeneracija eksplantata koji su dehidrirani sa PVS3 rastvorom kretala se u intervalu 80–90%. Dehidratacija sa PVS A3 je dovela do nižeg procenta regeneracije eksplantata koji se nisu statistički značajno varirali (55–65%). Daljim proučavanjem kapaciteta regenerisanih izdanaka posle krioprezervacije za onovnu multiplikaciju i ožiljavanje u kulturi *in vitro* u poređenju sa kontrolnim izdancima utvrđeno je da izdanci dobijeni posle krioprezervacije zadržavaju kapacitet za multiplikaciju i ožiljavanje. Na taj način se obezbeđuje dugotrajno čuvanje klonski identičnog biljnog materijala.

U istraživanjima Ružić et al. (2013b) postignuti su zadovoljavajući procenati regeneracije iz eksplantata vegetativne podloge Gisela 5 dehidriranih na sobnoj temperaturi sa PVS A3 rastvorom (30–50 min), a koji su se kretali u intervalu od 19,1% do 38,2% (40 min tretman; Sl. 7). Pod istim eksperimentalnim uslovima PVS 3 rastvor (60–120 min dehidratacije) se pokazao podjednako efikasnim za krioprezervaciju ovog genotipa, čijom primenom su postignuti procenti regeneracije iz inicijalnih eksplantata koji su se kretali u intervalu od 26,1% do 40% (60 min tretman). Kod sorte jabuke Gala Must (Vujović et al., 2020b) izvršeno je ispitivanje uticaja temperature na kojoj se vrši dehidracija PVS A3 rastvorom pri istim trajanjima tretmana dehidracije (30–50 min), kao i uticaja dužine dehidracije sa PVS3 rastvorom (40–120 min). Dehidracija PVS A3 rastvorom na 0 °C dovela je do statistički značajnog povećanja procenta regeneracije ovog genotipa koji se kretao od 45% do 70% (30 min tretman; Sl. 8) u poređenju sa rezultatima postignutim na sobnoj temperaturi (0–14,5%). Sa druge strane, dehidratacija PVS3 rastvorom u intervalu 40–60 min nije imala značajan efekat na regeneraciju krioprezerviranih vrhova izdanaka (45–50%). Dalje produženje trajanja dehidratacije (90–120 min) dovelo je do značajnog pada u regenerativnom kapacitetu (12,1–5%). Navedeni rezultati jasno ukazuju da se PVS A3-bazirana vitrifikacija može preporučiti kao dobra tehnika za dugotrajno čuvanje ispitanih genotipova krioprezervacijom.

Suprotno ovim rezultatima, autohtone šljive Crvena ranka, Sitnica i Požegača su pokazale znatno niže kapacitete za regeneraciju primenom tehnike „droplet“ vitrifikacije bez obzira na širok opseg dužine tra-

janja dehidracije sa PVS A3 (10–50 min) i sa PVS3 rastvorom (40–120 min) (Vujović *et al.*, 2015c). Najveći procenti regeneracije postignuti su PVS A3 tretmanom u trajanju od 30 min kod genotipova Crvena ranka (34,6%; Sl. 9) i Požegača (15%) i PVS tretmanom u trajanju od 90 min kod genotipa Sitnica (18%). Dobijeni rezultati su ukazali da su kod ovih genotipova neophodne dodatne modifikacije protokola kako bi se postiglo povećanje procenata regeneracije. Ove modifikacije bi bilo moguće direktno primeniti u buduću program uspostavljanja *in vitro* banke gena autohtonih genotipova voćaka naše zemlje.

„V cryo-plate“ i „D cryo-plate“ metode

Rutinska implementacija tehnika krioprezervacije u bilo koji program konzervacije biljnih genetičkih resursa je suočena sa problemima kao što su: preterana ili nedovoljna dehidracija eksplantata, oštećenje i gubitak materijala, kao i manipulativne poteškoće tokom izvođenja procedure (Yamamoto *et al.*, 2011). Nedavno su u National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS) Genebank (Tsukuba, Japan) razvijene nove metode krioprezervacije u kojima se vrhovi izdanaka, pričvršćeni Na-alginatom na površini aluminijumskih pločica, dehidratiraju hemijski različitim vitrifikacionim rastvorima – „V cryo-plate“ metoda (Yamamoto *et al.*, 2011), ili fizički putem vazdušne desikacije – „D cryo-plate“ (Niino *et al.*, 2013). Preciznije rečeno, „V cryo-plate“ metoda predstavlja kombinaciju inkapsulacije-vitrifikacije i „droplet“ vitrifikacije, a „D cryo-plate“ kombinuje inkapsulaciju u alginatu i vazdušno sušenje inkapsuliranih eksplantata. Obe tehnike za krioprezervaciju su veoma praktične, efikasne i obezbeđuju prevazilaženje problema vezanih za primenu drugih tehnika (Yamamoto *et al.*, 2011). Takođe, ove tehnike obezbeđuju postizanje veoma visokih brzina zaleđavanja i odleđavanja eksplantata zbog visoke termičke konduktivnosti aluminijuma. Dve osnovne prednosti ovih tehnika su laka manipulacija eksplantata i postizanje visokih procenata regeneracije posle krioprezervacije (Niino *et al.*, 2013). Međutim, vreme izlaganja eksplantata vitrifikacionim rastvorima u „V cryo-plate“ protokolu mora biti znatno duže u poređenju sa „droplet“ vitrifikacijom pošto su eksplantati inkapsulirani u alginatu (Matsumoto, 2017). Sa druge strane, „D cryo-plate“ metoda dozvoljava korišćenje

većih eksplantata i manje je zahtevna od drugih tehnika krioprezervacije u manipulativnom smislu, minimizira rizike usled hemijskog stresa i pojavu genetičke varijabilnosti koja može biti indukovana tretiranjem eksplantata visoko koncentrovanim rastvorima krioprotektanata (Matsumoto, 2017; Wang *et al.*, 2020b). Iako su do sada ove dve metode sa uspehom primenjene kod oko 30 („V cryo-plate“), odnosno 20 biljnih vrsta („D cryo-plate“), među njima se nalazi veoma mali broj kultivisanih vrsta voćaka (Wang *et al.*, 2021b). Tako je „V cryo-plate“ metoda korišćena za krioprezervaciju kod *Fragaria* × *ananassa* (Yamamoto *et al.*, 2012) i *Vitis* sp. (Bettoni *et al.*, 2019), a „D cryo-plate“ metoda kod *Vaccinium* sp. (Dhungana *et al.*, 2017).

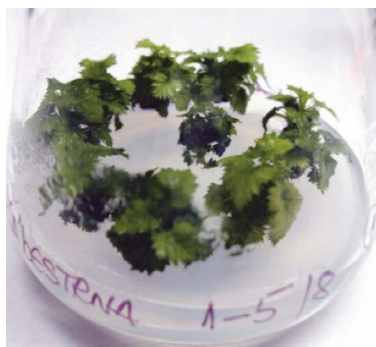
Prvi pokušaj testiranja i razrade protokola za *in vitro* konzervaciju predstavnika roda *Prunus* u Institutu za voćarstvo primenom ovih novorazvijenih tehnika za krioprezervaciju učinjen je u okviru bilateralne saradnje sa Republikom Francuskom. Kao model biljke korišćene su autohtona sorta šljive Požegača i generativna podloga džanarika (Vujović *et al.*, 2015d). U eksperimentima je ispitan uticaj vrste rastvora za osmotsku pripremu eksplantata (2 M glicerol + 0,4 M saharoza ili 1,9 M glicerol + 0,5 M saharoza) na uspešnost regeneracije eksplantata dehidriranih da PVS A3 vitrifikacionim rastvorom 30 min na sobnoj temperaturi („V cryo-plate“). U protokolu za „D cryo-plate“ metodu varirana je dužina desikacije (2, 2,5 i 3 h) u struji vazduha laminarne komore ili u na silika gelu u zatvorenim kontejnerima. Primenom „V cryo-plate“ metode postignuti procenti regeneracije kod oba genotipa su bili veći ukoliko su eksplantati osmotski dehidrirani sa 2 M glicerolom i 0,4 M saharozom (56,1% – sorta Požegača; 44,6% – džanarika) (Sl. 10). U „D cryo-plate“ protokolima uspešnost regeneracije se kretala u intervalu 57,7–77,5% kod džanarike (Sl. 11) i 28,5–47,5% kod Požegače. Poseban značaj ovih istraživanja se ogleda i u činjenici što je izvršena validacija optimiziranih protokola za obe tehnike u različitim laboratorijama, kroz utvrđivanje reproduktivnosti i uporedivosti rezultata dobijenih u laboratorijama Instituta za voćarstvo u Čačku i Instituta IRD u Monpeljeu, Francuska. Optimizirani protokoli (Vujović *et al.*, 2017b) su ušli u knjigu protokola ‘Manual of cryopreservation methods using cryo-plate. V and D cryo-plate procedures as an effective protocol for cryobanks’ [Nino T., Matsumoto T., Yamamoto S-I., Maki S., Tanaka D, Engelmann F. (eds.)].

Dalji eksperimenti na optimizaciji ovih protokola su sprovedeni na genotipovima koji su u prethodnim istraživanjima pokazali zadovoljavajući (vegetativna podloga Gisela 5) (Vujović *et al.*, 2020c) ali i veoma nizak (sorta šljive Crvena ranka) kapacitet za regeneraciju nakon krioprezervacije korišćenjem drugih metoda (Vujović *et al.*, 2021b). Vreme trajanja dehidracije odabrano je na osnovu rezultata prethodnih istraživanja, odnosno najvećih postignutih procenata regeneracije tehnikom „droplet“ vitrifikacije: PVS A3 vitrifikacioni tretman – 40 min za vegetativnu podlogu Gisela 5, 20 i 40 min za sortu šljive Crvena ranka; PVS 3 tretman – 60 min za oba genotipa. U protokolu za „V cryo-plate“ tehniku procenat regeneracije kretao se u intervalu 85,0–95,9% kod vegetativne podloge Gisela 5 (Sl. 12) i od 50,0–66,7%, kod sorte šljive Crvena ranka. Primenom „D cryo-plate“ metode postignuti su nešto niži procenti regeneracije koji su se kretali 45,8–66,7% i 30,0–40,9% (Sl. 13). Postignute vrednosti se prema literaturnim podacima mogu tretirati kao visoko zadovoljavajuće ili zadovoljavajuće za uspešnu i efikasnu krioprezervaciju (Wilms *et al.*, 2020).

Uzimajući u obzir činjenicu da su autohtoni genotipovi šljive, nemerljive genetičke i kulturne vrednosti, ugroženi i potisnuti novostvorenim i komercijalno značajnim sortama i na taj način izloženi laganom i nepovratnom nestanku, veoma je bitno razviti strategiju njihovog dugoročnog očuvanja i održivog korišćenja. Stoga je osnovna ideja CrioPlum projekta bila da se razviju i optimizuju protokoli za konzervaciju najznačajnijih autohtonih genotipova šljive (Belošljiva, Crvena ranka, Crnošljiva, Cerovački piskavac, Dragačevka, Moravka, Požegača, Sitnica i Trnovača) primenom „V cryo-plate“ i „D cryo-plate“ metoda, ali i da se ispita mogućnost eliminisanja (eradikacije) virusa šarke (PPV virus) iz inficiranog polaznog materijala primenom krioterapije. Na osnovu dobijenih rezultata (neobjavljeni rezultati) moglo se zaključiti da je regenerativni kapacitet krioprezerviranih vrhova izdanaka zavisio od primenjene metode krioprezervacije, ali i da je zavisio od genotipa. U „V cryo-plate“ protokolu eksplantati dehidrirani sa PVS2 rastvorom imali su niske procenat regeneracije (niže od 20%) kod većine genotipova. Procenti regeneracije između 20% i 30% postignuti su jedino kod genotipova Belošljiva, Sitnica, Požegača, Moravka i Cerovački piskavac. PVS A3 bazirana dehidracija je dovela do značajnog povećanja kapaciteta za regeneraciju genotipa Moravka (preko

60%; Sl. 14). Procenti regeneracije jednaki ili veći od 30% zabeleženi su i kod genotipova Belošljiva, Požegača i Crnošljiva, dok je kod ostalih genotipova regeneracija iznosila ispod 20%. Tretman PVS3 rastvorom doveo je do povećane regenerativne sposobnosti krioprezerviranih vrhova izdanaka genotipova Sitnica, Crnošljiva i Moravka (prosečno između 40% i 50%). Kod genotipova Belošljiva i Cerovački piskavac uspešnost krioprezervacije iznosila je između 20% i 30%, dok je kod svih ostalih bila manja od 20%. Uzimajući u obzir uspeh regeneracije primenom „D cryo-plate“ metode, sve analizirane šljive su se mogle svrstati u jednu od 3 grupe: i) genotipovi kod kojih je postignuta zadovoljavajuća regeneracija (iznad 40%) u bar jednom desikacionom tretmanu (Belošljiva, Sitnica i Požegača) (Sl. 15); ii) genotipovi koji su pokazali nisku (ispod 30%) regenerativnu sposobnost (Crnošljiva, Moravka i Cerovački piskavac) i; iii) genotipove kod kojih nije bilo moguće regenerisati izdanke iz krioprezerviranih eksplantata (Dragačevka i Trnovača). Dalja optimizacija protokola za ove dve tehnike krioprezervacije je u toku, kao i evaluacija fitosanitarnog statusa genotipova Belošljiva i Crvena ranka koji su kao PPV-zaraženi uvedeni u proces krioprezervacije u cilju eradikacije virusa.

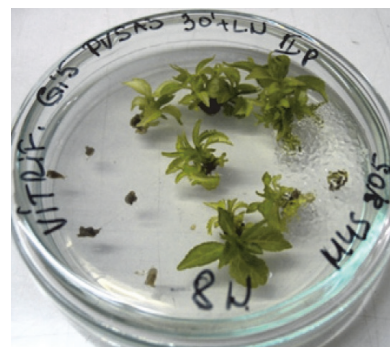
Za razliku od koštičavih, jagodaste vrste voćaka su pokazale znatno veći kapacitet regeneracije posle krioprezervacije primenom „V cryo-plate“ i „D cryo-plate“ tehnika (neobjavljeni rezultati). „V cryo-plate“ tehnika je, uz izvesnu modifikaciju osmotskog pretretmana (povećanje koncentracije saharoze na 0,8 M u kombinaciji sa 2 M glicerolom) i produženje trajanja dehidracije virifikacionim rastvorima (PVS2, PVS A3 i PVS3) do 50 min na sobnoj temperaturi, sa uspehom primenjena kod nekih jagodastih vrsta voćaka. Najveći procenti regeneracije vijabilnih izdanaka iz krioprezerviranih eksplantata iznosili su iznad 80% kod sorte borovnice Toro (PVS A3 dehidracija), iznad 60% kod sorte jagode Clery (PVS3 dehidracija) i preko 50% kod mongolske borovnice (*Amelanchier alnifolia*) (PVS3 dehidracija), dok je sorta maline Willamette pokazala nizak kapacitet regeneracije (20%). Kod istih genotipova „D cryo-plate“ metoda je bila veoma uspešna kod borovnice i jagode (iznad 80% regeneracije za 2,5 i 3 h desikacije; Sl. 16), ali se pokazala kao manje efikasna ili potpuno neefikasna kod mongolske borovnice i maline.



Sl. 1. Izdanci sorte kupine Čačanska bestrna regenerisani posle kriprezervacije tehnikom inkapsulacija-dehidracija u prvoj supkulturi posle regeneracije
Fig. 1. Shoots of blackberry 'Čačanska Bestrna' cryopreserved using encapsulation-dehydration technique in the 1st subculture after regrowth



Sl. 2. Izdanci džanarike regenerisani primenom tehnike enkapsulacija-dehidracija
Fig. 2. Regrowth of cherry plum explants cryopreserved by encapsulation-dehydration technique



Sl. 3. Izdanci vegetativne podloge Gisela 5 regenerisani primenom tehnike vitrifikacije sa PVS A3
Fig. 3. Regrowth of vegetative rootstock 'Gisela 5' explants cryopreserved by vitrification technique using PVS A3



Sl. 4. Izdanci sorte jabuke Gala Must regenerisani primenom tehnike vitrifikacije sa PVS A3
Fig. 4. Regrowth of apple cultivar 'Gala Must' explants cryopreserved by vitrification technique using PVS A3



Sl. 5. Izdanci kupine, sorta Čačanska bestrna regenerisani primenom tehnike „droplet“ vitrifikacija sa PVS3
Fig. 5. Regrowth of blackberry cultivar 'Čačanska Bestrna' explants cryopreserved by PVS3 based droplet vitrification technique



Sl. 6. Izdanci džanarike regenerisani primenom tehnike „droplet“ vitrifikacija sa PVS A3
Fig. 6. Regrowth of cherry plum explants cryopreserved by PVS A3 based droplet vitrification technique



Sl. 7. Izdanci vegetativne podloge Gisela 5 regenerisani primenom tehnike „droplet“ vitrifikacija sa PVS A3
Fig. 7. Regrowth of vegetative rootstock 'Gisela 5' explants cryopreserved by PVS A3 based droplet vitrification technique



Sl. 8. Izdanci sorte jabuke Gala Must regenerisani primenom tehnike „droplet“ vitrifikacija sa PVS A3
Fig. 8. Regrowth of apple cultivar 'Gala Must' explants cryopreserved by PVS A3 based droplet vitrification technique



Sl. 9. Izdanci authtone sorte šljive Crvena ranka regenerisani primenom tehnike „droplet“ vitrifikacija sa PVS A3
Fig. 9. Regrowth of autochthonous plum 'Crvena Ranka' explants cryopreserved by PVS A3 based droplet vitrification technique



Sl. 10. Izdanci autohtone sorte šljive Pošegača regenerisani primenom tehnike „V cryo-plate“ sa PVS A3

Fig. 10. Regrowth of autochthonous plum 'Pošegača' explants cryopreserved by PVS A3 based V cryo-plate method



Sl. 11. Izdanci džanarlike regenerisani primenom tehnike „D cryo-plate“

Fig. 11. Regrowth of cherry plum explants cryopreserved by D cryo-plate method



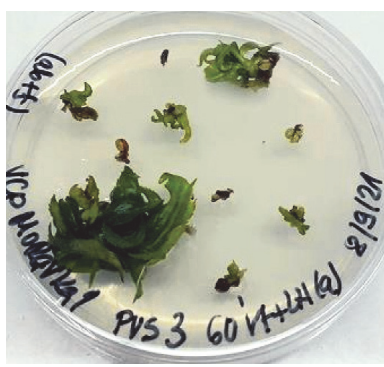
Sl. 12. Izdanci podloge Gisela 5 regenerisani primenom tehnike „V cryo-plate“ sa PVS A3

Fig. 12. Regrowth of cherry rootstock 'Gisela 5' explants cryopreserved by PVS A3 based V cryo-plate method



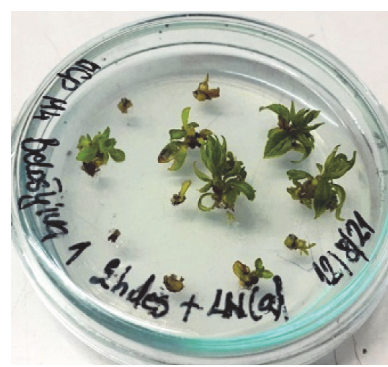
Sl. 13. Izdanci autohtone šljive Crvena ranka regenerisani primenom tehnike „D cryo-plate“

Fig. 13. Regrowth of autochthonous plum 'Crvena Ranka' explants cryopreserved by D cryo-plate method



Sl. 14. Izdanci autohtone sorte šljive Moravka regenerisani primenom tehnike „V cryo-plate“ sa PVS3

Fig. 14. Regrowth of autochthonous plum 'Moravka' explants cryopreserved by PVS3 based V cryo-plate method



Sl. 15. Izdanci autohtone šljive Belošljiva regenerisani primenom tehnike „D cryo-plate“

Fig. 15. Regrowth of autochthonous plum 'Belošljiva' explants cryopreserved by D cryo-plate method



Sl. 16. Izdanci sorte jagode Clery regenerisani primenom tehnike „D cryo-plate“

Fig. 16. Regrowth of strawberry 'Clery' explants cryopreserved by D cryo-plate method

Zaključak

Rezultati primene tehnika krioprezervacije *in vitro* koje se baziraju na fenomenu vitifikacije u konzervaciji različitih kontinentalnih vrsta voćaka jasno ukazuju da postoji genotipska specifičnost regenerativnih kapaciteta različitih genotipova i to ne samo između onih koji pripadaju različitim vrstama već i u okviru iste vrste voćaka. Ova genotipska specifičnost se može pripisati različitoj dehidratacnoj toleranciji, kao i različitoj osetljivosti na hemijski ili osmotski stres koji eksplantati trpe tokom tretmana koji prethode samom procesu potapanja u tečnom azotu. Dobijeni rezultati su u skladu sa zapažanjima drugih istraživača (Wilms *et al.*, 2020) koji su pokušali da razviju protokole koji bi, uz visoku efikasnost a bez značajnih modifikacija, bili primenjivi kod genotipova u okviru jedne vrste. Međutim, bez obzira na velika variranja u procentima regeneracije, kod većine genotipova u našim istraživanjima je bilo moguće postići regeneraciju preko 40% primenom bar jedne tehnike krioprezervacije (što se može smatrati uspešnom regeneracijom). Dalja istraživanja je potrebno fokusirati na prekondicioniranje matičnih *in vitro* biljaka (aklimacija) i/ili prekulturu izolovanih eksplantata u cilju postizanja dehidratacne tolerancije koja je neophodan preduslov za uspešnu krioprezervaciju koja se zasniva na fenomenu vitifikacije. Dosadašnji rezultati predstavljaju upravo dobru osnovu za dalju optimizaciju protokola koje će biti moguće direktno implementirati u budući program uspostavljanja *in vitro* banke germplazme voćaka u našoj zemlji.

Zahvalnica

Ova istraživanja su finansirana sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja RS (ugovor o finansiranju broj 451-03-68/2022-14/200215).

Literatura

- Benelli C., De Carlo A., Engelmann F. (2013): Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of *Actinidia*, *Diospyros*, *Malus*, *Olea*, *Prunus*, *Pyrus* and *Vitis*. *Biotechnology Advances*, 31: 175–185.
- Bettoni J.C., Bonnart R., Shepherd A.N., Kretschmar A.A., Volk G.M. (2019): Modifications to a *Vitis* shoot tip cryopreservation procedure: effect of shoot tip size and use of cryoplates. *CryoLetters*, 40: 103–112.
- Burke M.J. (1986): The glass state and survival of anhydrous biological systems. In: 'Membrane, Metabolism and Dry Organisms', Leopold A.C. (ed.), Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, pp. 358–364.
- Cruz-Cruz C., María T., González-Arno M., Engelmann F. (2013): Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources*, 2: 73–95.
- Dereuddre J., Scottez C., Arnaud Y., Duran M. (1990): Résistance d'apex caulinaires de vitroplants de poirier (*Pyrus communis* L. cv. Beurré Hardy), enrobés dans l'alginate à une déshydratation puis à une congélation dans l'azote liquide: effet d'un durcissement préalable au froid. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris Série III*, 310: 317–323.
- Dhungana S.A., Kunitake H., Niino T., Yamamoto S.I., Fukui K., Tanaka D., Maki S., Matsumoto T. (2017): Cryopreservation of blueberry shoot tips derived from *in vitro* and current shoots using D cryoplate technique. *Plant Biotechnology*, 34, 1: 1–5.
- Engelmann F. (2004): Plant cryopreservation: progress and prospects. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 40: 427–433.
- Engelmann F. (2011): Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 47: 5–16.
- Engelmann F., Gonzalez-Arno M.T., Wu W.J., Escobar R.E. (2008): Development of encapsulation-dehydration. In: 'Plant cryopreservation: a practical guide', Reed B. M. (ed), Springer, Berlin, Germany, pp 59–76.
- Gonzalez-Arno M.T., Engelmann F. (2006): Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. *Cryo Letters*, 27(3): 155–68.
- Kartha K.K., Leung N.L., Mroginski L.A. (1982): *In vitro* growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 107: 133–140.
- Kaviani Livani B. (2011): Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *Australian Journal of Crop Science*, 5: 778–800.
- Kaviani B., Kulus D. (2022): Cryopreservation of endangered ornamental plants and fruit crops from tropical and subtropical regions. *Biology*, 11, 6: 847.
- Kim H.H., Lee Y.G., Shin D.J., Ko H.C., Gwag J.G., Cho E.G., Engelmann F. (2009a): Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures. *CryoLetters*, 30: 320–334.
- Kim H.H., Lee Y.G., Park S.U., Lee S.C., Baek H.J., Cho E.G., Engelmann F. (2009b): Development of alternative loading solutions in droplet-vitrification procedures. *CryoLetters*, 30, 291–299.
- Lambardi M., Ozudogru A. (2013): Advances in the safe storage of micropropagated woody plants at low temperature. *Acta Horticulturae*, 988: 29–42.
- Matsumoto T. (2017): Cryopreservation of plant genetic resources: Conventional and new methods. *Reviews in Agricultural Science*, 5: 13–20.

- Matsumoto T., Sakai A., Yamada K. (1994): Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Plant Cell Reports*, 13: 442–446.
- Niino T., Yamamoto S., Fukui K., Martínez C.R.C., Arizaga M.V., Matsumoto T., Engelmann F. (2013): Dehydration improves cryopreservation of mat rush (*Juncus decipiens* Nakai) basal stem buds on cryo-plates. *CryoLetters*, 34: 549–560.
- Nishizawa S., Sakai A., Amano Y., Matsuzawa T. (1993): Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science*, 91, 67–73.
- Panis B. (2019): Sixty years of plant cryopreservation: from freezing hardy mulberry twigs to establishing reference crop collections for future generations. *Acta Horticulturae*, 1234: 1–7.
- Panis B., Lambardi M. (2005): Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). *Proceedings of the International Workshop 'The Role of Biotechnology for the Characterisation and Conservation of Crop, Forestry, Animal and Fishery Genetic Resources'*, Turin (Italy), pp. 43–54.
- Panis B., Piette B., Swennen R. (2005): Droplet vitrification of apical meristems: A cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. *Plant Science*, 168: 45–55.
- Pennycooke J.C., Towill L.E. (2000): Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification. *Plant Cell Reports*, 19: 733–737.
- Reed B.M., Yu X. (1995): Cryopreservation of *in vitro*-grown gooseberry and currant meristems. *CryoLetters* 16, 131–136.
- Ružić Đ., Cerović R. (1990): Proliferazione *in vitro* della cv. susino Požegača dopo conservazione frigorifera. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura*, 3: 81–82.
- Ružić Đ., Cerović R. (1999): The evaluation of *In vitro* shoot cultures of two sweet cherry rootstocks after cold storage. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, Vol. VII, 4: 153–162.
- Ružić Đ., Vujović T., Cerović R. (2011): *in vitro* propagation of blackberry and raspberry after cold storage of encapsulated shoot tips. *Acta Horticulturae*, 908: 275–282.
- Ružić Đ., Vujović T., Cerović R. (2012a): *In vitro* preservation of autochthonous plum genotypes. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 18: 55–62.
- Ružić Đ., Vujović T., Cerović R. (2012b): Cryopreservation of *Prunus cerasifera* Ehrh. shoot tips by encapsulation-dehydration. *Proceedings of Final Meeting of COST Action 871 – Cryopreservation of Crop Species in Europe*, Angers (France), pp. 148–150.
- Ružić Đ., Vujović T. (2012c): Cryopreservation *in vitro* of blackberry 'Čačanska Bestrna' shoot tips by encapsulation dehydration. *Acta Horticulturae*, 946: 55–60.
- Ružić Đ., Vujović T., Cerović R. (2013a): *In vitro* conservation of two plant species (*Prunus cerasifera* Ehrh. and *Rubus fruticosus* L.) shoot tips by encapsulation dehydration. *Genetika*, 45, 1: 1–10.
- Ružić Đ., Vujović T., Cerović R. (2013b): Cryopreservation of cherry rootstock Gisela 5 (*Prunus cerasus* × *Prunus canescens*) shoot tips by droplet-vitrification technique. *Journal of Horticultural Research*, 21, 2: 79–85.
- Ružić Đ., Vujović T., Cerović R. (2014): Cryopreservation of cherry rootstock Gisela 5 using vitrification procedure. *Horticultural Science (Prague)*, 41, 2: 55–63.
- Ružić Đ., Vujović T., Cerović R. (2015a): *In vitro* conservation of cherry rootstock Gisela 5. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 14(2): 191–197.
- Ružić Đ., Vujović T., Cerović R. (2015b): *In vitro* conservation of *Prunus cerasifera* Ehrh. by encapsulation dehydration and 'Cold storage' techniques. *Acta Horticulturae*, 1099: 587–594.
- Ružić Đ., Vujović T., Cerović R. (2016): *In vitro* konzervacija jabuke sorte Gala Must®. *Voćarstvo*, 50, 195/196: 71–81.
- Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I. (1990): Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osh. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 9: 30–33.
- Sakai A., Engelmann F. (2007): Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters*, 28: 151–157.
- Takagi H. (2000): Recent developments in cryopreservation of shoot apices of tropical species. In: 'Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm – Current Research Progress and Applications', Engelmann F., Takagi H. (eds), JIRCAS, Tsukuba & IPGRI, Rome, pp. 178–193.
- Tanaka D., Niino T., Uemura M. (2018): Cryopreservation of plant genetic resources. In: 'Advances in Experimental Medicine and Biology', Springer, New York, USA, Volume 1081, pp. 355–369.
- Vujović T., Sylvestre I., Ružić Đ., Engelmann F. (2011): Droplet-vitrification of apical shoot tips of *Rubus fruticosus* L. and *Prunus cerasifera* Ehrh. *Scientia Horticulturae*, 130: 222–228.
- Vujović T., Sylvestre I., Ružić Đ., Engelmann F. (2012): Cryopreservation of cherry plum and blackberry shoot tips by droplet-vitrification. *Proceedings of Final Meeting of COST Action 871 – Cryopreservation of Crop Species in Europe*, Angers (France), pp. 163–166.
- Vujović T., Ružić Đ., Cerović R. (2015a): Some experiences in the field of *in vitro* cryopreservation of woody species (cherry species included) in the Fruit Research Institute Čačak (Serbia). *Book of Abstracts of COST Action FA1104 Workshop 'Long Term Preservation of Woody Species by Cryo-Techniques'*, Firenze (Italy), 27.
- Vujović T., Ružić Đ., Cerović R. (2015b): Optimization of droplet vitrification protocol for cryopreservation of *in vitro* grown blackberry shoot tip. *Acta Horticulturae*, 1099: 595–601.
- Vujović T., Ružić Đ., Cerović R. (2015c): Cryopreservation *in vitro* of autochthonous *Prunus* sp. by droplet-vitrification. *Biologia*, 70, 10: 1359–1365.
- Vujović T., Chatelet Ph., Ružić Đ., Engelmann F. (2015d): Cryopreservation of *Prunus* sp. using aluminium cryo-plates. *Scientia Horticulturae*, 195: 173–182.
- Vujović T., Ružić Đ., Cerović R. (2017a): Effect of the duration of liquid nitrogen storage on the regrowth of blackberry cryopreserved by droplet vitrification. *Contemporary Agriculture*, 66, 1–2: 44–50.
- Vujović T., Chatelet Ph., Ružić Đ., Engelmann F. (2017b): Cherry plum & plum (*Prunus* sp.), V cryo-plate; Cherry plum & plum (*Prunus* sp.), D cryo-plate. In: 'Manual of cryopreservation methods using cryo-plate. V and D cryo-plate procedures as an effective protocol for cryobanks', Nino T., Matsumoto T., Yamamoto S-I., Maki S., Tanaka D., Engelmann F. (eds.), *Plant Tissue Culture and Cryopreservation Group*

- (PTCCryoG), Mexico, pp. 66–69.
- Vujović T., Jevremović D., Marjanović T., Glišić I. (2020a): *In vitro* propagation and medium-term conservation of autochthonous plum cultivar 'Crvena Ranka'. *Acta Agriculturae Serbica*, 25(50): 141–147.
- Vujović T., Ružić Đ., Vranić D., Marjanović T. (2020b): Cryopreservation *in vitro* of apple shoot tips following droplet-vitrification. *Acta Horticulturae*, 1289: 1–8.
- Vujović T., Ružić Đ., Marjanović T., Jevremović D. (2020c): Application of V and D cryo-plate methods for the cryopreservation of cherry rootstock Gisela 5. *Book of Proceedings of the XI International Scientific Agricultural Symposium 'Agrosym 2020'*, pp. 62–68.
- Vujović T., Ružić Đ., Cerović R. (2021a): Cryopreservation of apple shoot tips by vitrification and subsequent plant regeneration. *Acta Horticulturae*, 1308: 33–40.
- Vujović T., Jevremović D., Marjanović T., Ružić Đ. (2021b): Cryopreservation of Serbian autochthonous plum 'Crvena Ranka' using aluminium cryo-plates. *Genetika*, 53, 1: 283–294.
- Wang M.R., Lambardi M., Engelmann F., Pathirana R., Panis B., Volk G.M., Wang Q.C. (2021a): Advances in cryopreservation of *in vitro*-derived propagules: Technologies and explant sources. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 144: 7–20.
- Wang M.R., Bi W., Shukla M.R., Ren L., Hamborg Z., Blystad D.R., Saxena P.K., Wang Q.C. (2021b): Epigenetic and genetic integrity, metabolic stability, and field performance of cryopreserved plants. *Plants*, 10: 1889.
- Wilms H., Fanega Slezziak N., Van der Auweraer M., Brands M., Verleijje M., Hardeman D., Andre E., Panis B. (2020): Development of a fast and user-friendly cryopreservation protocol for sweet potato genetic resources. *Scientific Reports*, 10: 14674.
- Yamamoto S., Fukui K., Niino T. (2011): A new cryopreservation method for vegetatively propagated plant genetic resources using aluminum cryo-plates. *Development of Technologies*, 10: 10–11.
- Yamamoto S.-i., Fukui K., Rafique T., Khan N.I., Castillo Martinez C.R., Sekizawa K., Matsumoto T., Niino T. (2012): Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of strawberry by the vitrification method using aluminium cryo-plates. *Plant Genetic Resources*, 10: 14–19.
- Zhao Y., Wu Y., Engelmann F., Zhou M., Zhang D., Chen S. (1999): Cryopreservation of apple shoot tips by encapsulation-dehydration: effect of preculture, dehydration and freezing procedure on shoot regeneration. *CryoLetters*, 20:103–108.

LONG-TERM CONSERVATION OF FRUIT TREE GERMPLASM USING DIFFERENT *IN VITRO* CRYOPRESERVATION TECHNIQUES AT FRUIT RESEARCH INSTITUTE, ČAČAK**Tatjana Vujović*, Đurđina Ružić, Tatjana Anđelić, Darko Jevremović, Bojana Vasiljević***Fruit Reserach Institute, Kralja Petra I no. 9, 32000 Čačak, Republic of Serbia***E-mail: tvujovic@institut-cacak.org***Abstract**

Cryopreservation represents contemporary method for long-term conservation of plant germplasm at ultra-low temperature (liquid nitrogen, -196°C). Since cryopreservation reduces cost and risks linked to management of field germplasm collections, it has become a complementary approach to conventional conservation methods. Program for application of this strategy was also initiated within Department of Fruit Physiology of FRI, Čačak more than a decade ago. Most of the research has been focused on optimization of the protocols for different vitrification-based cryopreservation techniques and their application for conserving temperate fruit tree genotypes. Encapsulation-dehydration technique has been successfully applied for cryopreservation of cherry plum and blackberry 'Čačanska Bestrna'. Research on application of vitrification technique for conservation of *Prunus* and *Malus* germplasm has shown that significant increase in regrowth of cryopreserved shoot tips of cherry rootstock 'Gisela 5' and apple 'Gala Must' can be achieved by varying duration of dehydration and/or type of vitrification solution (VS) employed. Optimization of the droplet-vitrification protocol in representatives of *Prunus* (plums 'Crvena Ranka', 'Sitnica', 'Požegača', and 'Krina', cherry plum, rootstock 'Gisela 5'), *Malus*

(apple 'Gala Must') and *Rubus* (blackberry 'Čačanska Bestrna') genera was performed by evaluating the effect of different VSs, treatment durations, temperature of dehydration and duration of unloading on recovery of cryopreserved explants. Recently, the research on application of newly developed V and D cryo-plate techniques has been initiated, too. These methods allow overcoming disadvantages of other vitrification procedures such as mistiming dehydration, damage and loss of material and manipulative problems. Shoot tips of number of autochthonous plums ('Crvena Ranka', 'Požegača', 'Sitnica', 'Moravka', 'Belošljiva'), cherry plum, rootstock 'Gisela 5', strawberry 'Clery', blueberry 'Toro' and saskatoon (*Amelanchier alnifolia*) were successfully cryopreserved using these methods.

Results obtained in this research represent a substantial contribution to establishing optimized conservation technology by application of different vitrification based cryopreservation techniques, as well as a good basis for further optimization of the protocols that will be possible to directly implement in the future program of establishing an *in vitro* germplasm bank of fruit tree species in our country.

Key words: encapsulation-dehydration, vitrification, droplet-vitrification, V cryo-plate, D cryo-plate