

BANKI GENÓW W ZACHOWANIU ROŚLIN RZADKICH I ZAGROŻONYCH

Genebanks in the conservation of rare and endangered plants

Jerzy PUCHALSKI

Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej PAN, ul. Prawdziwka 2,
02-973 Warszawa

WSTĘP

Postępujące w błyskawicznym tempie zagrożenie zasobów przyrody na świecie jest przedmiotem troski wielu organizacji międzynarodowych i krajowych. Publikowane są tzw. czerwone księgi i listy gatunków zagrożonych wymarciem, jeśli nie zostaną podjęte w najbliższym czasie skuteczne działania dla ich ochrony. Bardzo duże znaczenie w tym zakresie miał tzw. Szczyt Państw Świata w 1992 roku w Rio de Janeiro, którego efektem było opracowanie „Konwencji o Różnorodności Biologicznej” ustanawiającej zasady ochrony różnorodności biologicznej na różnych poziomach organizacji przyrody w warunkach tzw. zrównoważonego rozwoju. Konwencja ta zwróciła uwagę na duże znaczenie ochrony bioróżnorodności w warunkach *ex situ*, czyli poza naturalnymi miejscami występowania gatunków. Ochrona *ex situ* może być uzupełniającą formą zachowania różnorodności gatunkowej roślin i zwierząt w stosunku do powszechnie stosowanej ochrony *in situ* w parkach narodowych i rezerwatach przyrodniczych (Heywood, Baste 1995, Rauer *et al.* 2000).

Ochrona *ex situ* może być natomiast podstawową metodą zachowania różnorodności tzw. genetycznej, czyli na poziomie genotypów i populacji (Baur, Schmid 1996). Zajmują się tym głównie tzw. banki genów, czyli instytucje wyspecjalizowane w zbiorze i długotrwałym przechowywaniu tzw. plazmy zarodkowej (po angielsku *germplasm*), którą stanowi materiał genetyczny tworzący fizyczną podstawę dziedziczenia w następnych pokoleniach i mogący służyć do przechowywania przez możliwie najdłuższy okres. U roślin plazmą zarodkową są wszelkie diaspory i utwory

przetrawnikowe służące do rozmnażania (generatywnego lub wegetatywnego) jak: nasiona lub zarodniki, bulwy, kłącza czy cebule oraz izolowane tkanki lub organy i kultury *in vitro* (Puchalski 1998).

Najczęściej wykorzystywanym rodzajem roślinnej plazmy zarodkowej są nasiona wraz z różnymi owocami suchymi jak ziarniaki traw, orzechy i orzeszki, rozłupki czy niełupki. Rzadziej podejmowane są natomiast próby wykorzystywania pyłku jako materiału do długotrwałego przechowywania w bankach genów (Connor i Towill 1993).

DŁUGOTRWAŁE PRZECHOWYWANIE NASION

Jak wiadomo nasiona podlegają procesowi naturalnego starzenia się powodującego stopniową utratę ich wigoru i żywotności aż do śmierci biologicznej. Naturalnemu starzeniu się nasion towarzyszą zwykle różne zmiany natury fizjologicznej (Górecki *et al.* 1998) oraz bardzo niekorzystne dla ochrony różnorodności genotypów i populacji zmiany o charakterze genetycznym wywoływane różnymi mutacjami, dryfem genetycznym i selekcją naturalną powodującą efekt tzw. szyfłu genetycznego (Roos 1988, Puchalski 1993). W wyniku tego istotnym zmianom ulega pierwotna struktura genetyczna populacji wprowadzanych do przechowywania w banku nasion. Dlatego też banki genów poszukują metod umożliwiających maksymalne wydłużenie okresu życia nasion. Osiągnąć to można przez wprowadzanie nasion w stan anabiozy spowalniającej ich procesy życiowe. Jak wiadomo, o szybkości starzenia się nasion decydują dwa główne czynniki: zawartość wody w nasionach i temperatura ich

przechowywania. Znana jest zasada Harringtona (1973), iż okres żywotności nasion skraca się o połowę dla każdego wzrostu wilgotności nasion o 1% (w zakresie 5–14%) oraz każdego wzrostu temperatury przechowywania o 5° (0°–50°C). Zasada ta ma oczywiście sens ogólny i jej stosowanie zależy od typu i pochodzenia nasion, ale dała ona podstawę do opracowania metod służących długotrwałemu przechowywaniu nasion. Metody te bazują głównie na wysuszeniu nasion do odpowiednio niskiego poziomu rzędu 3–7% zawartości wody, a następnie przechowywaniu ich w niskich temperaturach. Dla różnych gatunków roślin opracowane zostały specjalne wzory umożliwiające oszacowanie okresu żywotności nasion w zależności od ich wilgotności oraz temperatury przechowywania, ale dotyczą one głównie gatunków roślin użytkowych (Ellis i Roberts 1980).

Do długotrwałego przechowywania nasion stosuje się zwykle temperatury ujemne poniżej 0°C. Najczęściej używa się do tego celu komór zamrażalniczych lub zamrażarek, w których osiągana jest temperatura około -20°C. Wiele nowoczesnych banków nasion preferuje jednak techniki kriokonserwacyjne z wykorzystaniem ultraniskich temperatur, na przykład ciekłego azotu (-196°C) lub jego par (od -130°C do -160°C). Techniki kriokonserwacyjne w ciekłym azocie w stosunku do standardowego przechowywania w niskich temperaturach rzędu -20°C mają wiele zalet, do których należy zaliczyć: brak wolnej wody w tkance, bardzo niska molekularna energia kinetyczna, ekstremalnie wolna dyfuzja, wydłużenie okresu życia nasion przez spowolnienie procesu ich starzenia się, mniejsze ryzyko uszkodzeń przechowywanych zasobów przy braku zasilania elektrycznego oraz niższe koszty przechowywania dla okresu wieloletniego ze względu na zredukowanie konieczności regeneracji żywotności nasion (Stanwood 1985, Eberhart *et al.* 1991, 1995).

Według teoretycznych założeń odpowiednio wysuszone nasiona będzie można przechowywać w temperaturze par ciekłego azotu nawet przez kilkaset lat w stanie ich wysokiej żywotności (Roos *et al.* 1996). Niestety techniki te mogą być stosowane jedynie dla jednej kategorii nasion dobrze znoszących wysusze-

nie i niskie temperatury po angielsku określanych jako *orthodox*, a po polsku jako nasiona typowe lub trwałe (Puchalski 1998). Do tej kategorii nasion zalicza się większość gatunków strefy umiarkowanej. Część roślin ze strefy umiarkowanej oraz wiele gatunków ze strefy tropikalnej tworzy nasiona wrażliwe na wysuszenie poniżej pewnego poziomu oraz o zróżnicowanej tolerancji na chłód. Po angielsku określone zostały one jako kategoria *recalcitrant*, czyli kapryśnych. Po polsku można je określić jako nietypowe lub nietrwałe (Grzesiuk i Górecki 1994, Puchalski 1998). Minimalny poziom uwodnienia nasion dla zachowania ich żywotności różni się bardzo znacznie: od 60% dla *Avicennia marina* do 15–20% dla różnych gatunków tropikalnych i subtropikalnych roślin użytkowych. Znany jest także typ nasion zachowujących się pośrednio po angielsku określany jako *intermediate* o niższej wrażliwości na wysuszenie. Według Honga i Ellisa (1996) nasiona w zależności od możliwości ich długotrwałego przechowywania dzieli się na trzy następujące kategorie:

1. Nasiona typu *orthodox* (czyli typowe lub trwałe) mogące być suszone do poziomu poniżej 10% zawartości wody i przechowywane w niskich temperaturach.
2. Nasiona typu *recalcitrant* (czyli nietypowe lub nietrwałe) wrażliwe na wysuszenie powyżej 15% zawartości wody i o małej tolerancji na niskie temperatury.
3. Nasiona typu *intermediate* (czyli pośrednie) dopuszczające ich wysuszenie do poziomu rzędu 10–12,5% zawartości wody oraz zachowujące tolerancję na obniżenie temperatury.

Do nasion kategorii *recalcitrant* zalicza się większość nasion tworzonych przez gatunki ze strefy tropikalnej oraz gatunki roślin wodnych. Spośród nasion strefy umiarkowanej przykładami tej kategorii są żołędzie różnych gatunków *Quercus* i bukwie *Fagus sylvatica*. Natomiast do nasion typu pośredniego należą na przykład nasiona kakaowca, cytryny, pieprzu czarnego i herbaty chińskiej.

Dla nasion wrażliwych na suszenie koniecznym stało się opracowanie specjalnych technik ich długotrwałego przechowywania. Głównie sto-

suje się tutaj kriokonserwację izolowanych osi zarodkowych oraz zarodków zygotycznych lub somatycznych (Chmielarz 1998, Suszka 2000).

KULTURY *IN VITRO*

Oprócz nasion, ważnym rodzajem plazmy zarodkowej przechowywanej przez banki genów są różne kultury *in vitro* służące do zachowania różnorodności genetycznej gatunków rozmnażających się głównie w sposób wegetatywny, czy też gatunków wieloletnich posiadających długi okres juvenilnego rozwoju oraz wspomnianych już gatunków tworzących nasiona wrażliwe na suszenie. Jako materiał dla kultur *in vitro* służą głównie tkanki merystematyczne, na przykład wierzchołki pędów lub korzenia (Towill 1998). Często stosuje się także przechowywanie w warunkach kriogenicznych pąków śpiących lub kątowych (Stushnoff i Seufferheld 1995).

Do długiego przechowywania kultur *in vitro* w bankach genów stosuje się dwie podstawowe metody: hodowli w warunkach wolnego wzrostu lub w warunkach kriogenicznych (Withers 1991). Techniki kriokonserwacji umożliwiają dłuższe przechowywanie kultur, ale wymagają stosowania odpowiednich metod zabezpieczających komórki przed uszkodzeniem ich w trakcie zamrażania i rozmrażania. Stosuje się różne związki chemiczne, po angielsku określane jako *cryo-protectants*, a po polsku krioprotektory, umożliwiające zapobieganie uszkodzeniu komórek przez tworzący się lód, a z drugiej strony utrzymywanie odpowiedniego ciśnienia osmotycznego we wnętrzu zamrażanych komórek przez zmniejszenie dyfuzji wody z komórki wskutek wzrostu lepkości soku komórkowego (Chmielarz 1998, Puchalski 1998). Należą do nich takie związki jak dwumetylowy tlenek siarki (DMSO), glikole polietylenowy i propylenowy, gliceryna, sorbitol i inne cukry oraz aminokwasy (głównie prolina).

Aby zmniejszyć ryzyko uszkodzeń w trakcie gwałtownego zamrażania opracowane zostały dwie podstawowe techniki kriokonserwacyjne kultur *in vitro*: zeszklenia (po angielsku *vitrification*) oraz otoczkowania w alginianie wapnia (po angielsku *encapsulation*) (Towill

1996). Stosuje się także różne kombinacje obu technik w zależności od rodzaju tkanki (Ashmore 1997).

OCHRONA RÓŻNORODNOŚCI ROŚLIN RZADKICH I ZAGROŻONYCH

Banki genów tworzone były przede wszystkim do zachowania zasobów genowych roślin użytkowych lub pokrewnych im gatunków dziko rosnących. W ostatnich latach techniki przechowywania plazmy zarodkowej stosowane przez banki genów nabrały dużego znaczenia dla zachowania rzadkich i zagrożonych gatunków flory naturalnej (Frankel *et al.* 1995). Do ochrony *ex situ* takich gatunków stosowana była dotychczas ich uprawa w formie kolekcji żywych roślin (utrzymywanych w gruncie lub też w szklarniach i palmiarniach) prowadzona głównie przez ogrody botaniczne. Do tego typu działalności ogrodów botanicznych opracowywane były specjalne programy (Heywood 1989, Wyse Jackson i Sutherland 2000). W ostatnich latach w wielu ogrodach botanicznych zaczęto tworzyć banki nasion i kultur *in vitro* do ochrony *ex situ* gatunków zagrożonych wymarciem (Laliberté 1997). Można wyliczyć następujące zalety banków nasion i kultur *in vitro* w stosunku do kolekcji żywych roślin:

- mniejsze ryzyko zmian genetycznej populacji spowodowanych przez mutacje, rekombinację lub selekcję naturalną i dryft genetyczny,
- większe bezpieczeństwo materiału przez brak ryzyka uszkodzenia roślin przez choroby, szkodniki, zwierzęta lub czynniki pogodowe,
- możliwość utrzymywania w małej objętości dużej liczby osobników, zapewniająca lepszą reprezentatywność genetyczną prób oraz eliminująca ryzyko dryftu genetycznego,
- relatywnie mniejsze koszty utrzymywania kolekcji kalkulowane dla długich okresów przechowywania,
- możliwość zachowania materiału genetycznego przez bardzo długi okres szacowany nawet na kilkadziesiąt lat w przypadku nasion i tkanek przechowywanych w warunkach kriogenicznych.

Przy przechowywaniu nasion roślin dziko rosnących próbuje się adoptować zwykle techniki stosowane przez banki genów dla roślin użytkowych. Okazało się jednak, iż rośliny dziko rosnące odznaczają się inną i mocno zróżnicowaną biologią swoich nasion. Biologia nasion flory naturalnej jest raczej słabiej poznana niż dla gatunków roślin użytkowych i dlatego przy kielkowaniu i długotrwałym przechowywaniu nasion takich roślin napotyka się na wiele trudności. Przede wszystkim nasiona gatunków roślin występujących w stanie naturalnym są znacznie trudniejsze do zbioru ze względu na bardzo nierównomierne ich dojrzewanie. Bardzo często gatunki dziko rosnące tworzą nasiona ulegające spoczynkowi bezwzględному, co może przysparzać dodatkowych kłopotów w trakcie ich kielkowania i wymaga stosowania odpowiednich technik do przerywania spoczynku.

Jak już wspomniano, banki nasion i kultur *in vitro* zostały zorganizowane w wielu ogrodach botanicznych na świecie. Największy na świecie taki bank genów dla flory naturalnej jest obecnie w końcowym stadium realizacji w Wielkiej Brytanii (Linington 1997). Powstaje on jako oddział Królewskiego Ogrodu Botanicznego Kew w Wakehurst Place w hrabstwie Sussex. Nazwany został Milenijnym Bankiem Nasion lub Arką Nowego XXI Wieku. Zakłada się, że znajdzie się w nim 24 tysiące próbek nasion, czyli prawie 10% naczyniowej flory światowej, w tym cała flora Wysp Brytyjskich oraz przeważająca część flory światowej obszarów suchych. Ten gigantyczny bank genów został sfinansowany przez rząd Zjednoczonego Królestwa Wielkiej Brytanii i Irlandii Północnej kwotą przekraczającą 80 milionów funtów, pochodzącą z znacznej części z wpływów z narodowej loterii.

W polskich ogrodach botanicznych rośliny rzadkie, chronione i zagrożone gromadzone są głównie jako kolekcje żywych roślin. W Ogrodzie Botanicznym PAN w Warszawie-Powsinie mającym również status Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej, od ponad 10 lat prowadzone są prace nad tworzeniem banku nasion dla zagrożonych, chronionych i endemicznych gatunków flory polskiej (Muranyi *et al.* 1995). Prowadzi się również badania

nad wykorzystaniem kultur *in vitro* do zachowania w warunkach kriogenicznych wybranych gatunków roślin zielnych, na przykład goryczek (Kowalczuk i Rybczyński 1994) oraz paproci (Goller i Rybczyński 1995). Kulturami *in vitro* krajowych gatunków roślin zagrożonych zajmuje się także od wielu lat Ogród Botaniczny Uniwersytetu Wrocławskiego (Kromer *et al.* 2000, Marszał i Kromer 2000).

Wydaje się, że konieczne jest zintensyfikowanie prac nad utworzeniem w Polsce tzw. narodowego banku genów flory rodzimej, w którym umieszczone zostałyby gatunki naszych endemitów oraz wszystkie gatunki flory naczyniowej znajdujące się na Czerwonej Liście Roślin Zagrożonych w Polsce (Zarzycki i Szelaąg 1992).

Do tego typu prac jest już przygotowany bank nasion utworzony w Ogrodzie Botanicznym – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej PAN. Bank ten został wyposażony w urządzenia do kielkowania nasion w kontrolowanych warunkach oraz w komory zamrażalnicze mogące utrzymywać temperaturę do -40°C . Posiada także unikatowe zestawy tanków i termosów do przechowywania nasion i tkanek w ciekłym azocie. Dla około 60 gatunków opracowana została także metodyka kielkowania i bezpiecznego zamrażania nasion. Badania te wykonuje się według podanego obok schematu.

Pierwszym etapem jest zbiór nasion z naturalnych stanowisk zapewniający ich właściwą reprezentatywność. Stosuje się tutaj zasady opracowane przez Center for Plant Conservation (1991) w Stanach Zjednoczonych Ameryki:

1. Dla każdego gatunku wybiera się 1–5 naturalnych populacji, przy czym stosuje się następującą zasadę: gdy występuje 1–3 populacji gatunku, to zbioru dokonuje się ze wszystkich, dla gatunku reprezentowanego przez 4–5 populacji wybiera się losowo 3 populacje, a w przypadku liczebności populacji większej niż 5 do zbioru pobierane są nasiona z co najmniej 5 populacji.
2. Dla każdej populacji zbioru dokonuje się z 10–50 osobników (dla gatunków obcopolnych zawsze nie mniej niż 50 osobników).
3. Dla każdego osobnika powinno się zbierać 1–20 nasion (lub innych diaspór).

METODYKA KRIOGENICZNEGO PRZECHOWYWANIA NASION

ZBIÓR Z NATURALNYCH STANOWISK

1-5 populacji

WYŁUSKIWANIE I CZYSZCZENIE NASION

SUSZENIE NAD ŻEŁEM KRZEMIONKOWYM

1-6 miesięcy do 7-10% zawartości wody

TEST KIEŁKOWANIA

STRATYFIKACJA

4 tyg. w 3°C w ciemności

DEZYNFEKCJA

1' 70% Et-OH
10' 2 % chloramina

KIEŁKOWANIE

- a) sterylna H₂O
- b) 0,2% KNO₃
- c) 400 mg/l GA₃

10 tygodni
temperatura:
25°C dzień (16 h)
15°C noc (8h)
wilgotność powietrza 90%

TEST ZAMRAŻANIA

Przy użyciu komputerowo
Programowanego aparatu Nicol LM10

Zakresy szybkości zamrażania

- a) bezpośrednie zamrażanie
w LN₂
5' w -196°C
- b) 0,7°C/min.
-22°C → LN₂
- c) 1,0°C/min.
-40°C → LN₂

DŁUGOTRWALE PRZECHOWYWANIE W PARACH CIEKŁEGO AZOTU
(ok. -150°C)

Tak zebrane nasiona są następnie wyluskiwane i czyszczone. Kolejnym etapem jest ich suszenie. Wykonuje się to w szklanych eksykatorach nad żelem krzemionkowym. Po 1-6 miesięcy takiego przechowywania nasiona osiągną zwykle 7-10% zawartości wody. Następnie nasiona poddaje się równolegle dwóm testom: kiełkowania i zamrażania. Najpierw nasiona są stratyfikowane w ciemności przez 4 tygodnie w temperaturze 3°C, a następnie po dezynfekcji w 70% etanolu lub 2% roztworze chlorominy poddaje się kiełkowaniu w kontro-

lowanych warunkach temperatury i wilgotności z wykorzystaniem substancji powodujących przerywanie spoczynku nasion: 0,2% roztworze KNO₃ lub roztworze GA₃ w stężeniu 400 mg/l. Tak przeprowadzony test pozwala na określenie optymalnych warunków kiełkowania badanych nasion.

Test zamrażania służy określeniu tempa bezpiecznego zamrażania nasion. Opisana metodyka badania nasion została opracowana przez mgr Romana Muranyi'ego (dane nie publikowane).

Nasiona oceniane przy pomocy obu testów są następnie umieszczane w probówkach kriogenicznych i przechowywane w parach ciekłego azotu w temperaturze około -150°C . Zakładamy, że nasiona w tych warunkach zachowują swą żywotność nawet przez okres ponad 100 lat. Ocenę żywotności nasion przy pomocy testu kiełkowania wykonuje się co 5 lat.

SUMMARY

Ex situ conservation is an alternative method for preservation of rare and endangered plant species. Botanical gardens always played an active role in the conservation of many plants species, as well as *in situ* and *ex situ* conditions, however the main conservation method was the cultivation of endangered plants as living plants collections. Presently the methods used by genebanks for crop germplasm were adopted and in many botanical gardens in the world the seed and *in vitro* banks were organized. Especially the long-term seed storage might be used for genetic diversity conservation. Usually the seeds called *orthodox* are dried up to 3–7% moisture contents and later stored in low (ca. -20°C) or in ultralow (in liquid nitrogen -196°C) temperatures. Especially the cryogenic seed storage in the vapour of liquid nitrogen is very efficient for the conservation purposes of rare and endangered plants. Also this technique is used for Polish vascular plants conservation in the Botanical Garden – Center for Biological Diversity Conservation of the Polish Academy of Sciences in Warsaw.

LITERATURA

- Ashmore S. E., 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. Int. Plant Genetic Resources Inst., Rome, Italy: 67 ss.
- Bauer B., Schmid B., 1996. Spatial and temporal patterns of genetic diversity within species. W: Biodiversity. A biology of numbers and difference. K. J. Gaston (red.). Blackwell Sci. Publ., Oxford: 169–201.
- Center for Plant Conservation, 1991. Appendix. Genetic sampling guidelines for conservation collections of endangered plants. W: Genetics and conservation of rare plants. D. A. Falk i K. E. Holsinger (red.). Oxford Univ. Press, New York & Oxford: 225–238.
- Chmielarz P., 1998. Reakcja roślin na niskie temperatury. Metody kriokonserwacji komórek i organów roślin w ciekłym azocie. Wyd. Z. Bartkowiak, Poznań: 48 ss.
- Connor K. F., Towill L. E., 1993. Pollen – handling protocol and hydration/dehydration characteristics of pollen for application to long-term storage. Euphytica. 68: 77–84.
- Eberhart S. A., Roos E. E., Towill L. E. 1991. Strategies for long-term management of germplasm collections. W: Genetics and conservation of rare plants. D. A. Falk i K. E. Holsinger (red.). Oxford Univ. Press, New York & Oxford: 135–145.
- Eberhart S. A., Vertucci C. W., Roos E. E., Towill L. E., Stanwood P. C. 1995. *Ex situ* conservation of plant genetic resources. W: Proc. High Altitude Revegetation Workshop No. 11. 16–17.03.1994. Colorado Water Resources Res. Inst., Colorado State Univ., Fort Collins, CO: 227–243.
- Ellis R. H., Roberts E. H., 1980. Improved equations for the prediction of seed longevity. Ann. Bot. 45: 13–30.
- Frankel O. H., Brown A. H. D., Burdon J. J., 1995. The conservation of plant biodiversity. Cambridge Univ. Press, Cambridge: 299 ss.
- Goller K., Rybczyński J. J., 1995. In vitro culture used for woody fern *Cyathea australis* (R. Br.). Dominant vegetative propagation. Acta Soc. Bot. Pol., 64: 13–17.
- Górecki R. J., Kulka K., Puchalski J., 1999. Mechanizm starzenia się nasion w aspekcie ich długiego przechowywania. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 463: 191–209.
- Grzebiuk S., Górecki R. J. (red.), 1994. Fizjologia plonów. Wprowadzenie do przechowywania. Wyd. Akad. Roln.-Techn., Olsztyn: 374 ss.
- Harrington J. F., 1973. Problems of seed storage. W: Seed Ecology. W. Heydecker (red.). Butterworths, London: 251–262.
- Heywood V. H., 1989. The botanic gardens conservation strategy. IUCN Bot. Gardens Conserv. Secretariat, Kew, Richmond: 60 ss.
- Heywood V. H., Baste I., 1995. Introduction. W: Global Biodiversity Assessment. V. H. Heywood i R. T. Watson (red.). Cambridge Univ. Press, Cambridge: 5–19.
- Hong T. D., Ellis R. H., 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. IPGRI Technical Bull. No. 1, Int. Plant Genetic Resources Inst., Rome, Italy: 62 ss.
- Kowalczyk A., Rybczyński J. J., 1994. Przechowywanie tkanek roślinnych w temperaturze ciekłego azotu. Prace Ogr. Bot. PAN. Seria: Konferencje. Warszawa – Powsin, 5/6: 139–145.

- Kromer K., Nowak T., Wojtuń B., Poturała D.**, 2000. Rozmnażanie w warunkach *in vitro* populacji roślin *Drosera intermedia* pochodzących z Gór Izerskich. Biul. Ogr. Bot., Muzeów i Zb., 9: 147-152.
- Laliberté B.**, 1997. Botanic garden seed banks/genebanks worldwide, their facilities, collections and network. Bot. Gard. Conserv. News, 2(9): 18-23.
- Linington S. H.**, 1997. The Millenium Seed Bank Project. Bot. Gard. Conserv. News, 2 (9): 34-35.
- Marszał J., Kromer K.**, 2000. Zastosowanie kultur *in vitro* w ochronie rzadkich i ginących gatunków paproci serpentynitowych. Biul. Ogr. Bot., Muzeów i Zb., 9:141-146
- Muranyi R., Niedzielski M., Puchalski J.**, 1995. Ochrona roślin zagrożonych flory Polski w bankach nasion – w ultraniskich temperaturach. Biul. Ogr. Bot., Muzeów i Zb., 4: 65-70.
- Puchalski J.**, 1993. Izoenzymy jako markery zmian genetycznych w siewkach żyta wywołanych przechowywaniem i regeneracją ziarniaków. Prace Ogr. Bot. PAN. Seria: Monografie i Rozprawy, Warszawa-Powsin. 4: 87 ss.
- Puchalski J.**, 1998. Długotrwale przechowywanie plazmy zarodkowej roślin użytkowych – metody i problemy. Zesz. Post. Probl. Post. Nauk Roln., 463: 211-233.
- Rauer G., Ibisch P. L., von den Driesch M., Lobin W., Bartholt W.**, 2000. The Convention on Biodiversity and Botanic Gardens. W: Botanic Gardens and Biodiversity. Fed. Agency for Nature Conservation, Bonn: 25-68.
- Roos E. E.**, 1988. Genetic changes in a collection over time. HortScience, 23: 86-90.
- Roos E. E., Towill L. E., Walters C. W., Blackman S. A., Stanwood P. C.**, 1996. Preservation techniques for extending the longevity of plant tissues. W: Sampling the green world. innovative concepts of collection, preservation, and storage of plant diversity. T. F. Stuess i S. A. Sommer (red.). Columbia Univ. Press, New York: 157-204
- Stanwood P. C.**, 1985. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. W: Cryopreservation of plant cells and organs. K. K. Kartha (red.). CRC Press, Boca Raton, FL: 199-226.
- Stushnoff C., Seufferheld M.**, 1995. Cryopreservation of apple (*Malus* species) genetic resources. W: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Y. P. S. Bajaj (red.). Vol. 32. Cryopreservation of Plant Germplasm I. Springer Verlag, Heidelberg: 87-101.
- Suszka B.**, 2000. Nowe technologie i techniki w nasiennictwie leśnym. Bogucki Wyd. Nauk., Poznań: 270 ss.
- Towill L. E.**, 1988. Genetic considerations for germplasm preservation of clonal material. HortScience 23: 91-95.
- Towill L. E.**, 1996. Vitricification as a method to preserve shoot tips. W: Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. D. J. Gray i R. N. Trigiano (red.).CRC Press, Boca Raton, FL: 297-304.
- Withers L. A.**, 1991. In-vitro conservation. Biol. J. Linn Soc. (London), 43: 31-42.
- Wyse Jackson P. S., Sutherland L. A.**, 2000. International Agenda for Botanic Gardens in Conservation. Bot. Gardens Conserv. Int., Kew, UK: 56 ss.
- Zarzycki K., Szelaż Z.**, 1992. Czerwona lista roślin naczyniowych zagrożonych w Polsce. W: Lista Roślin Zagrożonych w Polsce. K. Zarzycki, W. Wojewoda, Z. Heinrich (red.). Wyd. 2, Instytut Botaniki PAN, Kraków: 87-98.