



III KONGRES
BIOTECHNOLOGII



PRACE PRZEGLĄDOWE

Krioprezewacja jako metoda zachowania zdolności życiowych komórek i tkanek roślinnych

Anna Mikuła

Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej,
Polska Akademia Nauk, Warszawa

Cryopreservation as a method to facilitate preservation of life capacity of plant cells and tissues

Summary

This paper presents a review of fundamental aspects of plant cryopreservation. Liquid nitrogen has several advantages over storage of vegetatively propagated material under normal low-temperature *in vitro* culture and could also help in preserving genetic biodiversity. Development of efficient cryopreservation protocols based on the induction of tolerance to freezing and/or desiccation is also discussed. Cold and/or preculture acclimatization leads to ultrastructural, physiological and molecular changes in cells and they are important for improving viability after cryopreservation. The application of vitrification-based procedures and ultra-fast freezing/thawing rates could be effective and reliable for wide variety of plant species/ tissues and relatively genotype independent. Majority of papers demonstrate that the liquid nitrogen allows high viability rates and re-growth without a loss of biosynthetic capacity. Up to now, there has been no clear evidence of morphological, cytological or genetic alterations due to cryopreservation.

Adres do korespondencji

Anna Mikuła,
Ogród Botaniczny –
Centrum Zachowania
Różnorodności
Biologicznej,
Polska Akademia Nauk,
ul. Prawdziwka 2,
02-873 Warszawa;
e-mail:
amikula@ob.neostrada.pl

Key words:

cryopreservation, cold and desiccation tolerance, acclimation responses, preservation of regeneration and metabolic competence, genetic stability.

1. Wprowadzenie

Współczesna biotechnologia, poza klasycznym mikrorozmnażaniem, wykorzystywana jest obecnie do modyfikowania genomu roślinnego, w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym.

biotechnologia

2 (81) 41–57 2008

Ściśle kontrolowane warunki kultury *in vitro* i „plastyczność” materiału roślinnego umożliwiają prowadzenie badań podstawowych, dzięki czemu biotechnologia przyczynia się do rozwoju postępu naukowego i pogłębiania wiedzy o wzajemnych oddziaływaniach roślina-środowisko na poziomie komórkowym. Zupełnie nową gałęzią biotechnologii roślinnej, której rozwój wymuszony został destrukcyjnym oddziaływaniem człowieka na środowisko naturalne, jest ochrona bioróżnorodności z wykorzystaniem kultur *in vitro* i przechowywania materiału roślinnego w stanie głębokiego zamrożenia (w -196°C). Obecna wiedza w zakresie krioprezerwacji i opracowane dotychczas techniki (1) pozwalają na zabezpieczanie żywotności i zdolności życiowych gromadzonych w ciekłym azocie komórek i tkanek roślinnych.

Pojęcie „krioprezerwacja” obejmuje następujący zakres czynności: prekulturę materiału roślinnego, jego przedtraktowanie, zamrażanie, kriopzechowywanie i rozmrażanie. Jest to zespół następujących po sobie sekwencji, które promują skuteczne zabezpieczanie materiału roślinnego przed niekorzystnym wpływem stresu dehydratacji, ultraniskiej temperatury i rehydratacji. Zachowaniu wysokiej żywotności i zdolności życiowych komórek i tkanek roślinnych sprzyja indukcja tolerancji mrozowej i/lub desykacyjnej. Dzięki przenoszeniu odporności na niskie temperatury z roślin *in vivo* na tkanki i komórki utrzymywane *in vitro*, ułatwione jest śledzenie mechanizmów tolerancji na stres. Zmiany biochemiczne i fizjologiczne będące następstwem nabywania odporności na mróz, w naturze indukowane krótkim fotoperiodem, temperaturą bliską 0°C i stresem wodnym, w kulturach mogą być skutecznie inicjowane za pomocą prekultury. Egzogennie wprowadzane do pożywki cukry czy ABA znane są jako stymulatory kompleksowej rearanżacji strukturalnej i metabolicznej komórek, sprzyjającej nabywaniu uznawanej obecnie za klucz do efektywnej krioprezerwacji, tolerancji desykacyjnej. U podstaw tego procesu leży natomiast ekspresja odpowiednich genów, których poznanie i izolacja pozwolą na tworzenie nowych, odporniejszych na chłód odmian.

Stworzenie właściwych systemów ochrony komórek przed mrozowymi uszkodzeniami sprzyja nie tylko odzyskiwaniu przez nie pełnej żywotności, ale również zachowaniu ich potencjału morfogenetycznego czy zdolności do produkcji specyficznych substancji. Obecnie można podać wiele przykładów roślin, dla których dzięki wykorzystaniu techniki krioprezerwacji ograniczono koszty i podniesiono bezpieczeństwo długoterminowego utrzymywania materiału roślinnego z pełnym zachowaniem, nabytego przez komórki somatyczne w kulturach *in vitro*, stanu kompetencji.

2. Indukcja tolerancji desykacyjnej kluczem do efektywnej krioprezerwacji

Dla większości gatunków i typów tkanek protokoły krioprezerwacji wymagają indywidualnego dopasowania do naturalnej odporności roślin na mróz czy odwadnianie. Dzięki temu unika się wewnątrzkomórkowej krystalizacji lodu w czasie pro-

cesu mrożenia. Nowoczesne metody krioprezerwacji, takie jak kapsułkowanie (2), witrifikacja (3-5) i metoda kropli (6) dość efektywnie chronią większość wprowadzanego do ciekłego azotu materiału roślinnego. Jednakże dla większości roślin dodatkowe zabiegi w postaci hartowania czy prekultury, dzięki indukowaniu wzrostu tolerancji na stres abiotyczny, znacząco podnoszą żywotność lub wręcz umożliwiają przeżycie po mrożeniu.

W okresie letnim odporność na chłód zarówno zimotrwałych, jak i wrażliwych na mróz gatunków jest do siebie podobna. Naturalna zdolność do przetrwania mrozów, indukowana jesienią krótkim fotoperiodem i temperaturami bliskimi 0°C, jest obecnie wykorzystywana do gromadzenia gatunków oraz mieszańców międzygatunkowych roślin drzewiastych w bankach genów/tkanek np. NCGRP w Fort Collins (USA), NIAR w Yamagata (Japonia) czy Nangis w Montpellier (Francja) (7,8). Pobierane w okresie zimowym pąki spoczynkowe, po 4-6-tygodniowym dosuszaniu w warunkach laboratoryjnych (w temperaturze -5°C, do wilgotności 30%) wprowadzane są bezpośrednio do ciekłego azotu (7). Jest to przykład jednej z najprostszych form krioprezerwacji, bazującej na naturalnie zaindukowanej tolerancji mrozowej. Występujące w naturze zależności pomiędzy odpornością roślin mącznych a tolerancją na mrożenie obserwowano w wyprowadzonych z nich kulturach *in vitro* (9-12). Przeszło 50% aklimatyzowanych przez 14 dni temperaturą 2°C komórek zawieszony linii zimoodpornej lucerny było zdolnych do przetrwania temperatury -15°C, a ok. 30% komórek temperatury -25°C (10). Mrozowa tolerancja hartowanych komórek tej linii wiązała się z 5-krotnym podniesieniem zawartości endogennych cukrów (prosty i dwucukrów) oraz około 3-krotnym wzrostem obecności skrobi. Komórki zawieszinowe lucerny genotypu wrażliwego na chłód, nie przeżywały temperatur poniżej -5°C, a poziom akumulowanych cukrów nie ulegał podniesieniu. Hartowanie obniżoną temperaturą materiału roślinnego wykazującego genetyczną odporność na chłód, pochodzącego z kultur *in vitro*, jest z powodzeniem wykorzystywane w procedurach krioprezerwacji (12-16). Podnoszenie odporności za pomocą aklimatyzacji, nie jest natomiast możliwe u gatunków wrażliwych na chłód. Z tego względu do 1990 r., tj. w czasie stosowania jedynie techniki powolnego schładzania, bazującej na indukcji mrozowej tolerancji, wprowadzanie do LN uorganizowanego materiału roślinnego gatunków klimatu tropikalnego było praktycznie niemożliwe (17). Wraz z wdrażaniem nowych technik ochrony, zmieniły się poglądy dotyczące podstaw udanej krioprezerwacji, której klucza upatruje się obecnie w indukowaniu nie mrozowej, a desykacyjnej tolerancji (18-21). Stopień trudności w jej indukowaniu zależy od naturalnej odporności badanego gatunku na odwadnianie, a sama tolerancja została uznana za cechę prymitywną, przypisywaną filogenetycznemu pochodzeniu roślin (22).

Ekstremalnie wysoka tolerancja desykacyjna, charakterystyczna roślinom określanym jako *resurrection plants*, może dawać dostateczną ochronę w czasie mrożenia (23). W przeprowadzonych przez Burch (24) badaniach nad trzema gatunkami mszaków wykazano prostą zależność wytrzymałości komórek protonemalnych ich game-

tofitów na „otwarte” suszenie (18-dniowe; z utratą wilgotności do 0,02-0,07 g H₂O g⁻¹ suchej masy) i następnie traktowanie ciekłym azotem bez żadnej ochrony. *Bryum rubens* – gatunek tolerujący desykcję był zdolny do przeżycia suszenia i mrożenia odpowiednio w 100 i 90%, *Ditrichum cornubicum* – gatunek o ograniczonej tolerancji przeżywał w 40% suszenie i 20% krioprezechowywanie, natomiast *Cyclodictyon laetevirens* – nietolerujący desykcji zamierał (24). Spośród sześciu gatunków paproci wprowadzonych do ciekłego azotu przez Pence (25), jedynie gametofity trzech, tj. *Davallia fejeensis*, *Adiantum tenerum* i *Drynaria quercifolia* przeżywały 3-godzinne „otwarte” suszenie (do wilgotności 10%) i mrożenie w LN w około 50-60%. Zamknięcie gametofitów w alginianowych kapsułkach zapewniło 100% żywotność po rozmrożeniu wszystkich sześciu badanych gatunków paproci (25).

Większość tkanek roślinnych nie jest jednak zdolna do uzyskania poziomu wilgotności poniżej 30%, wymaganego do zastąpienia procesu krystalizacji lodu, ograniczającym destrukcję komórek zjawiskiem witrifikacji (ang. *glass state* – stan niekrystaliczny zwany też stanem stabilnej szklistości, w którym utrzymane są fizyczne właściwości stanu ciekłego oraz strukturalna i funkcjonalna ciągłość makromolekuł; w naturze występuje w nasionach, pyłku i roślinach typu *resurrection*). Dlatego też w warunkach kultur *in vitro* wykorzystuje się różnego rodzaju traktowania i techniki krioprezerwacji, których wybór zależy od tolerancji badanego gatunku na narastający stres abiotyczny (chłodowy czy desykacyjny), od jego pochodzenia klimatycznego oraz stanu fizjologicznego materiału roślinnego. U roślin posiadających wysoką odporność na stres, „uproszczona krioprezerwacja” może być wystarczająca do zapewnienia wysokiej żywotności (9,26-29). Stożki wzrostu *Humulus lupulus* L. cv ‘Nugget’ należą do nielicznych przykładów materiału roślinnego, który poddany jedynie kapsułkowaniu zdolny jest do przeżycia bezpośredniej dehydratacji osmotycznej 0,75 M lub 1,0 M roztworem sacharozy, z zachowaniem żywotności po dehydratacji powietrznej i mrożeniu na poziomie odpowiednio 80 i 40% (27). Kolejnym przykładem rośliny poddającej się „uproszczonej krioprezerwacji” mogą być pąki kątowe *Gentiana scabra*, których już 13-dniowe traktowanie pożywkami zawierającymi od 0,1 M (11 dni) poprzez 0,4 M do 0,7 M (po 24 h) sacharozy, umożliwiło przeżywanie w 90% „otwartego” suszenia sterylnym powietrzem do wilgotności 10% i bezpośredniego zanurzenia w LN (26). Zamknięcie pąków w alginianowych kapsułkach nie wpływało na ich przeżycie po rozmrożeniu (30). W podnoszeniu tolerancji na mrożenie wielu gatunków roślin, w tym większości gametofitów mchów, wątrobowców (31,32) i paproci (25) decydującą rolę odgrywa kwas abscyzynowy (ABA). Znaczącą rolę tego fitohormonu wykazali Suzuki i wsp. (33). Włączając do prekultury inhibitor syntezy ABA – fluridon autorzy ci doprowadzili do redukcji desykacyjnej tolerancji pąków kątowych *Gentiana scabra*. W przypadku gametofitów paproci *Cibotium glaucum* 7-dniowa prekultura 10 μM ABA indukowała tolerancję na „otwarte” suszenie i mrożenie, podnosząc przeżywalność z 10 do 88% (25). U mszaków, dla uzyskania 100% przeżywalności po rozmrożeniu konieczne było połączenie prekultury ABA z kapsułkowaniem (31). Dla większości roślin prekultura na/w po-

żywkach zawierających podwyższone stężenia sacharozy i/lub ABA, poprzedzająca właściwe traktowanie krioprotektantami lub kapsułkowanie/dehydratację i kolejno mrożenie, jest najczęstszą procedurą postępowania. Przekrój stosowanych dotychczas zróżnicowanych metod indukowania tolerancji desykacyjnej, sposobów przeprowadzania dehydratacji osmotycznej oraz uzyskanej przeżywalności dla 41 różnych gatunków mrożonych z wykorzystaniem techniki kapsułkowania przedstawili w swojej pracy Gonzalez-Arnao i Engelmann (34). Na uwagę zasługuje fakt, że podczas gdy tolerancja desykacyjna bywa indukowana różnymi cukrami (sacharoza, glukoza, fruktoza, trehaloza, laktoza, maltoza, rafinoza) i polihydroksyalkoholami (sorbitol, manitol), to dehydratacja osmotyczna prowadzona jest zawsze na bazie sacharozy (lub roztworów witryfikacyjnych). W dotychczasowych badaniach wskazuje się, że to właśnie sacharoza i glukoza (26,35), a z cukrów alkoholowych sorbitol (36-38) najlepiej indukują tolerancję na odwadnianie. Tempo i czas dehydratacji osmotycznej materiału roślinnego mają znaczący wpływ na uzyskiwanie desykacyjnej tolerancji. W literaturze można znaleźć przykłady pokazujące skuteczność zarówno wielostopniowego, powolnego (30,33,39-41), jak i jednostopniowego (9,12, 27,29,42) odwadniania tkanki. Podobnie jak w okresie zimowym wahania temperatury, tak w prekulturze wahania stężeń osmotikum nie wpływają na rozhartowanie materiału roślinnego. Zaindukowana desykacyjna tolerancja pąków kątowych *Gentiana scabra* była utrzymywana niezależnie od długości trwania prekultury i manipulowania stężeniami sacharozy pod warunkiem użycia tuż przed mrożeniem odpowiednio wysokiej jej koncentracji (33).

U roślin pochodzenia tropikalnego, zwłaszcza gatunków wrażliwych na odwadnianie, krioprezerwacja nie zawsze skutecznie zabezpiecza wszystkie komórki wprowadzanego do LN eksplantatu, czego efektem jest niepożądana zmiana odpowiedzi morfogenetycznej (43-45). Na podstawie lokalizacji obumarłych komórek wskazuje się, że mrożeńowe uszkodzenia są generalnie związane z silniejszą wakuolizacją, wynikającą z morfologicznej budowy badanego materiału roślinnego, np. wierzchołka pędu (46,47). Większa jest również wrażliwość komórek tych roślin na dehydratację w roztworach witryfikacyjnych (np. PVS2). *Musa* spp. i *Ipomea batatas* już po 10-15 min traktowania roztworem PVS2 w temperaturze pokojowej całkowicie tracą żywotność (17), podczas gdy różne kultywary banana w temperaturze 0°C utrzymują ją na wysokim poziomie nawet przez godzinę (20). Jedną z najważniejszych kwestii w krioprezerwacji gatunków tropikalnych oraz wrażliwych na odwodnienie jest indukcja optymalnego stanu fizjologicznego do stymulowania tolerancji na dehydratację i kriogeniczne procedury (17). Realizowana jest ona poprzez prekulturę bazującą na podwyższonych stężeniach sacharozy i równoczesnym wykorzystaniu jednej lub łączeniu ze sobą dwóch lub trzech technik krioprezerwacji (40,44,48,49). Czułość na wysokie stężenia cukrów może być pokonywana przez połączenie kapsułkowania materiału roślinnego ze stopniowym podnoszeniem ciśnienia osmotycznego w pożywce (39,40). Znaczącą rolę w efektywnym mrożeniu roślin tropikalnych przypisuje się podniesieniu tempa schładzania (20). Połączenie

metody kropli z witrifikacją umożliwiło wprowadzenie do LN trzech szczególnie wrażliwych na dehydratację kultywarów banana. Ich przeżywalność i zdolność do regeneracji pędów bez udziału kalusa wynosiła 35-55%. W opracowanym optymalnym protokole unika się prekultury, bazując na: 1) doborze odpowiedniego eksplantatu, 2) bezpośrednim umieszczeniu eksplantatu w roztworze wstępnym, 3) 30 min dehydratacji w PVS2 w temperaturze 0°C, 4) naniesieniu materiału w kropli PVS2 na folię aluminiową i szybkim zamrożeniu, 5) szybkim rozmrożeniu w łaźni wodnej o temperaturze 40°C i 6) wymianie roztworu witrifikacyjnego na roztwór 1,2 M sacharozy (20). Osiągnięcie to, jak się wydaje, może stanowić kolejny przełom w dotychczas ukształtowanym spojrzeniu na szeroko rozumianą krioprezerwację i może otworzyć drogę do upraszczania, unifikacji i upowszechniania wykorzystywania ciekłego azotu również w codziennej pracy biotechnologa.

3. Strukturalna reorganizacja w komórce jako obraz nabywania tolerancji

Hartowanie chłodem (w naturze i *in vitro*) oraz dehydratacja osmotyczna dostarczają bodźca indukującego wielokierunkowe zmiany w metabolizmie komórek, podnoszące w konsekwencji ich tolerancję na desykcję i mrożenie. Redukcja wielkości komórek i ich wakuolizacji, zagęszczenie cytozolu i wzrost zawartości skrobi to wizualny efekt traktowania egzogennymi cukrami czy obniżoną temperaturą (18,50-56).

Zastąpienie dużych wakuol licznymi małymi, zajmującymi o przeszło połowę mniejszą powierzchnię w komórce w stosunku do kontroli, obserwowano już po trzydniowym traktowaniu 6% manitołem agregatów komórkowych *Panicum maximum* (51) czy hartowaniu 0,175 M sacharozą (3 dni) i następnie 0,4 M sorbitolem (24 h) zawiesiny *Oryza sativa* (53). Podobny efekt jest uzyskiwany również w czasie przedłużonej (4-tygodniowej) prekultury agregatów zawiesiny *Gentiana tibetica* pożywką zawierającą 6% sacharozę (55). Wydłużone w czasie traktowanie sprzyja również redukcji wielkości komórek (50). Znaczące zmiany zachodzą także w organizacji innych organelli komórkowych. Prekultura stwarza warunki do eliminowania osmotycznie wrażliwych mitochondriów (53). Przedtraktowanie tkanki manitołem powodowało silne pofałdowanie błon komórkowych oraz formowanie licznych wakuol w obrębie cystern endoplazmatycznego retikulum (ER) (51). Powstawanie pęcherzyków wakuolarnych w cysternach szorstkiego i gładkiego ER obserwowano pod wpływem dwudniowego traktowania zawiesiny *Asparagus officinalis* 0,8 M, plazmolizującym roztworem sacharozy (57), w komórkach merystematycznych banana po traktowaniu 0,4 M roztworem sacharozy (18) oraz zawiesiny *Gentiana tibetica* po prekulturze 0,4 M sorbitolem (55). Poszerzanie się ER i jego wakuolizacja, tworzenie koncentrycznych spirali lub fragmentacja prowadząca od wielowarstwowych cystern do krótkich odcinków, formujących złożone lamelle są postrzegane jako naturalna ochrona przed chłodem (56). Tego typu zmiany kształtów oraz struktury ER,

zauważone były w aklimatyzowanych chłodem komórkach siewek odmiany pszenicy ozimej *Triticum aestivum* (58) oraz komórkach drzew, charakteryzujących się wysoką tolerancją na mróz (59). W efekcie drastycznego deficytu wody zmianie ulegają komponenty lipidowe błon (wzrasta stopień nasycenia kwasów tłuszczowych), prowadząc do jej usztywnienia i ograniczenia przepuszczalności. System przebudowy składu chemicznego błony funkcjonuje u roślin tolerujących odwodnienie. U roślin wrażliwych na desykcję, nie poddanych aklimatyzacji, w konsekwencji wyłączenia białek dochodzi do fuzji membran i tworzenia struktury heksagonalnej. Podczas rehydracji następuje zakłócenie ciągłości błon i wyciek cytoplazmy (60).

W badaniach Pritcharda i wsp. (54,61,62) wskazuje się na istnienie zmienności między gatunkami w ich strukturalnej i fizjologicznej odpowiedzi na te same warunki prekultury. Podczas gdy redukcja przyrostu biomasy i grubości ścian komórkowych była charakterystyczna dla obu zawieszin, klonu i soi, to w badaniach stosunków wodnych wykazano, że komórki klonu są zdolne do większego osmotycznego przystosowania się do stresu ultraniskiej temperatury niż komórki soi.

4. Fizykochemiczne zmiany adaptacyjne komórek w podnoszeniu tolerancji na mrożenie

Odpowiedź roślin na stres abiotyczny uwidacznia się na poziomie fizjologicznym i molekularnym. Hartowanie chłodem prowadzi do mechanicznych ograniczeń, podczas gdy stres suszy zakłóca jonową i osmotyczną równowagę komórek (63). Oba czynniki stresowe aktywując specyficzne geny, które z jednej strony prowadzą do zmian w błonach komórkowych i syntezy substancji osmotycznych, z drugiej zaś do jonowej i osmotycznej homeostazy, indukują tolerancję na desykcję-mrożenie. Szereg zmian rejestrowanych w naturze podczas nabywania tolerancji na stres występuje również w kulturach *in vitro*, a czynniki ją indukujące można wykorzystywać do redukcji mroźniowych uszkodzeń. Dla optymalizowania warunków prekultury i podnoszenia przeżywalności po krioprezerwacji ważne jest poznanie mechanizmów nabywania tolerancji desykacyjnej. Dotychczas w niewielu pracach poruszano kwestie zmian fizjologicznych zachodzących w czasie przedmroźniowych traktowań i ich powiązań z przeżywalnością po krioprezerwacji (16,33,57,64-68). We wczesnych doniesieniach (69,70) przypisuje się podniesienie przeżywalności głównie redukcji wielkości komórek po różnych subkulturach w osmotikum. Obecnie wiadomo już, że nie tylko ilościowa, ale przede wszystkim jakościowa akumulacja specyficznych substancji przyczynia się do podniesienia tolerancji na stres desykcji i mrożenia.

W odpowiedzi na hartowanie/prekultury w komórkach roślinnych pojawia się zdolność do syntezy różnego rodzaju związków organicznych (rozpuszczalnych cukrów, aminokwasów, kwasów organicznych, osmoprotektantów i białek ochronnych), które obniżając potencjał wodny zapobiegają wypływowi wody z komórki,

a także pełnią funkcje ochronne dla białek i błon komórkowych. Zmiany stosunków wodnych w komórkach zawieszinowych *Citrus sinensis* i *Daucus carota* indukowane osmotikum i ABA badał Seijo (66). Po rozpoczęciu prekultury w pożywce zawierającej 0,4 M sacharozę, potencjał wodny komórek i pożywki w ciągu godziny ulegał wyrównaniu, a turgor zanikał. W ciągu 48 h oba parametry były odzyskiwane przez komórki. To wskazuje na występowanie komórkowej osmoregulacji, która jest utrzymywana przez włączanie osmotycznie aktywnych substancji z pożywki (71,72) lub ich syntezie *de novo*. Kiedy zastosowano prekulturę z sacharozą i dodatkowo z ABA, turgor komórek był utrzymany na stałym poziomie, podczas gdy redukcja potencjału osmotycznego i wodnego była obserwowana przez pierwsze cztery dni kultury (66). Prekultura pożywką zawierającą 0,4 M sacharozę i 5,0 mg/l ABA istotnie podnosiła tolerancję komórek zawieszinowych *C. sinensis* i *D. carota* na traktowanie roztworem wiotryfikacyjnym (PVS2) i przechowywanie w ciekłym azocie (66). Podniesienie kriotolerancji tkanki kalusowej *Hevea brasiliensis* możliwe było dzięki obniżeniu stężenia CaCl_2 z 9 mM do 1 mM (lub 0 mM) w prekulturze na 12 dni przed krioprezerwacją (73). Wapń znany jest jako czynnik zapobiegający uszkodzeniom błon komórkowych dzięki stymulacji mechanizmów detoksyfikacyjnych (poprzez indukcję aktywności katalaz) oraz ograniczaniu peroksydacji lipidów (dzięki utrzymywaniu wysokiego poziomu glutationu) (74). Nastęstwem wycofania z pożywki CaCl_2 był wzrost wodnego i osmotycznego potencjału w komórkach *H. brasiliensis*, redukcja poziomu endogennego wapnia oraz wzrost zawartości rozpuszczalnych białek. Zmiany te pociągały za sobą podniesienie merystematycznej i embriogenicznej aktywności komórek, większą kriotolerancję oraz postmrożeńową embriogeniczną kompetencję (73).

W efekcie prekultury w roztworze manitolu komórki tytoniu wykazywały zwiększoną produkcję ABA, a po 8 h zaczynały akumulować prolinę, której zawartość po 24 h wzrosła 10-krotnie (75). Komórki tej zawiesziny dopiero po kulturze w manitolu były zdolne do deplazmolizy po wiotryfikacji. Suzuki i wsp. (33) prowadząc 13-dniową prekulturę sacharozą (0,1 M – 11 dni; 0,4 M – 1 dzień i 0,7 M – 1 dzień) obserwowali gromadzenie się endogennego ABA i proliny w pąkach kątowych *Gentiana scabra*. Zawartość ABA rosła w ciągu czterech pierwszych dni kultury, a następnie malała do wyjściowego poziomu, mimo dalszego traktowania stale podwyższanym stężeniem osmotikum. Akumulacja endogennej proliny zachodziła stopniowo wraz ze wzrostem stężeń substancji osmotycznie czynnej, a jej poziom był 4-5-krotnie wyższy niż na początku kultury. Większą skuteczność długoterminowej prekultury wykazali w swoich badaniach Hitmi i wsp. (64). Do zaindukowania tolerancji na mrożenie w komórkach zawiesziny *Chrysanthemum cinerariaefolium* wykorzystali oni sacharozę. Mimo że 10-dniowa prekultura była wystarczająca do zaindukowania maksymalnej dehydratacji i poziomu endogennej proliny, jednakże wydłużenie hartowania do 30. dni znacząco podniosło zawartość endogennej sacharozy i ABA oraz poziomu wody związanej (wchodzącej w skład związków chemicznych, niemożliwej do usunięcia w wyniku dehydratacji). Po 30-dniowej prekulturze pożywką zawie-

rającą 18% sacharozę zawartość wody wolnej obniżyła się 4-krotnie, a przeszło 2-krotnie wzrosła zawartość wody związanej. Obecność endogennej sacharozy wzrosła 4-krotnie, glukozy 2-krotnie, a fruktozy 1,4-razy. Przeszło 8-krotnie podniósł się poziom endogennego ABA i 3-krotnie proliny. Zarejestrowane w komórkach zmiany przyczyniły się do zwiększenia żywotności z 6,6 do 57%, a zdolności do odtworzenia kultury z 0 do 72% (64).

Stres osmotyczny wywołany po przeniesieniu materiału roślinnego na pożywki zawierające wysokie stężenia cukrów może być również sygnałem do adaptacji metabolizmu komórek na stres. Już 21 h prekultura pożywką zawierającą 0,4 M stężenie sacharozy sprzyjała utrzymaniu kiełkowania zarodków somatycznych marchwi po przechowywaniu w LN na poziomie 80% (65). Po traktowaniu sacharozą, bądź dodatkowo po podaniu egzogennej ABA, stwierdzano akumulację pięciu polipeptydów, których brak (powiązany z brakiem przeżycia) wykazano po prekulturze zarodków glikolem polietylenowym 6000. Tolerancję na mrożenie embriogenicznych komórek zawiesiny *Asparagus officinalis* indukowano za pomocą plazmolizy roztworem 0,8 M sacharozy (57). Zaindukowana po dwóch dniach prekultury tolerancja w zakresie temperatur od -20 do -24°C utrzymywała się przez 6 kolejnych dni. W tym czasie stwierdzono około 6-krotny wzrost poziomu endogennych cukrów (sacharozy, glukozy i fruktozy), czego nie odnotowano po hartowaniu komórek chłodem, oraz wzmożone pojawianie się 42-kD białek z grupy dehydryn. Poziom białek osiągnął maksimum po ok. 12 h i utrzymywał się przez 4 dni.

Vandenbussche i wsp. (16) wykazali wyższą skuteczność aklimatyzacji chłodem (1 tydzień: 8 h dzień z temperaturą 21°C i 16 h noc z temperaturą 5°C) wierzchołków wzrostu *Beta vulgaris*, aniżeli prekultury roztworem 0,3 M sacharozy czy tygodniowego traktowania pożywką zawierającą 10^{-6} M ABA. Po hartowaniu, wraz ze wzrostem mrozowej tolerancji, wzrosła zawartość cukrów w komórkach (sacharozy, glukozy i fruktozy). Modyfikacji uległ również skład kwasów tłuszczowych. Wzrosła zawartość kwasu linolowego, a obniżyła się linolenowego. Obniżeniu uległa zawartość chlorofilu (Chl *a* i Chl *b*). Z 20-47% do 60-70% wzrosła przeżywalność po krioprezerwacji (zależnie od badanego klonu). Zmiany w zawartości kwasów tłuszczowych zachodziły także po traktowaniu ABA oraz po prekulturze sacharozą, jednakże inne grupy kwasów tłuszczowych modyfikacji podlegały (16). Ramon i wsp. (68) po 2-tygodniowej prekulturze 0,4 M sacharozą wykazali zmiany w kwasach tłuszczowych oraz wzrost poziomu poliamin.

5. Krioprezerwacja w zabezpieczeniu kompetencji komórek roślinnych

Nadrzędnym celem gromadzenia materiału roślinnego w ciekłym azocie jest możliwość najlepszego zachowania zdolności życiowych jego komórek i tkanek, z zabezpieczeniem ich kompetencji do regeneracji, produkcji specyficznych substancji i/lub odtwarzania kultur. Ultraniska temperatura powinna gwarantować również utrzy-

mywanie stabilności genetycznej zregenerowanych po krioprzechowywaniu roślin czy postmrożeńiowych kultur.

5.1. Zabezpieczenie zdolności regeneracyjnych

W bankach genów funkcjonujących na bazie kultur *in vitro*, roślinna różnorodność biologiczna gromadzona jest głównie w postaci merystemów, wierzchołków pędów oraz zarodków somatycznych. Ten rodzaj materiału gwarantuje z jednej strony intensywne rozmnażanie, z drugiej zaś stwarza możliwości do prowadzenia postmrożeńiowej regeneracji bez udziału tkanki kalusowej. Z tego względu stosując różne metody przed- i pomrożeńiowe określa się obecnie obok przeżywalności materiału roślinnego również jego kompetencje do bezpośredniej regeneracji (20,40,44). W histologicznych badaniach wskazuje się, że jest ona możliwa do osiągnięcia, wówczas gdy niemalże wszystkie komórki eksplantatu przeżywają mrożeńie (34,47). Generalnie rozmrożony materiał, zwłaszcza kapsułkowany, podejmuje wzrost wolniej niż nie mrożony (34,76), jednakże najczęściej opóźnienie to nie ma wpływu na reakcję morfogenetyczną.

Na podstawie wielu dotychczas opublikowanych wyników badań wskazuje się na utrzymywanie po krioprzechowywaniu potencjału embriogenicznego kultur na nie zmienionym poziomie (73,77-84). Jednocześnie krioprezerwacja najczęściej nie wykazuje niekorzystnego wpływu na przebieg embriogenezy i regenerację roślin, co wykazano np. dla większości z 39 embriogenicznych linii *Hevea brasiliensis*, czy trzech linii *Pinus roxburghii* (73,82). Znacznie rzadziej opisywana jest redukcja, utrata czy podniesienie embriogenicznych kompetencji. Utracie zdolności do tworzenia zarodków somatycznych przez embriogeniczną tkankę kalusową dwóch spośród sześciu badanych genotypów *Ipomea batatas* przypisuje się zastosowaniu niedostatecznych warunków kriochrony (85). Wykorzystanie jedynie prekultury bez dodatkowej ochrony krioprotektantami zabezpieczyło żywotność tkanki kalusowej, ale okazało się niewystarczające do utrzymania embriogenicznego potencjału genotypów wrażliwszych na mrożeńie. Wyższą zdolność regeneracyjną rozmrożonej tkanki obserwowano w przypadku zawiesiny komórkowej *Citrus deliciosa* (86), dwóch linii embriogenicznego kalusa *Hevea brasiliensis* (87), a w przypadku kapsułkowanej zawiesiny *Vitis vinifera* krioprezerwacja przyczyniła się aż do 7-krotnego podniesienia liczby zarodków somatycznych (76). Nabywanie lub utratę kompetencji do embriogenezy i przyczyny tego zjawiska można prześledzić na przykładzie poddanych krioprezerwacji 39 linii *Hevea brasiliensis* (73). Dwie spośród dziewięciu nieembriogenicznych linii po mrożeńiu nabywały zdolność do embriogenezy, a dwie inne ją traciły. W tym przypadku autorzy porównując zdolności regeneracyjne tych linii w kolejnych eksperymentach uznali, że może to być jedynie przejściowe zjawisko. Inni badacze, przyczyn wzrostu embriogenicznych kompetencji upatrują w zjawisku krioselekcji (86,88).

5.2. Zabezpieczanie aktywności metabolicznej

Ze względu na konieczność stosowania w procedurze krioprezerwacji osmotycznych przedtraktowań oraz toksycznych krioprotektantów, jak dotąd, sporadycznie wykorzystywano ją do zabezpieczania linii komórkowych, stanowiących alternatywne systemy do produkcji metabolitów wtórnych czy leczniczych białek. Do ciekłego azotu dotychczas z powodzeniem wprowadzono wyselekcjonowane linie komórkowe (kalus, zawiesina) (89-92), wierzchołki korzeni włośnikowych (93) oraz wierzchołki pędów (94,95) roślin leczniczych. Na podstawie uzyskanych wyników wskazuje się, że krioprezerwacja może być wykorzystywana jako skuteczna metoda zabezpieczania kompetencji komórek i tkanek roślinnych do produkcji specyficznych metabolitów wtórnych.

Kim i wsp. (92) wykazali, że krioprezerwacja zabezpiecza zdolności zawiesiny komórkowej *Taxus chinensis* do biosyntezy paklitakselu. Stwierdzono nieznaczne opóźnienie jego produkcji w ciągu pierwszych 40. dni od rozmrożenia komórek, jednakże po tym czasie była ona porównywalna. Początkowe różnice w biosyntezie tego metabolitu przypisano toksycznemu wpływowi mrożeniowych i postmrożeniowych traktowań (92). Wysoką przeżywalność (92%) zdolnych do wydajnej produkcji metabolitów wtórnych linii komórkowych *Chrysanthemum cinerariaefolium* uzyskano wykorzystując 5% DMSO, po uprzedniej 30-dniowej prekulturze sacharozą (90). Po krioprezerwacji wzrost mrożonej i niemrożonej tkanki kalusowej był podobny. W badaniach wykazano obniżoną zawartość chlorofilu i podwyższoną zdolność do produkcji pyretryny, cyneryny i jasmoliny. Wzrost biosyntezy metabolitów w postmrożeniowych kulturach był skorelowany z różną skutecznością zastosowanej kriochrony. Autorzy, efektów zmian upatrują w możliwości selekcjonowania subpopulacji komórek, które podczas krioprezerwacji znajdują się w różnych stadiach cyklu komórkowego i poziomach ploidalności (90). W warunkach stresowych modyfikacji ulegać może biochemiczna aktywność komórek, co pociąga za sobą zmiany ilościowe i jakościowe w syntezie metabolitów wtórnych (96,97). Jednakże badania, w których wykazano tak istotnie negatywne zmiany były prowadzone na początku lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku, kiedy krioprezerwację dopiero wdrażano, a stosowane metody kriochrony nie były tak skuteczne jak obecnie.

Biochemiczną stabilność roślin zregenerowanych z przechowywanych w LN wierzchołków pędów *Dioscorea deltoidea* (95), *D. floribunda* i *D. bulbifera* (98,99) i *Chrysanthemum cinerariaefolium* (94) oszacowano wykorzystując HPLC. Zawartość diosgeniny nie różniła się, podobnie jak katarantyny i ajalicyny w liniach komórkowych *Catharanthus roseus* czy *Panax ginseng* (89). Podczas gdy zawartość chlorofilu była niższa, a pyretryn wyższa w 28. dniu kultury rozmrożonej tkanki kalusowej (90), to biosynteza tych substancji w zregenerowanych po mrożeniu z wierzchołków wzrostu roślinach była zgodna z kontrolą (94). Indywidualnie optymalizowane wityfikacyjne procedury wykorzystujące PVS2 dla ochrony korzeni włośnikowych *Panax ginseng*, *Angelica acutiloba*, *Atropa belladonna* oraz *Papaver somniferum* z powo-

dzeniem zabezpieczają żywotność, zdolności do organogenezy oraz biosyntezy specyficznych metabolitów (93). Po krioprezerwacji została utrzymana zdolność do proliferacji komórek i tkanek identycznych jak nie mrożone. Również wzrost odtworzonych korzeni włósnikowych był podobny, jakkolwiek kultury po mrożeniu produkowały mniej nowych bocznych korzeni, co wynikać mogło z zastosowanych kriogenicznych procedur.

W przypadku transgenicznych kultur, wartość krioprezerwacji i zasadność jej wykorzystywania zależy od stabilności transgenu. W przeprowadzonych analizach PCR potwierdzono obecność T-DNA (TL-DNA oraz TR-DNA) w zregenerowanych po krioprzechowywaniu kulturach *Panax ginseng* oraz *Atropa belladonna* (93). W wyniku analiz RAPD, wykorzystujących od 2 do 7 starterów, nie stwierdzono różnic w genomie DNA mrożonych i kontrolnych korzeni włósnikowych *Papaver somniferum* i *Atropa belladonna*. Menges i Murray (100) wykazali, że krioprezerwacja nie zmienia zdolności do synchronizacji badanych linii komórkowych tytoniu BY i *Arabidopsis*, jak również utrzymana jest po rozmrożeniu ekspresja transgenu.

Wykazujące wysoki poziom aktywności biologicznej transgeniczne komórki zawieszinowe ryżu, poddane prekulturze roztworem 0,5 M sacharozy i zabezpieczone mieszaniną krioprotektantów (1 M sacharoza, 1 M glicerol i 1 M DMSO) w 88% przeżywały mrożenie w LN (101). Ekspresja zrekombinowanej ludzkiej cytotoksyny hCTLA4lg w odtworzonej po krioprezerwacji tkance kalusowej była stabilna.

5.3. Zabezpieczenie stabilności genetycznej

Z jednej strony blokowanie w temperaturze -196°C metabolizmu i brak pasaży sprzyjają ograniczaniu występowania zmienności genetycznej i epigenetycznej, z drugiej zaś stres towarzyszący schładzaniu tkanki oraz cały szereg zabezpieczeń, na czele z toksycznymi krioprotektantami, mogą prowadzić do utraty stabilności genetycznej. W czasie ostatniej dekady w literaturze znaleźć można ponad 80 doniesień (102), w których ocenia się stabilność materiału roślinnego po przechowywaniu w LN na różnych poziomach: fenotypowym (morfologiczny opis łodyg, liści, korzeni, kwiatów, owoców oraz wzrostu), cytologicznym (wykrywanie niestabilności chromosomów, poliploidyacja, aneuploidyacja i inne mitotyczne zaburzenia), biochemicznym (porównanie zmian w profilach białkowych) i molekularnym (analiza genomowych sekwencji DNA za pomocą technik PCR, ang. *Polymerase Chain Reaction*). W przeprowadzonej analizie cytometrycznej syntetycznie otrzymywanych dihaploidów *Solanum tuberosum* linii PDH 40, ulegających w naturze spontanicznemu podwojeniu zawartości DNA do poziomu tetraploidalnego, wykazano utrzymywanie wyjściowego, diploidalnego poziomu w regenerantach przechowywanych w ciekłym azocie w postaci wierzchołków pędów (103). Z wykorzystaniem cytometrii przepływowej Menges i Murray (100) stwierdzili brak różnic w całkowitej zawartości DNA oraz jego rozkładzie pomiędzy różnymi fazami cyklu komórkowego zawieszin

Arabidopsis thaliana i *Nicotiana tabacum*. Na podstawie badań fenotypowych i genotypowych dostarczane są dowody, że otrzymane po krioprezechowywaniu regeneranty posiadają cechy roślin matecznych (27,98,99,104-110). Morfologiczne podobieństwo i brak jakichkolwiek różnic jest opisywane zwłaszcza, wtedy gdy regeneracja zachodzi bezpośrednio (bez pośrednictwa tkanki kalusowej) ze stożków wzrostu czy merystemów (111). W literaturze można znaleźć dowody również na zachowanie stabilności genetycznej przez regeneranty otrzymane z embriogenicznej tkanki kalusowej (99). W fenotypowej analizie zregenerowanych roślin *Arabidopsis thaliana*, pochodzących z trzech różnych ekotypów, nie wykazano szkodliwego wpływu stosowanych „przedtraktowań” oraz mrożenia zawiesin w LN na morfologię regeneratów, tj. system korzeniowy, kwitnienie, zawiązywanie łuszczyń oraz liczbę nasion (110). Na podstawie analizy jądrowego i chloroplastowego DNA *Solanum tuberosum* wskazano na stabilność genetyczną zregenerowanych z przechowywanych w LN stożków wzrostu roślin (107). Zdarza się jednak, że opisanej zmienności fenotypowej nie towarzyszą potwierdzone na poziomie molekularnym zmiany, gdyż standardowo stosowane markery RFLP nie są w stanie wykryć zmian o podłożu epigenetycznym (6). Polimorfizm nie związany z fenotypem wykazywały różne warianty analizy AFLP użyte dla karłowatych i normalnych odmian *Musa* (112). Na podstawie danych literaturowych wykazuje się również, że mimo braku zmian fenotypowych i cytologicznych oraz rozwoju roślin „zgodnego z typem” (*true-to-type*), techniki RAPD i AFLP mogą wykryć polimorfizm DNA (113).

W literaturze są przedstawione dowody na to, że krioprezerwacja indukuje istotne zmiany na poziomie metylacyjnym (111,114-116), które odgrywają ważną rolę w sterowaniu rozwojem rośliny, różnicowaniem organów i tkanek (117). U niektórych genotypów w następstwie krioprezerwacji i wykazanych zmian metylacyjnych, podniesieniu uległa efektywność procesu somatycznej embriogenezy (76). Sugeruje to, że zmiany metylacyjne indukowane krioprezerwacją mogą wpływać na ekspresję genów powiązanych z somatyczną embriogenezą (117).

6. Podsumowanie

Stosowane dotychczas techniki krioprezerwacji materiału roślinnego bazują na indukowaniu tolerancji mrozowej/desykacyjnej opartej na hartowaniu/prekulturze. Po weryfikacji ustanowionych dotychczas poglądów, skutecznej krioprezerwacji roślin (zwłaszcza wrażliwych na chłód) upatruje się obecnie w indukowaniu tolerancji desykacyjnej. Kolejny przełom w dotychczasowych badaniach stanowi wprowadzenie do ciekłego azotu roślin wrażliwych zarówno na chłód, jak i desykację. Osiągnięcia w tym zakresie uzyskane dla kultywarów banana mogą otworzyć drogę do standaryzacji i upowszechniania krioprezerwacji, zarówno w gromadzeniu bioróżnorodności w bankach tkanek, jak i w codziennej pracy biotechnologa. Wraz ze skutecznością używanych technik mrożenia roślin gwarancja szybkiego odtwarzania mate-

riału roślinnego bez pośrednictwa tkanki kalusowej. W badaniach z ostatniego dziesięciolecia wskazuje się na wysoką skuteczność stosowanych obecnie procedur przed- i postmrozeniowych w zabezpieczaniu kompetencji komórek i tkanek do regeneracji oraz biosyntezy specyficznych substancji, z gwarancją utrzymywania stabilności genetycznej.

Literatura

1. Mikuła A., Rybczyński J. J., (2006), *Biotechnologia*, 4, 145-163.
2. Fabre J., Dereuddre J., (1990), *CryoLetters*, 11, 413-126.
3. Uragami A., Sakai A., Nagai M., Takahashi T., (1989), *Plant Cell Rep.*, 8, 418-421.
4. Langis R., Schnabel B., Earle E. D., Steponkus P. L., (1989), *CryoLetters*, 10, 421-428.
5. Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I., (1990), *Plant Cell Rep.*, 9, 30-33.
6. Schäfer-Menhur A., Muller E., Mix-Wagner G., (1996), *Potato Res.*, 39, 507-513.
7. Towill L. E., Forsline P. L., Walters Ch., Waddell J. W., Laufmann J., (2004), *CryoLetters*, 25, 323-334.
8. Engelmann F., (2004), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 40, 427-433.
9. Paul H., Daigny G., Sangwan-Norreeel B. S., (2000), *Plant Cell Rep.*, 19, 768-774.
10. Kalengamaliro N. E., Gana J. A., Cunningham S. M., Volenec J. J., (2000), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 61, 143-151.
11. Travert S., Valerio L., Fourasté I., Boudet A. M., Teulières Ch., (1997), *Plant Physiol.*, 114, 1433-1442.
12. Shibli R. A., Haagenson D. M., Cunningham S. M., Berg W. K., Volenec J. J., (2001), *Plant Cell Rep.*, 20, 445-450.
13. Niino T., Sakai A., (1992), *Plant Sci.*, 87, 199-206.
14. Vandebussche B., de Proft M. P., (1998), *Plant Cell Rep.*, 17, 791-793.
15. Chang Y., Reed B. M., (2000), *Cryobiology*, 40, 311-322.
16. Vandebussche B., Leuridan S., Verdoodt V., Gysemberg M., de Proft M., (1999), *Plant Growth Regul.*, 28, 157-163.
17. Takagi H., (2000), *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, Eds. Engelmann F., Takagi H., International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 178-193.
18. Helliott B., Swennen R., Poumay Y., Frison E., Lepoivre P., Panis B., (2003), *Plant Cell Rep.*, 21, 690-698.
19. Charoensub R., Phansiri S., Yongmanitchai W., Sakai A., (2003), *Sci. Hortic-Amsterdam*, 98, 485-492.
20. Panis B., Piette B., Swennen R., (2005), *Plant Sci.*, 168, 45-55.
21. COST Action 871, (2006), *Cryopreservation of crop species in Europe*, in: http://awi.vlaanderen.be/documenten/COST_871_MoU.pdf#search=%22Cryopreservation%20of%20crop%20species%20in%20Europe%22
22. Oliver A. J., Velten J., Mishler B. D., (2005), *Integr. Comp. Biol.*, 45, 788-799.
23. Malek L., Bewley J. D., (1978), *Plant Physiol.*, 61, 334-338.
24. Burch J., (2003), *The Bryologist*, 106, 270-277.
25. Pence V. C., (2000), *Am. Fern J.*, 90, 16-23.
26. Suzuki M., Ishikawa M., Akihama T., (1998), *Plant Sci.*, 135, 69-76.
27. Martínez D., Tamés R. S., Revilla M. A., (1999), *Plant Cell Rep.*, 19, 59-63.
28. Dumet D., Chang Y., Reed B. M., Benson E. E., (2000), *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, Eds. Engelmann F., Takagi H., International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 393-395.
29. Reed B. M., Schumacher L., Dumet D., Benson E. E., (2005), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 41, 431-436.
30. Suzuki M., Akihama T., Ishikawa M., (2005), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 83, 115-121.

31. Pence V. C., (1998), *The Bryologist*, 101, 278-191.
32. Christianson M. L., (1998), *The Bryologist*, 101, 32-35.
33. Suzuki M., Ishikawa M., Okuda H., Noda K., Kishimoto T., Nakamura T., Ogiwara I., Shimura I., Aki-hama T., (2006), *Ann. Bot.*, 97, 1073-1081.
34. Gonzalez-Arnao M. T., Engelmann F., (2006), *CryoLetters*, 27, 155-168.
35. Verleysen H., van Bockstaele E., Debergh P., (2005), *Sci. Hort. Amsterdam*, 106, 402-414.
36. Touchell D. H., Chiang V. L., Tsai C.-J., (2002), *Plant Cell Rep.*, 21, 118-124.
37. Touchell D. H., Turner S. R., Bunn E., Dixon K. W., (2002), *Cryopreservation of plant germplasm II*, vol. 50, Ed. Towill L. E., Springer, Berlin, 373-390.
38. Turner S. R., Senaratna T., Touchell D. H., Bunn E., Dixon K. W., Tan B., (2001), *Plant Sci.*, 160, 489-497.
39. Scocchi A., Faloci M., Medina R., Olmos S., Mroginski L., (2004), *Euphytica*, 135, 29-38.
40. Wang Q., Laamanen J., Uosukainen M., Valkonen J. P. T., (2005), *Plant Cell Rep.*, 24, 280-288.
41. Miłkuła A., (2006), *CryoLetters*, 27, 268-282.
42. Dumet D., Grapin A., Bailly Ch., Dorion N., (2002), *Plant Sci.*, 163, 1121-1127.
43. Escobar R. H., Debouck D., Roca W. M., (2000), *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, Eds. Engelmann F., Takagi H., International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 222-226.
44. Panis B., Schoofs H., Thinh N. T., Swennen R., (2000), *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, Eds. Engelmann F., Takagi H., International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 238-244.
45. Sarkar D., Naik P. S., (1998), *Ann. Bot.*, 82, 455-461.
46. Helliot B., Panis B., PouMay Y., Swennen R., Lepoivre P., Frison E., (2002), *Plant Cell Rep.*, 20, 1117-1122.
47. Wilkinson T., Wetten A., Prychid Ch., Fay M. F., (2003), *Ann. Bot.*, 91, 65-74.
48. Mari S., Engelmann N., Chabrillange N., Mechaux-Ferrière N., (1995), *CryoLetters*, 16, 289-298.
49. Matsumoto T., Sakai A., Takahashi C., Hamada K., (1995), *CryoLetters*, 16, 189-196.
50. Withers L. A., Street H. E., (1977), *Physiol. Plantarum*, 39, 171-178.
51. Gnanapragasam S., Vasil I. K., (1992), *Plant Cell Rep.*, 11, 169-174.
52. Suzuki T., Kaneko M., Harada T., (1997), *Cryobiology*, 34, 264-275.
53. Wang J. H., Ge J. G., Liu F., Huang C. N., (1998), *CryoLetters*, 19, 49-54.
54. Pritchard H. W., Grout B.W. W., Short K. C., (1986), *Ann. Bot.*, 57, 41-48.
55. Miłkuła A., Tykarska T., Kuraś M., (2005), *CryoLetters*, 26, 367-378.
56. Fujikawa S., Takabe K., (1996), *Protoplasma*, 190, 189-203.
57. Jitsuyama Y., Suzuki T., Harada T., Fujikawa S., (2002), *CryoLetters*, 23, 103-112.
58. Pomeroy M. K., Andrews Ch. J., (1978), *Can. J. Bot.*, 56, 786-794.
59. Pomeroy M. K., Siminovitsh D., (1970), *Can. J. Bot.*, 48, 953-967.
60. Walters Ch, Farrant J. M., Pammenter N. W., Berjak P., (2002), *Desiccation and Survival in Plants: Drying without dying*, Eds. Black M., Pritchard H. W. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, 263-292.
61. Pritchard H. W., Grout B. W. W., Short K. C., (1986), *Ann. Bot.*, 57, 371-378.
62. Pritchard H. W., Grout B. W. W., Short K. C., (1986), *Ann. Bot.*, 57, 379-387.
63. Mahajan S., Tuteja N., (2005), *Arch. Biochem. Biophys.*, 444, 139-158.
64. Hitmi A., Coudret A., Barthomeuf C., Sallanon H., (1999), *CryoLetters*, 20, 45-54.
65. Thierry C., Florin B., Pétiard V., (1999), *Plant Physiol. Biochem.*, 37, 145-154.
66. Seijo G., (2000), *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, 12, 166-180.
67. Martínez-Montero M. E., Mora N., Quiñones J., González-Arnao M. T., Engelmann F., Lorenzo J. C., (2000), *CryoLetters*, 23, 237-244.
68. Ramon M., Geuns J. M. C., Swennen R., Panis B., (2002), *CryoLetters*, 23, 345-352.
69. Sala F., Cella R., Rollo R., (1979), *Physiol. Plant.*, 45, 170-176.
70. Withers L. A., King P. J., (1980), *CryoLetters*, 1, 213-220.
71. Stomell J. R., Simon P. W., (1990), *Phytochemistry*, 29, 2087-2089.
72. Echeverria E., (1990), *Plant Physiol.*, 92, 168-171.

73. Lardet L., Martin F., Dessailly F., Carron M. P., Montoro P., (2007), *Plant Cell Rep.*, 26, 559-569.
74. Fleck R. A., Benson E. E., Bremmer D. H., Day J. G., (2003), *CryoLetters*, 24, 213-228.
75. Reinhoud P. J., Versteeg I., Kars I., van Iren F., Kijne J. W., (2000), *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, Eds. Engelmann F., Takagi H., International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 57-66.
76. Wang Q., Gafny R., Sahar N., Sela I., Mawassi M., Tanne E. Perl A., (2002), *Plant Sci.*, 162, 551-558.
77. Nishizawa S., Sakai A., Amano Y., Matsuzawa T., (1993), *Plant Sci.*, 91, 67-73.
78. Rajasekaran K., (1996), *Plant Cell Rep.*, 15, 859-864.
79. Marum L., Estêvão C., Oliveira M. M., Amâncio S., Rodrigues L., Miguel C., (2004), *CryoLetters*, 25, 363-374.
80. Mathur G., Alkutar V. A., Nadgauda R. S., (2003), *Biol. Plantarum*, 46, 205-210.
81. Wu Y-J., Huang X-L., Chen Q-Z., Li X-J., Engelmann F., (2007), *Plant Cell Rep.*, 26, 161-168.
82. Malabadi R. B., Nataraja K., (2006), *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*, 42, 152-159.
83. Winkelmann T., Muâmann V., Serek M., (2004), *Plant Cell Rep.*, 23, 1-8.
84. Pérez R. M., Navarro L., Duran-Vila N., (1997), *Plant Cell Rep.*, 17, 44-49.
85. Blakesley D., Percival T., Bhatti M. H., Henshaw G. G., (1997), *CryoLetters*, 18, 77-80.
86. Aguilar M. E., Engelmann F., Michaux-Ferrière N., (1993), *CryoLetters*, 14, 217-228.
87. Engelmann F., Lartaud M., Chabrilange N., Carron M. P., Etienne H., (1997), *CryoLetters*, 18, 107-116.
88. Häggman H. M., Ryyänen L. A., Aronen T. S., Krajinakova J., (1998), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 54, 45-53.
89. Mannonen M., Toivonen L., Kauppinen V., (1990), *Plant Cell Rep.*, 9, 173-177.
90. Hitmi A., Sallanon H., Barthomeuf C., (1997), *Plant Cell Rep.*, 17, 60-64.
91. Kim S. H., Byun S. Y., (2000), *J. Microbiol. Biotechn.*, 10, 327-332.
92. Kim S.-I., Choi H.-K., Son J.-S., Yun J.-H., Jang M.-S., Kim H.-R., Song J.-Y., Kim J.-H., Choi H.-J., Hong S.-S., (2001), *CryoLetters*, 22, 43-50.
93. Yoshimatsu K., Touno K., Shimomura K., (2000), *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, Eds. Engelmann F., Takagi H., International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 77-88.
94. Hitmi A., Barthomeuf C., Sallanon H., (1999), *CryoLetters*, 20, 109-120.
95. Dixit-Sharma S., Ahuja-Ghosh S., Mandal B. B., Srivastava P. S., (2005), *Sci. Hortic-Amsterdam*, 105, 513-517.
96. Dougall D. K., Whitten G. H., (1980), *Planta Med.*, 40 [suppl], 129-135.
97. Chen T. H. H., Kartha K. K., Leung N. L., Kurz G. W., Chatson K. B., Constabel F., (1984), *Plant Physiol.*, 75, 726-731.
98. Ahuja S., Mandal B. B., Dixit S., Srivastava P. S., (2002), *Plant Sci.*, 163, 971-977.
99. Dixit S., Mandal B. B., Ahuja S., Srivastava P. S., (2003), *CryoLetters*, 24, 77-84.
100. Menges M., Murray J. A., (2004), *The Plant Journal*, 37, 635-644.
101. Cho Ji-S., Hong S-M., Joo S-Y., Yoo Ji-S., Kim D-I., (2007), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73, 1470-1476.
102. Harding K., (2004), *CryoLetters*, 25, 3-22.
103. Ward A. C. W., Benson E. E., Blackhall N. W., Cooper-Bland S., Powell W., Power J. B., Davey M. R., (1993), *CryoLetters*, 14, 145-152.
104. Gagliardi R. F., Pacheo G. P., Carneiro L. A., Valles J. F. M., Viera M. L. C., Mansur E., (2003), *CryoLetters*, 24, 103-110.
105. Zhai, Z., Wu, Y., Engelmann, F., Chen, R., Zhao, Y., (2003), *CryoLetters*, 24, 315-322.
106. Hao Y-J., You Ch-X., Deng X-X., (2002), *CryoLetters*, 23, 27-35.
107. Harding K., Benson E. E., (2000), *CryoLetters*, 21, 279-288.
108. Côte F.X., Goue O., Domergue R., Panis B., Jenny C., (2000), *CryoLetters*, 21, 19-24.
109. Hirai D., Sakai A., (2000), *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, Eds. Engelmann F., Takagi H., International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 205-211.

110. Ribeiro R. C. S., Jekkel Z., Mulligan B. J., Cocking E. C., Power J. B., Davey M. R., Lynch P. T., (1996), *Plant Sci.*, 115, 115-121.
111. Hao Y-J., Liu Q-L., Deng X-X., (2001), *Cryobiology*, 43, 46-53.
112. Engelborghs I., (2002), *Dissertations of Agriculture*, Ph. D thesis, nr 515, May, Catholic University Leuven, Belgium.
113. Helliot B., Madur D., Dirlewanger E., de Boucaud M. T., (2002), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 38, 493-500.
114. Harding K., Marzalina M., Krishnapillay B., Zaimah N. A. N., Normah M. N., Benson E. E., (2000), *J. Trop. Forest Sci.*, 12, 149-163.
115. Hao Y-J., You Ch-X., Deng X-X., (2002), *CryoLetters*, 23, 27-35.
116. Hao Y-J., You Ch-X., Deng X-X., (2002), *CryoLetters*, 23, 37-46.
117. Lambe P., Mutambel H. S. N., Fouche J-G., Deltour R., Foidart J-M., Gaspar T., (1997), *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*, 33, 155-162.