

Penyimpanan dan Regenerasi Pule Pandak melalui Kultur *In Vitro*

Ragapadmi Purnamaningsih dan Endang Gati

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

ABSTRAK

Pule pandak atau akar tikus (*Rauvolfia serpentina*) termasuk dalam kelompok tumbuhan obat langka yang mulai kritis keberadaannya. Kegunaannya sebagai obat penurun panas, penurun tekanan darah tinggi, radang jantung, dan radang usus. Untuk membantu konservasi tumbuhan obat langka tersebut telah dilakukan percobaan penyimpanan dan regenerasinya melalui kultur *in vitro*. Adapun media dasar yang digunakan adalah Monier dan ½ Monier yang dikombinasikan dengan zat pengatur tumbuh paclobutrazol (0, 1, 3, dan 5 mg/l) dan ancymidol (0; 0,5; 1,0; dan 1,5 mg/l). Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap yang disusun secara faktorial dengan 10 ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa setelah disimpan selama 6 bulan, pada perlakuan media dasar Monier dan ½ Monier dengan penambahan paclobutrazol (1, 3, dan 5 mg/l) tidak menunjukkan penghambatan terhadap pemanjangan tunas. Sedangkan penambahan ancymidol (0,5; 1,0 dan 1,5 mg/l) menunjukkan adanya penghambatan terhadap panjang tunas yang nyata. Tunas paling pendek diperoleh dari perlakuan ½ Monier + ancymidol 1,0 mg/l dan Monier + ancymidol 1,0 mg/l. Selain itu dengan menggunakan media Monier + ancymidol 1,0 mg/l ruas batang memendek, daun yang terbentuk kecil dan tidak terbentuk akar. Pada perlakuan ½ Monier + ancymidol 1,0 mg/l ruas batang memendek, daun yang dihasilkan lebar dan berwarna hijau mengkilat serta terbentuk akar yang tebal dan panjang. Setelah masa simpan enam bulan (tanpa pembaharuan) biakan dari media Monier + ancymidol 1 mg/l dapat tumbuh cepat pada media perbanyakan dengan faktor multiplikasi yang tinggi yaitu 16. Sedangkan planlet yang langsung diaklimatisasi di rumah kaca dapat tumbuh tanpa menunjukkan adanya penyimpangan dalam penampakannya.

Kata kunci: Pule pandak, *Rauvolfia serpentina*, kultur *in vitro*, regenerasi, aklimatisasi.

ABSTRACT

Pule pandak or so called mouse tail (*Rauvolfia serpentina*) belongs to the rare medicinal plants whose existence is in critical condition. Pule Pandak is used as a medicine to relieve fever, cure hypertension, heart and intestine inflammations. The research was conducted to help conserving the rare medicinal plant. The basic medium used in this research was Monier and ½ Monier combined with growth regulator paclobutrazol (0,1,3, and 5 mg/l) and ancymidol (0, 0.5, 1.0, and 1.5 mg/l). The research used a completely randomized block design which was arranged factorially with 10 replications. The research results indicated that the cultures stored in the basic medium Monier and ½ Monier with paclobutrazol (1, 3, and 5 mg/l) for 6 months had no inhibitions in shoot growth. While the cultures stored in the medium added with ancymidol (0.5, 1.0, and 1.5 mg/l) had significant inhibitions in shoot growth. The shortest shoots were obtained from the treatment of ½ Monier + ancymidol 1.0 mg/l and Monier + ancymidol 1.0 mg/l. In addition, the medium Monier + ancymidol 1.0 mg/l produced shorter internodes, small leaves, and no roots. The treatment of ½ Monier + ancymidol 1.0 mg/l produced shorter

internodes, wide leaves with bright green colour, and long thick roots. After being stored for 6 months (without regeneration), the cultures grown in the medium Monier + ancymidol 1 mg/l grew fast on the multiplication media with high multiplication factor, i.e. 16. While the plantlets which were acclimatized in the glass house grew well without any changes in their performance.

Key words: Pule Pandak, *Rauvolfia serpentina*, *in vitro* culture, regeneration, acclimatization.

PENDAHULUAN

Pule pandak atau akar tikus (*Rauvolfia serpentina*) termasuk dalam tumbuhan obat langka yang mulai kritis keberadaannya (Amzu, 1990). Kegunaannya antara lain sebagai obat penurun panas, penurun tekanan darah tinggi, radang jantung, dan radang usus.

Pemanfaatan tumbuhan sebagai bahan obat terus meningkat, sampai saat ini sebagian besar bahan baku tumbuhan obat masih dipanen dari alam. Di lain pihak, kebutuhan akan bahan baku terus meningkat, seiring dengan kembalinya masyarakat memanfaatkan tumbuhan sebagai bahan baku obat alami. Apabila upaya budi daya, pelestarian serta pemanfaatannya tidak diperhatikan, dikhawatirkan akan terjadi kekurangan bahan baku dan bahkan akan terjadi kepunahan spesies tumbuhan tertentu (Amzu, 1990). Rifai (1986) menyatakan bahwa tumbuhan obat di Indonesia merupakan kelompok komoditas pertanian yang erosi genetiknya berlangsung sangat cepat. Pelangkaan yang sangat cepat tersebut terjadi karena pengurusan bahan tanaman obat dari hutan belantara karena ketergantungan industri jamu.

Untuk menangani masalah tersebut, diperlukan usaha-usaha pembudidayaan dan pelestarian tanaman obat langka baik secara *ex situ* maupun *in situ*. Penyimpanan *ex situ* dapat dilakukan baik secara konvensional maupun melalui kultur jaringan yang telah banyak digunakan untuk penyimpanan berbagai tanaman. Nitché (1983) menyatakan bahwa melalui kultur *in vitro*, biakan dapat disimpan dalam waktu lama dan dapat diperbanyak secara cepat bila sewaktu-waktu diperlukan.

Penyimpanan melalui kultur *in vitro* dapat dilakukan antara lain dengan cara pertumbuhan minimal/pertumbuhan lambat. Menurut Wattimena (1988) di Indonesia dengan jenis-jenis tanaman tropis lebih baik dilakukan dengan cara pertumbuhan minimal. Penyimpanan melalui cara tersebut dapat dilakukan dengan menggunakan senyawa retardan seperti ancymidol dan paclobutrazol (Wattimena, 1988), penyimpanan dalam suhu rendah (Hu dan Wang, 1983; Van de Houwe *et al.*, 1995), pengaturan osmotik media dengan manitol (Withers, 1985) dan pengenceran media dari formulasi dasar (Taylor dan Dukié, 1993). Kombinasi dari faktor-faktor tersebut umumnya memberikan hasil yang lebih baik. Hasil penelitian Gati *et al.* (1994) pada tanaman pule pandak menunjukkan bahwa media $\frac{1}{2}$ MS dengan paclobutrazol 5 mg/l menghambat pertumbuhan tunas sampai dengan minggu ke-12.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan metoda penyimpanan *in vitro* yang terbaik tanpa menurunkan daya tumbuh biakan, dengan pengujian secara *in vitro* atau langsung diaklimatisasi.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan dari bulan Juli 1996 sampai Februari 1997.

Sebagai sumber bahan tanaman digunakan biakan *in vitro* dengan tunas terminal sebagai eksplan yang akan disimpan. Tunas tersebut berukuran ± 1 cm dengan jumlah daun sebanyak dua.

Media dasar yang digunakan adalah garam-garam mineral dari Monier (Tabel 1). Ke dalam media dasar tersebut diberi paclobutrazol atau ancymidol. Media dibuat padat dengan penambahan agar gellrite 2,5 g/l dengan pH 5,8. Eksplan yang sudah ditanam pada media perlakuan kemudian diletakkan pada ruang kultur dengan intensitas penyiaran sebesar 1000 lux dan lama penyiaran 16 jam dalam sehari.

Tabel 1. Komposisi media dasar Monier

Garam mineral	Konsentrasi
Garam makro	-mg/l-
KNO ₃	1.900
NH ₄ NO ₃	990
CaCl ₂ ·2H ₂ O	484
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	407
KH ₂ PO ₄	187
KCl	420
Garam mikro	
MnSO ₄ ·H ₂ O	33,6
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	21,0
H ₃ BO ₃	12,6
KI	1,66
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,5
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,05
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,05
ZnSO ₄ ·5H ₂ O	-
Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ ·H ₂ O	27,8
Vitamin	
Myoinositol	0,1
Thiamin	-
Nicotinic	-
Pyridoxin	-

Perlakuan yang diuji terdiri dari 2 faktor. Faktor pertama adalah konsentrasi media dasar, yaitu (Monier dan $\frac{1}{2}$ Monier) dan faktor kedua adalah senyawa retardan paclobutrazol (0, 1, 3, dan 5 mg/l) dan ancymidol (0; 0,5; 1,0; dan 1,5 mg/l). Perlakuan disusun secara faktorial dalam rancangan lingkungan acak lengkap dengan 10 ulangan. Parameter yang diamati adalah jumlah dan panjang tunas, jumlah daun, jumlah akar, panjang akar, dan keadaan visual biakan.

Untuk menguji daya tumbuh setelah penyimpanan selama enam bulan biakan dikulturkan pada media MS + BA 0,8 mg/l. Di samping pengujian secara *in vitro* sebagian planlet langsung ditumbuhkan di rumah kaca.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebelum penelitian penyimpanan *in vitro* telah dilakukan percobaan perbanyakan untuk mendapatkan faktor multiplikasi yang tinggi. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa faktor perbanyakan tertinggi diperoleh dari media MS + BA 0,8 mg/l. Dari perlakuan tersebut jumlah tunas yang dihasilkan sebanyak 14,17 (Deliah *et al.*, 1994). Setelah metoda perbanyakannya diperoleh maka pada langkah selanjutnya dilakukan kegiatan penyimpanan melalui cara pertumbuhan minimal.

Jumlah dan Panjang Tunas

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa setelah disimpan selama enam bulan terlihat adanya pengaruh interaksi antara pengenceran media dan senyawa retardan terhadap pertumbuhan kultur. Tabel 2 menunjukkan bahwa pada umumnya penggunaan senyawa retardan (paclobutrazol atau ancymidol) dapat menghambat pembentukan tunas. Jumlah tunas terbanyak yaitu sebanyak 2,33 dihasilkan dari perlakuan $\frac{1}{2}$ Monier + paclobutrazol 5 mg/l yang tidak berbeda nyata dengan Monier + ancymidol (0,5 dan 1,0 mg/l). Kombinasi media yang miskin akan mineral dengan senyawa retardan dapat menghambat pertumbuhan biakan. Tanpa penambahan paclobutrazol atau ancymidol, proses multiplikasi tidak terjadi baik pada media Monier maupun $\frac{1}{2}$ Monier. Kemungkinan media dasar Monier mempunyai kandungan NH_4^+ yang rendah. Di samping itu, kandungan senyawa organik (vitamin) hanya myoinositol saja. Hasil penelitian Mariska dan Sukmadjaja (1987) pada tanaman panili menunjukkan pula bahwa penggunaan media dasar yang miskin akan garam mineral dapat menekan pertumbuhan jaringan tanaman.

Dengan pertumbuhan tunas yang lambat diharapkan dapat memperpanjang masa simpan yang dapat mengurangi pembaharuan secara periodik. Cara penyimpanan dalam keadaan tumbuh pada media perbanyakan umumnya memerlukan subkultur dengan frekuensi tinggi sehingga peluang terjadinya kontaminasi meningkat, di samping memerlukan tenaga yang lebih intensif.

Tabel 2. Pengaruh interaksi pengenceran media dan senyawa retardan terhadap jumlah tunas dan panjang tunas, umur enam bulan.

Perlakuan (mg/l)	Rata-rata		Visual biakan
	Jumlah tunas	Panjang tunas	
Monier	1,0 ^c	1,15 ^{de}	ruas batang normal
Monier ½	1,0 ^c	2,99 ^c	ruas batang normal
Monier + Paclo 1	1,0 ^c	2,15 ^{cde}	ruas batang normal
3	1,0 ^c	2,18 ^{cde}	ruas batang normal
5	1,0 ^c	2,64 ^{bcd}	ruas batang agak pendek
½ Monier + Paclo 1	1,0 ^c	7,72 ^a	ruas batang normal
3	1,0 ^c	3,0b ^c	ruas batang normal
5	2,33 ^a	1,23 ^{de}	ruas batang agak pendek
Monier + Ancy 0.5	1,67 ^{abc}	0,88 ^e	ruas batang pendek
1,0	2,0 ^{ab}	0,80 ^e	ruas batang pendek
1,5	1,5b ^c	0,83 ^e	ruas batang pendek
½ Monier + Ancy 0.5	1,0 ^c	1,38 ^{cde}	ruas batang pendek
1,0	1,0 ^c	0,85 ^e	ruas batang pendek
1,5	1,0 ^c	1,02 ^{de}	ruas batang pendek

Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada satu kolom, tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT 5%

ancy = ancymidol, paclo = paclobutrazol

Dari Tabel 2 terlihat pula bahwa tunas terpanjang yaitu 7,72 cm diperoleh dari perlakuan ½ Monier + paclobutrazol 1 mg/l sedangkan tunas terpendek yaitu 0,80 cm berasal dari perlakuan Monier + ancymidol 1 mg/l. Data tersebut menunjukkan bahwa penggunaan retardan paclobutrazol lebih menghambat kearah proses multiplikasi tunas daripada proses pemanjangan. Berbeda dengan penggunaan ancymidol di samping menghambat pembentukan tunas ganda juga menghambat pemanjangan tunas. Sejalan dengan hasil penelitian Gati dan Yelnitis (1995) pada tanaman pulasari pemakaian ancymidol menghambat pembentukan dan pemanjangan tunas.

Secara visual terlihat bahwa dengan penambahan ancymidol, maka ruas antar-buku tampak pendek dan batangnya lebih tebal. Menurut Cathey (1975) zat penghambat tumbuh dapat menghambat pemanjangan ruas batang. Nampaknya penambahan ancymidol pada media Monier lebih efektif untuk menghambat pertumbuhan tunas pule pandak.

Tabel 3. Pengaruh zat penghambat (paclobutrazol dan ancymidol) terhadap jumlah daun, umur enam bulan.

Zat penghambat	Rata-rata jumlah daun	Visual daun
Kontrol	8,32 ^{cd}	Hijau tua, lebar, tebal
Ancymidol 0,5	14,71 ^a	Hijau tua, lebar, tebal
1,0	11,75 ^b	Hijau tua, lebar, tebal
1,5	12,03 ^b	Hijau tua, lebar, tebal
Paclobutrazol 1	7,38 ^d	Hijau, sempit
3	9,08 ^{cd}	Hijau, sempit
5	7,20 ^d	Hijau, sempit

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada satu kolom, tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT 5%

Jumlah Daun

Hasil uji statistik pada penyimpanan enam bulan menunjukkan bahwa pembentukan daun tidak dipengaruhi oleh konsentrasi media dasar (Monier dan ½ Monier) tetapi dipengaruhi oleh konsentrasi retardan (paclobutrazol dan ancymidol) (Tabel 3). Daun terbanyak yaitu 14,71 diperoleh dengan penambahan ancymidol 0,5 mg/l, sedangkan daun paling sedikit dihasilkan dari media dengan paclobutrazol 1 dan 5 mg/l. Umumnya biakan yang disimpan pada media dengan ancymidol mempunyai daun yang lebih banyak dari paclobutrazol. Secara visual terlihat pula daun yang terbentuk lebih tebal, lebih lebar, dan warnanya lebih hijau, serta tangkai daunnya lebih pendek.

Jumlah dan Panjang Akar

Pengaruh pengenceran media dan pemakaian zat penghambat terhadap pertumbuhan akar dapat dilihat pada Tabel 4. Pada tabel tersebut tampak bahwa akar terbanyak yaitu 4,83 diperoleh dari perlakuan ½ Monier dengan penambahan ancymidol 1,5 mg/l. Penggunaan media dasar Monier yang dikombinasikan ancymidol (0; 0,5; 1,0; dan 1,5 mg/l) tidak dapat membentuk akar. Pada perlakuan pengenceran medium ½ dari formulasi dasar ditambah ancymidol menghasilkan akar yang paling banyak. Nampaknya ancymidol dalam jaringan pule pandak lebih efektif menghambat biosintesa GA₃. Di samping itu, pengenceran media mengurangi kandungan ion terutama NH₄⁺ sehingga pengaruh kedua faktor di atas lebih memacu pembentukan akar yang lebih banyak.

Tabel 4. Pengaruh interaksi pengenceran media dan senyawa retardan terhadap jumlah akar dan panjang akar, umur enam bulan.

Perlakuan (mg/l)	Rataan jumlah akar	Panjang akar	Visual akar
Monier	0,0 ^d	0,0 ^c	-
Monier ½	0,42 ^c	4,5 ^b	-
Monier + Paclo 1	0,0 ^d	0,0 ^c	-
3	0,5 ^c	0,5 ^c	halus
5	0,0 ^d	0,0 ^c	-
½ Monier + Paclo 1	3,25 ^{ab}	1,5 ^{bc}	halus
3	0,0 ^d	0,0 ^c	-
5	0,0 ^d	0,0 ^c	-
Monier + Ancy 0.5	0,0 ^d	0,0 ^c	-
1,0	0,0 ^d	0,0 ^c	-
1,5	0,0 ^d	0,0 ^c	-
½ Monier + Ancy 0,5	4,00 ^a	7,50 ^a	tebal
1,0	4,17 ^a	6,00 ^a	tebal
1,5	4,83 ^a	5,90 ^a	tebal

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada satu kolom, tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT 5%

Uji Pertumbuhan *In Vitro* dan Aklimatisasi Planlet

Untuk menguji daya tumbuh biakan setelah penyimpanan maka dilakukan pemindahan pada media baru untuk multiplikasi tunas yaitu MS + BA 0,8 mg/l, dan sebagian diaklimatisasi di rumah kaca. Biakan yang berasal dari perlakuan penyimpanan dengan ancymidol terlebih dahulu dipindahkan pada media regenerasi. Tindakan tersebut dilakukan karena terlihat adanya penghambatan pertumbuhan yang nyata sehingga dikhawatirkan apabila langsung diaklimatisasi biakan akan sulit beradaptasi dengan lingkungan yang baru. Sedangkan pada perlakuan dengan paclobutrazol, pertumbuhannya (terutama kearah pemanjangan) tidak terlalu terhambat dan ruas batangnya normal, maka biakan yang telah berakar langsung diaklimatisasi.

Pada Tabel 5 terlihat bahwa setelah masa simpan enam bulan, biakan dari perlakuan Monier + ancymidol (0,5; 1,0; dan 1,5 mg/l) pada media perbanyakan dapat tumbuh cepat dan ruas batang yang semula pendek, kembali normal. Dengan demikian perlakuan media penyimpanan tidak mempengaruhi pertumbuhan selanjutnya bila ditumbuhkan kembali pada media perbanyakan. Keadaan tersebut menguntungkan bila sewaktu-waktu diperlukan biakan yang dapat diperbanyak secara cepat. Sedangkan biakan dari perlakuan ½ Monier + ancymidol (0,5; 1,0 dan 1,5 mg/l) pembentukan tunasnya lambat dan pertumbuhannya cenderung kearah pemanjangan. Diduga pengenceran media ½ dari formulasi dasar dengan pengaruh ancymidol mengganggu ratio sitokinin terhadap auksin yang dibutuhkan bagi proliferasi tunas.

Tabel 5. Pertumbuhan biakan pada media regenerasi, setelah penyimpanan umur dua bulan

Perlakuan media penyimpanan	Jumlah tunas	Rataan tinggi tunas	Jumlah daun
-mg/l-		-cm-	
Monier + ancy 0	1	1,40	5,67
0,5	5	1,85	21,33
1,0	16	3,20	77,00
1,5	6,67	2,42	29,67
$\frac{1}{2}$ Monier + ancy 0	8	2,65	36,00
0,5	1	7,04	25,00
1,0	3	9,3	20,00
1,5	1	11,1	26,00

Keterangan : ancy = ancymidol

Pertumbuhan bibit pule pandak yang langsung diaklimatisasi di rumah kaca dapat hidup dan tumbuh dengan persentase tumbuh 100%. Planlet tumbuh dan berkembang tanpa menunjukkan adanya penyimpangan dalam penampakannya. Hal yang menguntungkan pula karena biakan yang telah disimpan dapat langsung diaklimatisasi sehingga memperpendek masa *in vitro*.

KESIMPULAN

Penyimpanan pule pandak dengan cara pertumbuhan minimal selama enam bulan (tanpa pembaharuan) tidak menurunkan daya tumbuh biakan.

Penggunaan media simpan Monier yang mengandung ancymidol 1,0 mg/l cukup efektif untuk menghambat pertumbuhan biakan. Setelah masa simpan selama 6 bulan dapat tumbuh baik pada media perbanyak dengan faktor multiplikasi yang tinggi yaitu 16.

Planlet dari perlakuan penyimpanan $\frac{1}{2}$ Monier yang diberi paclobutrazol 1 mg/l dapat langsung diaklimatisasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Amzu, E. dan Haryanto. 1990.** Pelestarian pemanfaatan tumbuhan obat di Indonesia. Makalah dalam Seminar Nasional Pelestarian Sumber Daya Hutan. Fak. Kehutanan IPB. 31 Mei. Bogor.
- Cathey, H.M. 1975.** Comparative plant growth retarding activities of ancymidol with ACPH Phosfon, Chlormequat and SAPH on ornamental plant spesies. *Hot. Science* 10 (3): 204-216.
- Deliah, S., I. Mariska, dan E. Gati. 1993.** Perbanyakkan tanaman obat langka *Rauwolfia serpentina* melalui kultur jaringan. *Bull. Littri*. 6: 53 - 56.
- Dodds, J.H. 1989.** Biotechnological techniques applied to potato and sweet potato improvement for developing countries. Proceeding of an International Symposium organized by CTA and FAO, 26-30 July. Luxemburg.
- Gati, E., I. Mariska, dan Yelnititis. 1994.** Konservasi *in vitro* tanaman obat langka Pulasari melalui cara pertumbuhan minimal. Makalah dalam Simposium Penelitian Bahan Obat Alam VII. Balitro. 24-25 November. Bogor.
- Hu, C.Y. and P.J. Wang. 1983.** Meristem, shoot tip and bud culture. *In* D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Amiroto. (Eds.). *Techniques for Propagation and Breeding*. Macmillan Publishing. New York. pp. 77-227.
- Mariska, I. dan D. Sukmadjaja. 1987.** Perbanyakkan tanaman vanili melalui kultur jaringan. Edisi khusus. *Litro*. III (2): 84 - 88.
- Nitche, W. 1983.** Germplasm preservation. *In* D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Amiroto. (Eds.). *Techniques for Propagation and Breeding*. Macmillan Publishing. New York. pp. 282-805.
- Taylor, W.J. Paul, and D. Shezana. 1993.** Development of an *in vitro* culture technique for corservation of *Saccharum* spp. hybrid germplasm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34: 217-222.
- Van de Houwe, Ines, K. De Smet, H. Tezanas du Monteel, and R. Swennen. 1995.** Variability in storage potential of banana shoot cultures under medium term storage conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42: 269-274
- Wattimena, G.A. 1988.** Biotek tanaman yang menunjang pertanian dan industri yang tangguh dan berkelanjutan. Makalah dalam Seminar Pengembangan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi untuk Menunjang Pembangunan Pertanian dan Industri yang Tangguh dan Berkelanjutan. IPB. 21-22 September. Bogor.
- Withers, L.A. 1985.** Cryopreservation and storage of germplasm. *In* R.A. Dixon (Ed.). *Plant Cell Culture*. IRL Press. Washington. pp. 169-190.