



## Krioprezerwacja narzędziem długoterminowego przechowywania komórek, tkanek i organów pochodzących z kultur *in vitro*

Anna Mikuła, Jan J. Rybczyński

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

### Cryopreservation – a tool for long-term storage of cells, tissues and organs from *in vitro* culture derived

#### Summary

Cryopreservation offers the possibility for long-term storage of genetic resources with maximal genotypic stability, using a minimum of space and maintenance. At present it is actively used all over the world for storage of plant material: seeds, pollen, spores, dormant buds or apical meristems in genebanks. The development of biotechnology led to the production of a new category of germplasm for cryostorage: *in vitro* obtain tissues, organs, embryos, special cell lines and genetically modified plant material. The maintenance of *in vitro* collections remains risky regarding losing accessions due to the contamination, human error or somaclonal variation. The classical slow cooling was the first standard protocol developed for hydrated plant tissues. This method is mainly used for cryopreservation of non-organized tissues, for example: cell suspensions and calli, or apices of cold-tolerant species. For differentiated structures, new cryopreservation techniques such as vitrification and encapsulation/dehydration procedures or droplet method are efficient and reliable. These freezing techniques have been successfully, routinely applied for cryopreservation of various plant material of temperate and tropical climate species. So far, cryopreservation procedures are developed for *in vitro* tissues and recalcitrant seeds of about 100 and 40 species, respectively.

#### Adres do korespondencji

Anna Mikuła,  
Ogród Botaniczny –  
Centrum Zachowania  
Różnorodności  
Biologicznej,  
Polska Akademia Nauk,  
ul. Prawdziwka 2,  
02-973 Warszawa;  
e-mail:  
amikula@ob.neostrada.pl

#### Key words:

storage, techniques, application of cryopreservation, genetic stability.

## 1. Wprowadzenie

Krioprezerwacja jest uznawana za najlepszą metodę długoterminowego przechowywania materiału roślinnego. W temperaturze ciekłego azotu (-196°C) podziały komórkowe i procesy metaboliczne ulegają zatrzymaniu, a jedynie promieniowanie jonizujące można uznać za przyczynę niewielkich zmian genetycznych (1). Materiał roślinny może być zatem teoretycznie przechowywany, bez zmian i utraty właściwości przez nieograniczony czas. Dodatkowymi atutami tej metody jest niewielka powierzchnia przechowywania i stosunkowo niewysokie koszty utrzymywania próbek. Obecnie krioprezerwacja jest coraz częściej wykorzystywana, choć ciągle jeszcze w niewielu ośrodkach na świecie, do przechowywania materiału roślinnego w postaci nasion, pyłku, pąków spoczynkowych i merystemów wierzchołkowych w bankach tkanek (2). Rozwój biotechnologii doprowadził do uzyskania nowej kategorii zasobów genowych wymagających długoterminowego utrzymywania: otrzymywanej *in vitro* tkanki, organów, zarodków somatycznych, specyficznych linii komórkowych oraz materiału modyfikowanego genetycznie. Za pomocą kultur do 1997 r. przechowywanych było około 38 tys. obiektów (3). Jednakże utrzymywanie kolekcji *in vitro* obciążone jest dużym ryzykiem występowania zmienności somaklonalnej i utraty kultur w wyniku błędu człowieka (2). W ostatniej dekadzie technologia krioprezerwacji roślin, rozwijając się bardzo gwałtownie, umożliwiła długoterminowe przechowywanie biologicznie wartościowego materiału wielu gatunków roślin nie tylko klimatu umiarkowanego, ale i tropikalnego. Dzięki niej zachowywany jest morfogenetyczny potencjał i charakterystyczne dla danych linii komórkowych cechy, np. zdolność produkcji specyficznych metabolitów wtórnych (4,5). Krioprezerwacja znalazła również wykorzystanie do eliminowania wirusa szarki śliwy (PPV), mozaiki ogórka (CMV) czy smużkowatości banana (BSV) (6,7). Na przełomie lat osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych XX w., w badaniach eksperymentalnych, do ciekłego azotu (LN) wprowadzano bardzo różnorodny materiał pochodzący z kultur *in vitro*. W ciągu ostatnich 10 lat dominuje natomiast tendencja łączenia różnych technik i upraszczania procedur w celu dostosowania metod do rutynowego przechowywania jak największej liczby badanych genotypów w bankach tkanek.

## 2. Historia krioprezerwacji

Historia krioprezerwacji sięga końca lat trzydziestych ubiegłego wieku, kiedy to Luyet i Gehenio w 1938 r. opublikowali wyniki udanych badań nad mrożeniem w ciekłym azocie (LN) niewielkich fragmentów tkanek mchów (8). W swojej pionierskiej pracy wykazali oni, że żywotność komórek zależy od stopnia ich uwodnienia oraz sposobu rozmrażania. Dwadzieścia lat później prace nad przeżywalnością tkanki korowej mrozoodpornych pędów roślin drzewiastych rozpoczął Sakai (9). W swoich wielokierunkowych badaniach nad *Morus bombycis* wykazał niekorzystny

wpływ rekrytalizacji wody w niedostatecznie przemrożonych komórkach na ich żywotność po rozmrożeniu (10,11). Dzięki wysokiej mrozoodporności tej morwy nie zachodziła potrzeba wykorzystywania jakichkolwiek krioprotektantów i możliwe było badanie wpływu tempa mrożenia i rozmrażania na przeżywalność komórek (10). Po raz pierwszy substancji ochronnych użyto w postaci glicerolu w 1949 r. (12), zaś DMSO w 1959 r. (13). Najwcześniejsze doniesienia o mrożeniu komórek pochodzących z kultur *in vitro* dotyczyły kultur zawiesinowych. W 1968 r. Quatrano uzyskał w pełni żywotne komórki zawiesiny lnu zabezpieczone DMSO, po przechowywaniu w temperaturze  $-50^{\circ}\text{C}$  (14). Ciekły azot po raz pierwszy zastosowano dla embriogenicznej zawiesiny komórkowej marchwi w 1971 r. (15). Dwa lata później Nag i Street wykazali, że embriogeniczna kultura nie traci zdolności do regeneracji po przechowywaniu w ciekłym azocie (16). W 1979 r. Withers opisała procedurę mrożenia zarodków somatycznych marchwi, tj. struktur zorganizowanych, zbudowanych z różnych typów komórek (17). Przez kolejnych dwadzieścia lat udoskonalano metody powolnego schładzania tkanek dla coraz to nowych gatunków. Od 1990 r. opracowanie nowych technik, bazujących na witrifikacji, uprościło i upowszechniło procedurę krioprezerwacji, dzięki czemu liczba wprowadzanych do LN gatunków raptownie wzrosła.

### 3. Podstawy krioprezerwacji roślin

W naturze wiele gatunków roślin wytworzyło systemy ochronne, pozwalające na unikanie formowania kryształów lodu w temperaturze bliskiej zeru (18). Hartowanie chłodem jest procesem (19), w który zaangażowane są zmiany biochemiczne, fizjologiczne (20,21) i ultrastrukturalne (22), a sama zdolność roślin do aklimatyzacji jest kontrolowana genetycznie (23). Wzrost tolerancji mrozowej wyzwalany jest przez niską temperaturę, suszę, krótki fotoperiod, czy egzogeny kwas abscyzynowy (ABA) (21,24). Hartowaniu towarzyszy ekspresja genów *COR* (ang. *cold-regulated*), określanych też jako *LTI* (ang. *low temperature induced*). Kodują one specyficzne białka z rodziny LEA (ang. *late-embryogenesis abundant*) i ich homologi, charakteryzujące się dużą hydrofilnością i stabilnością w wysokich temperaturach (23). Pojawiają się one także w odpowiedzi na dehydratację i stymulację hormonalną (24). Białka kolejnej grupy – AFP (ang. *antifreeze proteins*), typu glukanaż, chitynaż i tautomatyn, zmieniając dynamikę krystalizacji wody, hamują rozrost kryształów lodu i tym samym zwiększają odporność na mróz (25). Następuje także synteza cukrów, proliny czy ABA. Gromadzenie się tych substancji, obserwowane w roślinach *in vivo*, zachodzi również w komórkach i tkankach hodowanych *in vitro* (26-29). Substancje te zwiększając wewnątrzkomórkowe ciśnienie osmotyczne obniżają temperaturę krystalizacji wody w komórce podczas schładzania (18). Taki system zapobiega nieodwracalnemu uszkodzeniu błon cytoplazmatycznych i ich selektywnej przepuszczalności. Wykazano również istnienie zależności pomiędzy odpornością roślin *in*

*vivo* (np. *Medicago sativa*) i reakcją ich tkanek na schładzanie w warunkach *in vitro* (28). Rośliny klimatu tropikalnego (np. banan) nie wykazują w naturze tolerancji na niską temperaturę i odwodnienie (30), dlatego klucza do udanej ich krioprezerwacji upatruje się głównie w indukcji ich tolerancji desykacyjnej, a nie mrozowej (31,32). Tolerancja na suszenie i tolerancja na niską oraz wysoką temperaturę, niedotlenienie tkanek czy zasolenie, mogą mieć takie same podstawowe właściwości (mechanizm), ale zależność między nimi nie jest jednoznaczna (33).

Woda będąca najobfitszym składnikiem biologicznie aktywnych komórek, jest głównym elementem wpływającym na efektywność krioprezerwacji (18). Radykalne ograniczenie jej zawartości pozwala na osiągnięcie strukturalnych cech, którymi charakteryzują się komórki wykazujące tolerancję desykacyjną, takich jak: małe wakuole, gęsta cytoplazma, brak plazmodesm, elastyczność ścian (33). W warunkach *in vitro* cechy te indukować można za pomocą kultury w roztworach o wysokim osmotikum, które stymulując przebudowę cytoplazmy (34,35) ograniczają w niej zawartość wody wolnej, a zwiększają związaną (27). Stan taki osiągnąć jest przez długoterminowe (ok. 30-dniowe) lub 48-godzinne oddziaływanie roztworami cukrów (35), których ochronna funkcja wyraża się na dwa sposoby. Po pierwsze, grupy hydroksylowe cukrów mogą zastępować cząsteczki wody w utrzymaniu hydrofilowego oddziaływania w membranach i białkach w czasie dehydratacji. Stereochemiczna orientacja grup hydrofilowych polihydroksyalkoholi sprzyja wydajniejszemu wiązaniu wodoru i jego upakowywaniu wokół błon biologicznych (36), stąd sorbitol i glicerol skuteczniej indukują desykacyjną i mrozową tolerancję wielu gatunków roślin (37,38). Po drugie, cukry są głównym czynnikiem biorącym udział w formowaniu „biologicznego szkła” (witryfikacji) w cytoplazmie komórek (33), zapobiegając krystalizacji wody podczas zamrażania (39) oraz utrzymując strukturalną i funkcjonalną integralność makromolekuł (33). Podobnie jak w naturze w czasie aklimatyzacji chłodem, tak i w warunkach *in vitro* podczas kultury, następuje tworzenie wielokompleksowych lamelli na spodniej stronie błon, tworzących równoległe układy, oraz pofragmentowanie retikulum endoplazmatycznego (22,35). Podwyższeniu ulega poziom cukrów oraz białek. W embriogenicznych komórkach zawiesiny *Asparagus officinalis* poziom cukrów wzrósł przeszło 6-krotnie, a białek LEA 2-dwukrotnie (40). Następuje również indukcja endogennych ABA i proliny, co stwierdzono np. w kulturze zawiesinowej tytoniu (41). Objawiająca się w ten sposób strukturalna, biochemiczna i genowa odpowiedź komórki roślinnej na stres osmotyczny, może być powiązana z nabywaniem tolerancji mrozowej (40) czy dehydratacyjnej.

#### 4. Techniki krioprezerwacji materiału roślinnego

Prowadzone na dużą skalę badania nad krioprzechowywaniem tkanek roślinnych doprowadziły do rozwinięcia czterech podstawowych technik krioprezerwacji: powolnego schładzania, witryfikacji, kapsułkowania-dehydratacji i kropli. Metody kla-

syczne oparte są na chemicznej krioochronie połączonej z indukcją dehydratacji mrozowej wywołwanej w czasie powolnego schładzania, zaś nowe techniki bazują na zjawisku witrifikacji (42).

#### 4.1. Technika powolnego schładzania (mrożenia dwustopniowego)

Klasyczne techniki krioprezerwacji rozwinięto w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku. Pierwszy standardowy protokół przedstawiający możliwości rutynowego wykorzystywania tej metody został opisany przez Withers i Kinga (43). Precyzyjna kontrola tempa schładzania, właściwe powiązanie krioprotektantów i krystalizacja wody zewnątrzkomórkowej, to podstawowe elementy dla powodzenia krioprezerwacji opartej na powolnym, kontrolowanym schładzaniu. Zwykle przygotowaniu materiału roślinnego towarzyszy: przedtraktowanie, zabezpieczanie krioprotektantami, powolne schładzanie (w tempie  $0,5-2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) do określonej temperatury przedzamrożeniowej (zwykle  $-30$  lub  $-40^{\circ}\text{C}$ ) i dalsze kontrolowane, szybsze schładzanie do  $-196^{\circ}\text{C}$  (w tempie  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ). Metoda wymaga użycia specjalistycznej aparatury do programowanego schładzania.

Stosowane krioprotektanty (np. dwumetylosulfotlenek – DMSO, mannitol, sorbitol, sacharoza, glikol polietylenu) odwadniają tkanki, stabilizują błony komórkowe oraz obniżają temperaturę krystalizacji lodu. Ponadto przy prawidłowo zaprogramowanym tempie schładzania, zamarzająca jedynie w przestworach międzykomórkowych woda przyczynia się do zagęszczenia soku komórkowego i obniżenia temperatury krzepnięcia cytozolu (18). W optymalnych warunkach większość lub całość wody, która może zamarznąć usuwana jest z komórki drogą osmozy. W ten sposób redukuje się szkodliwe, wewnątrzkomórkowe formowanie lodu. Zbyt intensywna dehydratacja może jednak narazić komórkę na nieodwracalne uszkodzenia, wynikające z nadmiernej koncentracji soku komórkowego i zawartych w nim soli, zmiany w błonach czy utratę ich integralności (44). Aby uniknąć zjawiska rekrytalizacji, w którym topniejący lód wywołuje przemiany termodynamiczne sprzyjające uszkodzeniom wtórnym, rozmrażanie powinno zachodzić możliwie jak najszybciej (45).

Technika powolnego schładzania może być z powodzeniem wykorzystywana do krioprezerwowania nie zróżnicowanego materiału roślinnego, np. zawieszin komórkowych, tkanki kalusowej czy merystemów (42). W przypadku zróżnicowanych struktur technika ta może być wykorzystywana do mrożenia wierzchołków pędów jedynie gatunków tolerujących chłód. Niekiedy uszkodzeniu ulegać może znaczna część strefy wierzchołka, czego efektem jest kalusowanie pozostałych przy życiu komórek. W przypadku ograniczonej proliferacji tkanki kalusowej następuje dalszy, prawidłowy rozwój organów (46).

## 4.2. Technika witrifikacji

Obserwacja procesu witrifikacji w naturze (47), przyczyniła się do rozwinięcia nowych, bardziej uniwersalnych technik krioprezerwacji. Wysoko skoncentrowane roztwory witrifikacyjne początkowo wykorzystywano do zabezpieczania zarodków zwierzęcych (48). W przypadku tkanki roślinnej, technikę witrifikacji po raz pierwszy użyto do mrożenia komórek i zarodków somatycznych *Asparagus officinalis*, przy czym procedura nie zabezpieczała w pełni badanego materiału (49). Udana rezultaty doświadczeń z zakresu krioprezerwacji z wykorzystaniem roztworów witrifikacyjnych opisali Langis i wsp. dla zawiesiny komórkowej *Brassica campestris* (50) oraz Sakai i wsp. w przypadku embriogenicznych linii komórkowych *Citrus sinensis* (51). Odwadnianie cytozolu osiągnane jest tu poprzez traktowanie materiału roślinnego wysoko skoncentrowaną mieszaniną substancji krioochronnych. Takie traktowanie połączone z bezpośrednim zanurzeniem próbek w ciekłym azocie, a zatem z raptownym ich zamrożeniem, powoduje przemianę wodnego roztworu w zeszlony płyn z pominięciem fazy krystalizacji (zarówno cytozolu, jak i roztworu witrifikacyjnego), co ma miejsce w temperaturze  $-115^{\circ}\text{C}$  (52). Zasadniczym elementem tej techniki jest czas i temperatura traktowania roztworami witrifikacyjnymi (53,54).

Stosowane obecnie roztwory witrifikacyjne różnią się składem substancji krioochronnych. Roztwór PVS2 bazuje na 30% (w/v) glicerolu, 15% (w/v) glikolu etylenu (EG), 15% (w/v) DMSO oraz 0,4 M sacharozie (51). Roztwór PVS3 zawiera 50% (w/v) glicerol i 1,46 M sacharozę (54), natomiast roztwór PVS4 35% (w/v) glicerol, 20% (w/v) EG i 0,6 M sacharozę (52). Generalnie zastosowanie roztworów witrifikacyjnych sprzyja utrzymaniu wysokiej żywotności rozmrożonych tkanek (70-90%), jednakże roztwory zawierające wysoko skoncentrowany DMSO oraz EG lub PEG mogą być toksyczne dla materiału roślinnego (55).

Witrifikacja umożliwia przechowywanie w LN nie tylko niezróżnicowanych tkanek, ale również całych organów zawierających różne typy komórek (zarodków, stożków wzrostu, pąków) roślin pochodzących ze wszystkich stref klimatycznych (42).

## 4.3. Technika kapsułkowania-dehydratacji

Metoda kapsułkowania-dehydratacji opiera się na technologii opracowanej dla produkcji sztucznych nasion. Eksplantaty są zamykane w alginianowych kapsułkach i traktowane, od 1 do 7 dni, pożywką zawierającą wzrastające stężenia cukrów (najczęściej sacharozy, zwykle do 1 M). Tkanka po częściowej dehydratacji poddawana jest dalszej desykcji (powietrznej czy krzemionkowej) aż do osiągnięcia około 20-30% wilgotności względnej. Metoda ta bazuje na witrifikacji poprzez dehydratację osmotyczną, a następnie odparowywanie, dzięki czemu w czasie krioprezerwacji uzyskiwany jest stan stabilnej szklistości. Decydującym elementem tej techniki jest

poziom wilgotności odwadnianej tkanki. Metodę kapsułkowania po raz pierwszy wykorzystano dla stożków pędów ziemniaka (56).

Kapsułkowanie-dehydratacja podobnie jak witrifikacja umożliwia krioprechowywanie zarówno zróżnicowanego jak i niezróżnicowanego materiału roślinnego (42).

#### **4.4. Technika kropli (ang. *droplet freezing*) (57)**

Technika ta polega na inkubowaniu materiału roślinnego w roztworze krioprotektanta (57-60), roztworze witrifikacyjnym (32,61,62) lub materiale zabezpieczonym metodą kombinowaną, opartą na kapsułkowaniu i witrifikacji (63). Następnie, wykorzystując wysokie przewodnictwo cieplne folii aluminiowej, materiał roślinny jest bardzo szybko zamrażany w LN. Dzięki temu rozchodzenie się ciepła w eksplantatach jest szybkie i jednorodne (63). Dotychczas metodę tę zastosowano z dużym powodzeniem do mrożenia: merystemów i stożków wzrostu *Solanum tuberosum* (57,61) i *Musa* spp. (32), pąków wierzchołkowych *Dioscorea* spp. (63) oraz wierzchołków pędów *Malus domestica* (58).

#### **4.5. Techniki kombinowane**

Do tej grupy metod zaliczyć można modyfikacje łączące kapsułkowanie z witrifikacją, bądź z powolnym, programowanym schładzaniem (64).

#### **4.6. Inne techniki**

W literaturze opisywane są jeszcze inne metody krioprezerwacji tkanek roślinnych, które dotychczas wykorzystano dla nielicznych gatunków.

##### **4.6.1. Metoda prekultury (ang. *preculture method*) lub prekultury-desykcji (ang. *preculture – desiccation method*)**

Technika ta polega na traktowaniu próbek roztworami krioprotektantów i następnie szybkim ich zamrożeniu w LN. Została ona opracowana dla stożków wzrostu banana (65). Dodatkowo po traktowaniu roztworami substancji kriochronnych próbki mogą być poddawane odwadnianiu powietrzem lub na żelu krzemionkowym. Metodę tę wykorzystano dla fragmentów łodyg *Asparagus* spp., zarodków somatycznych i zygotycznych *Elaeis guineensis* (66), a także pąków kątowych *Gentiana scabra* (67).

#### 4.6.2. Metoda desykcacji (ang. *flash drying*)

Metoda ta jest prostą procedurą polegającą na odwadnianiu eksplantatów – do wilgotności około 10-20% (świeżej masy wyjściowej) – przez szybko przepływający strumień sterylnego powietrza. Następnie próbki zostają zanurzone bezpośrednio w LN. Technika ta jest skuteczna w zabezpieczeniu zarodków zygotycznych typu *recalcitrant* i ich osi (68).

### 5. Krioprezerwacja w zabezpieczeniu materiału roślinnego pochodzącego z kultur *in vitro*

Krioprezerwacja materiału roślinnego pochodzącego z kultur *in vitro* jest jedną z technik strategii ochrony *ex situ* (2). Droga ta jest szczególnie cenna w przypadku trzech kategorii roślin uprawnych: 1) nie tworzących nasion i rozmnażanych wyłącznie wegetatywnie, takich jak banan i plantan (*Musa* spp.); 2) korzeniowych i bulwiastych, np. ziemniaka (*Solanum tuberosum*), pochryznu (*Dioscorea* spp.), manioku (*Manihot esculenta*), słodkiego ziemniaka (*Ipomea batatas*), trzciny cukrowej (*Saccharum* spp.), oraz niektórych, które produkują nasiona typu *orthodox*; 3) roślin o nasionach typu *recalcitrant*, włączając w to gatunki drzewiaste oraz owocowe tropikalne (66). Ze względu na duże znaczenie gospodarcze wymienionych kategorii roślin uprawnych ich krioprezerwacja rozwija się najintensywniej i jest wykorzystywana w praktyce do tworzenia banków tkanek. Najczęściej materiałem roślinnym stosowanym do krioprzechowywania są stożki wzrostu i merystemy, rzadziej zarodki somatyczne. Połączenie somatycznej embriogenezy i krioprezerwacji stanowi istotny element strategii hodowli roślin iglastych i rekultywacji lasów (69). Stan fizjologiczny oraz tolerancja i czułość materiału roślinnego na narastający stres w każdym kolejnym kroku procedury krioprezerwacyjnej, wpływa na powodzenie tego zabiegu i nakazuje odpowiedni dobór dostępnych technik oraz ich modyfikowanie. W udoskonalaniu i opisywaniu efektywności różnych metod coraz częściej wykorzystywana jest termalna analiza DSC (ang. *differential scanning calorimetry*), charakteryzująca przebieg krystalizacji i rekrystalizacji lodu (70,71). Brak efektu cieplnego wynikającego z braku formowania lodu w częściowo odwodnionych próbkach roślinnych jest skorelowany z wysoką żywotnością po krioprezerwacji (72).

#### 5.1. Zawiesina komórkowa i tkanka kalusowa

Kultury zawiesinowe dostarczają niezróżnicowanej populacji komórek, które wykorzystywane są w badaniach eksperymentalnych. Ciekły azot skutecznie zabezpiecza ich potencjał morfogenetyczny (73) oraz stabilność genetyczną (74), dzięki czemu zachowują swój juwenilny charakter. Ponadto kultury roślin ważnych me-

dycznie, utrzymują po kriopzechowywaniu zdolność do produkcji specyficznych metabolitów wtórnych (5). Krioprezewacja nie wpływa negatywnie na ekspresję obcych genów w kulturach transgenicznych (4) czy na regenerację protoplastów z rozmrożonej tkanki (75).

Komórki histologicznie niezróżnicowanej masy proembriogenicznej rozwijającej się w ustabilizowanych i embriogenicznych kulturach zawiesinowych, wykazują zróżnicowanie strukturalne. Zmienność ich wielkości, gęstości cytoplazmy, stopnia wakuolizacji czy zasobności w amyloplasty jest utrzymywana nawet po długoterminowym traktowaniu kultury roztworami o zwiększonym ciśnieniu osmotycznym (35). W efekcie kriopzechowywania pewna populacja komórek, zwłaszcza dużych i silnie zwakuolizowanych obumiera, przy życiu pozostają zaś komórki typowo merystematyczne (35). Teoretycznie krioprezewacja zawiesiny komórkowej może być przeprowadzana z dość dużą skutecznością za pomocą każdej z opisywanych metod. Do 1995 r. dla większości z nich wykorzystywano głównie technikę powolnego schładzania (76). W danych literaturowych z ostatnich dziesięciu lat wskazuje się jednak na większą skuteczność i uniwersalność nowych metod w zabezpieczeniu agregatów zawiesin komórkowych roślin dwuliściennych (tab.).

Tabela

Przykłady zawiesin komórkowych mrożonych w ciekłym azocie oraz wykorzystanych technik od 1995 r. Przeglądu do 1995 r. dokonali Reinhold i wsp. (76)

Gatunek	Technika	<sup>1</sup> Hartowanie	Krioprotektanty	Żywotność (%)	Literatura
1	2	3	4	5	6
<b>Dwuliścienne</b>					
<i>Arabidopsis thaliana</i>	kapsułkowanie			34	(77)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	witryfikacja + 2-stopniowa	0,0-1,0 M mannitol 3 dni	0,5 M DMSO + 0,5 M glicerol + 1 M sacharoza + 10g/l proliny	50	(78)
<i>Catharanthus roseus</i>	kapsułkowanie			47	(79)
<i>Cyclamen persicum</i>	inkubacja 2 h w temp. -20°C, zanurzenie w LN	0,6 M sacharoza 2 dni	10% DMSO	75	(80)
<i>Daucus carota</i>	witryfikacja	0,175 M sacharoza 3 dni + 0,4 M sorbitol 24 h	PVS2	83	(81)
<i>Doritaenopsis</i>	witryfikacja	0,1 M sacharoza + 1 mg/l ABA	PVS2	64	(82)
<i>Fragaria x ananassa</i>	witryfikacja + 2-stopniowa		PVS3	80	(55)
<i>Gentiana cruciata</i>	2-stopniowa, witryfikacja, kapsułkowanie	0,175 M sacharoza, 4 tyg.; 0,4 M sorbitol 48 h	1% DMSO (1,5 h) PVS2 (2 h)	2,7 85 65	(83)

1	2	3	4	5	6
<i>Gentiana tibetica</i>	2-stopniowa, wityfikacja, kapsułkowanie	0,175 M sacharoza, 4 tyg., 0,4 M sorbitol 48 h	1% DMSO (1,5h) PVS2 (2h)	3 90 70	(84)
<i>Medicago sativa</i>	kapsułkowanie	chłodzenie 10 dni w temperaturze 2°C		<sup>2</sup> Modp. 29 nModp. 14	(29)
<i>Nicotiana tabacum</i> ( <sup>3</sup> NE)	<sup>4</sup> 2-stopniowa  wityfikacja	0,3 M mannitol 3 dni	1 M sacharoza + 0,5 M glicerol + 0,5 M glikol propylenu (SGP); PVS2	35  55	(85)
<i>Nicotiana tabacum</i> (NE)	kapsułkowanie + <sup>5</sup> wityfikacja + 2-stopniowa		2 M glicerol + 0,4 M sacharoza	70	(86)
<i>Panax ginseng</i>	bezpośrednie zanurzenie w LN		10% glicerol + 4% sacharoza	86	(53)
<i>Papaver somniferum</i>	kapsułkowanie + 2-stopniowa		5% DMSO	80	(87)
<i>Taxus chinensis</i>	<sup>6</sup> 2-stopniowa		0,5 M DMSO; 0,5 M glicerol	35	(88)
<i>Solanum tuberosum</i>	wityfikacja	0,25; 0,5; 0,625; 0,75 i 1,0 M sacharoza (w sumie 24 h)	0,5 M DMSO + 0,5 M glicerol + 1 M sacharoza + 5 g/l proliny	88	(74)
<i>Vitis vinifera</i>	kapsułkowanie	0,25; 0,5; 0,75; 1M sacharoza		78	(73)
<b>Jednoliścienne</b>					
<i>Bromus inermis</i> (NE)	<sup>4</sup> 2-stopniowa  wityfikacja	20 mg/l ABA 7 dni	10% sacharoza + 10% DMSO + 5% glicerol; PVS2	80  30-40	(89)
<i>Musa</i> spp.	<sup>7</sup> 2-stopniowa	0,29 M sacharoza 24 h	0,53 M sacharozy + 15% DMSO (1 h)	55-90	(90)
<i>Oryza sativa</i> (NE)	wityfikacja		44,5% DMSO + 18,7% sorbitol	20	(91)
<i>Oryza sativa</i> (NE)	<sup>6</sup> 2-stopniowa		5% DMSO + 10% glukoza	<sup>8</sup> 2 linia1; 20 linia2	(92)
<i>Oryza sativa</i>	<sup>9</sup> prekultury-desykacji	0,175 M sacharoza 3 dni + 0,4 M sorbitol 24 h		96	(93)

<sup>1</sup> pożywką wzbogaconą o wymienione w rubryce substancje, <sup>2</sup> Modp. – genotyp mrozoodporny; nModp. – genotyp nie odporny na mróz, <sup>3</sup> NE zawiesina nieembriogeniczna, <sup>4</sup> schładzanie w łaźni z etanolem do temp. od -8 do -12°C; dalej kriofiolki zanurzano na 10 s w LN; dalsze schładzanie w tempie od 0,3°C min<sup>-1</sup> do temp. -30°C; następnie fiolki umieszczono w LN, <sup>5</sup> kriofiolki bezpośrednio z temp. 25°C zamrożono w -30°C na 30 min (efekt określany jako *equilibrium freezing*), następnie fiolki umieszczono w LN, <sup>6</sup> schładzanie programowane: w tempie 1°C min<sup>-1</sup> do temperatury -40°C; następnie fiolki umieszczono w LN, <sup>7</sup> schładzanie w tempie 1°C min<sup>-1</sup> do temp. -7,5°C w łaźni z metanolem, dalej kriofiolki zanurzano na 3 s w LN (dla inicjacji krystalizacji lodu) i schładzano dalej stopniowo do -40°C. Następnie fiolki umieszczono w LN, <sup>8</sup> linie komórkowe zdolne do wysokiej (linia 1) lub słabej (linia 2) kriochrony, otrzymane w wyniku powtarzanego mrożenia i rozmrażania, <sup>9</sup> desykacja w ciągu 20 h do względnej wilgotności około 10%.

Sposób schładzania tkanki, podobnie jak metoda czy rodzaj kriochrony, jak się wydaje, ma decydujący wpływ na powodzenie krioprezerwacji. Szczególnie jest to widoczne w przypadku zabezpieczania nieembriogenicznych kultur zawieszinowych, których komórki wykazują znaczne uwodnienie (86) czy zróżnicowanie morfologiczne. Połączenie kapsułkowania i/lub witrifikacji z powolną dehydratacją do poziomu równowagi zamrożeniowej (ang. *equilibrium freezing*) znacząco podnosi żywotność komórek po rozmrożeniu (86,88-90,92). Z nielicznych prac opublikowanych po roku 1995, dotyczących krioprezerwacji zawieszin komórkowych roślin jednoliściennych (tab.) wynika, że stres osmotyczny oraz toksyczność są głównymi czynnikami ograniczającymi wykorzystanie roztworów witrifikacyjnych u tych roślin (91). Ze względu na cytotoksyczność coraz częściej modyfikuje się roztwory kriochronne eliminując z nich DMSO, PEG czy EG, pozostawiając mniej toksyczne: glicerol i sacharozę (np. roztwór witrifikacyjny PVS3), a także uciekając się do metod desykacyjnych (93). Komórki zawiesziny zamknięte w alginianowych kapsułkach są skutecznie chronione przed stresem mechanicznym, bezpośrednim kontaktem z krioprotektantami i zmianami w ciśnieniu osmotycznym pożywki.

Kultury kalusowe, ze względu na większe zróżnicowanie komórkowe w stosunku do tkanki pochodzącej z kultury zawieszinowej, trudniej zabezpieczyć przed niekorzystnym wpływem niskiej temperatury. Podobnie jak u zawieszin, istnieje tu tendencja do stosowania metod witrifikacyjnych lub łączenia nowych technik z powolnym schładzaniem próbek. Takie procedury wykazały wysoką skuteczność w zabezpieczaniu embriogenicznego kalusa 12 genotypów *Citrus* spp. (94) czy siedmiu z dziewięciu badanych genotypów *Ipomea batatas* (95). Obecnie kosztowne, programowane mrożenie zastępuje się łaźnią alkoholową: metanolową (90) lub etanolową (89,96), która utrzymuje tempo schładzania  $0,4-0,6^{\circ}\text{C min}^{-1}$  w zakresie temperatur 0 a  $-40^{\circ}\text{C}$ . Krystalizacja indukowana jest wówczas poprzez zanurzenie próbek w LN na 3-10 sekund.

Krioprezerwacja embriogenicznej tkanki kalusowej odgrywa znaczącą rolę w tworzeniu banków klonów linii elitarnych roślin iglastych (69,97). W światowym programie przechowywania embriogenicznych genotypów w LN przewidywano, że do 1998 r. ich liczba w bankach tkanek przekroczy 10 000. Szacuje się, że 56% dotychczas zgromadzonych tkanek roślin nagonasiennych stanowi świerk (10 gatunków), 30% sosna (7 gatunków) i 13% daglezwia zielona (69). Ponad 5000 genotypów 14 gatunków roślin iglastych zgromadzono do 1998 r. w Vancouver (Kanada), wprowadzając przeciętnie w ciągu roku 2000 nowych genotypów (98). Skuteczna i funkcjonująca od lat, dla wielu gatunków roślin nagonasiennych, technika powolnego schładzania (od  $0,3^{\circ}\text{C min}^{-1}$  do temp.  $-35^{\circ}\text{C}$ ) oparta jest na wstępnym traktowaniu przez 48 godzin 0,4 M roztworem sorbitolu i następnie 5% DMSO (69). Żywotność dla większości linii przekracza 70-80%. W porównaniu z tą procedurą, przeżywalność po zastosowaniu standardowej procedury witrifikacji przy użyciu PVS2, jedynie dla 3 z 11 badanych linii tkanki kalusowej *Picea mariana* przekroczyła 50%, dla pozostałych pięciu wahała się między 10 a 30%, zaś 3 nie przeżyły mrożenia w ogóle (37).

## 5.2. Morfologicznie zróżnicowany materiał roślinny

Opracowanie nowych technik krioprezerwacji otworzyło drogę do przechowywania zorganizowanych tkanek (merystemów, stożków wzrostu, zarodków somatycznych i ich osi oraz pąków kątowych) większości występujących na świecie gatunków roślin. Wybór rodzaju eksplantatu do przechowywania jest ściśle związany ze specyficzną reakcją gatunkową i wrażliwością na niskie temperatury czy desykcję, a także możliwościami dalszej jego kultury *in vitro*. Ze zróżnicowaniem tkankowym związana jest zmienność morfologiczna komórek i stopień ich uwodnienia, co znacznie może ograniczać zabezpieczanie wszystkich tkanek badanego eksplantatu. Stosowane do tego celu odwadnianie może powodować uszkodzenie części komórek, wynikające z nadmiernej plazmolizy czy szoku osmotycznego. Uszkodzenia te prowadzą w konsekwencji do regeneracji materiału w kulturze postrozmrożeniowej drogą pośrednią, tj. poprzez tkankę kalusową, co obserwowano np. w stożkach wzrostu *Cosmos atrosanguineus* (99) czy zabezpieczanych roztworem wityfikacyjnym wierzchołkach pędów ziemniaka (100). Obecnie szeroki wachlarz technik krioprezerwacyjnych umożliwia regenerację po rozmrożeniu z pominięciem fazy kalusa, co jest korzystniejsze z punktu widzenia tworzonych banków tkanek. Spośród różnorodnego materiału roślinnego do krioprezerwowania na dużą skalę najczęściej wybiera się obecnie stożki wzrostu pędów (30). Zapewniają one szybkie i genetycznie stabilne odtwarzanie roślin matecznych (101). Zarodki somatyczne natomiast były licznie wykorzystywane w latach osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych XX w. do badań podstawowych nad indukowaniem tolerancji desykacyjnej w czasie tworzenia sztucznych nasion oraz tolerancji mrozowej dla celów krioprezerwowania (102).

W ciągu ostatnich dziesięciu lat w przypadku przechowywania w LN wielu gatunków roślin, materiał stanowią merystemy wraz z 1 lub 2 zawiązkami liści (30, 103, 104). Duża jednorodność komórek sprzyja całościowemu zabezpieczeniu tkanki, a obecność zawiązków pąków pachwinowych gwarantuje następnie bezpośrednią regenerację pędów, co obserwuje się u większości jednoliściennych roślin tropikalnych, np. *Musa* spp., *Cymbidium*, *Colocasia esculenta* czy *Oryza rufipogon* (104). Podstawowe czynniki wpływające na powodzenie krioprezerwacji wierzchołków pędów, takie jak kondycja roślin-dawców, wielkość eksplantatu oraz techniczne uwarunkowania wyboru metod, opisuje Takagi (30). Wykorzystanie stożków wzrostu, roztworu wityfikacyjnego PVS2 oraz techniki kropelkowej (32) przyczyniło się do rozwinięcia optymalnej procedury krioprezerwowania w banku tkanek w Leuven (Belgia) 306 obiektów *Musa* spp., co stanowi  $\frac{1}{4}$  światowych kolekcji banana (105). Stożki wzrostu wielu wegetatywnie rozmnażanych jednoliściennych roślin tropikalnych, np. *Cymbidium*, *Cymbopogon*, *Colocasia esculenta*, *Ananas sativus*, zamraża się z zachowaniem 50-90% żywotności oparte na standardowej procedurze wityfikacji (106). Krioprezerwacja jest z dużą skutecznością wykorzystywana również do eliminowania termolabilnych wirusów (6,7). W tym przypadku roztwory kriochronne, które zabezpieczają w czasie mrożenia wyłącznie skupiska komórek merystematycznych

oraz zawiązki liści, przyczyniają się tym samym do eliminowania komórek niemerystematycznych – zawirusowanych (31).

Stożki wzrostu pędów wykorzystuje się obecnie powszechnie do tworzenia banku tkanek ziemniaka (57,60,61,107). W Brunzwiku (Niemcy) użyto eksplantatów długości 0,5-4 mm, zawierających merystemy z dwoma – czterema zawiązkami liści. Stosując 10% DMSO, technikę kropli i bezpośrednie zanurzenie w LN, zgromadzono w ten sposób 519 obiektów reprezentujących 51 starych odmian ziemniaka (60). Średnia przeżywalność uzyskiwana po krioprezechowywaniu wynosi 68%, a zdolność do regeneracji roślin – 44%. Dla trzech kultywarów ziemniaka rozwinięto alternatywną metodę krioprezechowywania, wykorzystującą mrożenie stożków wzrostu kombinowaną metodą wityfikacji i kropli, uzyskując przeciętny rozwój pędów na poziomie 50% (61). W Limie (Peru), w Międzynarodowym Centrum Ziemniaka, używając zmodyfikowany roztwór wityfikacyjny (50% glikol etylenu : 15% sorbitol : 6% albumina wołowa wt%) i bezpośrednio zanurzając próby w LN, zgromadzono dotychczas 960 obiektów *Solanum* reprezentujących 197 genotypów, z zachowaniem 30-60% przeżywalności po mrożeniu (107). Przewiduje się, że kolekcja ziemniaka osiągnie tu w przyszłości liczbę 4000 obiektów.

Stożki wzrostu oraz pąki spoczynkowe są z powodzeniem wykorzystywane do krioprezechowywania licznych, ważnych gospodarczo roślin drzewiastych okrytonasiennych: *Malus*, *Pyrus*, *Prunus*, *Populus*, *Olea*, *Citrus* (105,108,109). W Fort Collins (USA) w postaci pąków spoczynkowych zgromadzono dotychczas 2100 obiektów *Malus*, zaś w Corvallis (USA) w postaci stożków wzrostu 100 obiektów *Pyrus* (105). W AFOCEL w Nangis (Francja) w LN przechowywane są 444 kloni reprezentowane przez trzy europejskie gatunki *Ulmus*: *U. minor*, *U. laevis* i *U. glabra* oraz ich mieszańce (110). Przy zastosowaniu techniki wityfikacji najniższa uzyskiwana przeżywalność wynosi około 50%. Zastosowanie kapsułkowania-dehydratacji dla roślin z rodzaju: *Malus*, *Pyrus* i *Prunus* pozwoliło na osiągnięcie przeżywalności na poziomie 80% (111). Wykorzystanie stożków wzrostu pięciu kultywarów *Malus domestica* i skomplikowanej procedury bazującej na 3-tygodniowym hartowaniu w temperaturze 5°C, traktowaniu 15% DMSO, metodzie kropli i powolnym schładzaniu (od 0,2°C min<sup>-1</sup> do -40°C), zapewniło przeżywalność pomiędzy 70 a 92% (58). Prace dotyczące wykorzystania zarodków somatycznych do przechowywania w LN okrytonasiennych roślin drzewiastych są nieliczne. Globularne i sercowate stadia zarodków somatycznych z elementami embriogenicznej tkanki kalusowej wykorzystano u *Quercus robur* (112). Stosując 3-dniowe traktowanie 0,3 M roztworem sacharozy i następnie PVS2 otrzymywano przeżywalność na poziomie 75%. Wczesne, liściennie stadia zarodków somatycznych posłużyły do opracowania procedury przechowywania drogą kapsułkowania 3 genotypów *Theobroma cacao* (113). Wydajność krioprezerwacji wahała się, w zależności od genotypu, na poziomie 25, 40 lub 72%. Do indukowania tolerancji na mróz i odwadniania zarodków somatycznych zwykle niezbędne okazuje się zastosowanie egzogenego ABA w połączeniu z podwyższonymi stężeniami cukrów (113,114). U drzew okrytonasiennych,

w przeciwieństwie do nagonasiennych, technikę powolnego schładzania stosuje się sporadycznie.

Wykorzystanie krioprezerwacji do przechowywania na dużą skalę materiału roślinnego pochodzącego z kultur *in vitro*, skupione jest głównie wokół roślin uprawnych, np. banana (32), ziemniaka (60), manioku (115), oliwki (101), czosnku (116), mięty (117), szparaga (59), pochrzynu (63), maliny (118) oraz drzewiastych nagoi okrytonasiennych. Rzadziej metody te stosowane są do zabezpieczania gatunków zagrożonych wyginięciem (119,120) czy ozdobnych (62,121). *Grevillea scapigera* jest ekstremalnie zagrożonym gatunkiem flory australijskiej, którą udało się uratować przed wyginięciem dzięki kulturom *in vitro*. Wyprowadzonych 9 klonów, zabezpieczonych techniką witrifikacji, zachowuje przeżywalność na poziomie 40-80% po przechowywaniu w LN (119). Zastosowanie standardowej procedury witrifikacji w roztworze PVS2 lub PVS2 bez DMSO, po uprzednim traktowaniu stożków wzrostu 0,4 M roztworem sorbitolu lub 0,8 M glicerolu, umożliwiło zabezpieczenie sześciu zagrożonych gatunków *Anigozanthos* spp. i *Conostylis* spp. z rodziny *Haemodoraceae* (120). Opisane procedury kriochrony chronionych gatunków flory australijskiej są obecnie stosowane w Ogrodzie Botanicznym w West Perth w Australii. Spośród procedur dotyczących krioprezerwacji roślin ozdobnych na uwagę zasługuje opracowanie uniwersalnej, skutecznej dla 9 kultywarów *Chrysanthemum morifolium* metody opartej na połączeniu technik witrifikacji i kropli, z zachowaniem żywotności na poziomie około 80% (62).

W Polsce krioprezerwacja wykorzystywana jest w Ogrodzie Botanicznym CZRB PAN w Warszawie do przechowywania nasion roślin chronionych (122), pąków spoczynkowych starych odmian jabłoni, zarodników i gametofitów paproci drzewiastych oraz embriogenicznych zawieszin komórkowych *Gentiana* spp. (35,83,84). W Zakładzie Genetyki Materiałów Wyjściowych Ziemniaka IHAR w Młochowie utworzono bank merystemów *Solanum tuberosum* (123). W Instytucie Dendrologii w Kórniku opracowano metodę embriogenicznej tkanki kalusowej *Quercus robur* (124), natomiast w IHAR Radzików opisano warunki krioprezerwacji kilku linii embriogenicznej tkanki kalusowej *Triticale* (125).

## 6. Stabilność materiału roślinnego po krioprezerwacji

Zmienność somaklonalną, której występowanie wykazano w kulturach *in vitro* (126), można zredukować przechowując tkanki w ciekłym azocie. Zablockowany metabolizm komórek w ultraniskiej temperaturze oraz brak pasaży wyraźnie ograniczają ryzyko genetycznej i epigenetycznej zmienności. Ciekły azot nie spowodował utraty żywotności i zdolności regeneracyjnych, przechowywanej przez 14 miesięcy, embriogenicznej tkanki kalusowej trzech genotypów trzciny cukrowej (96), czy stożków wzrostu 51 gatunków ziemniaka trzymany od 3 do 7 lat (60). Na podstawie przeprowadzonych badań fenotypowych i genotypowych dostarczane są dowody,

że otrzymane po krioprzechowywaniu regeneranty powtarzają cechy roślin matecznych (78,94,127-129). W fenotypowej analizie zregenerowanych roślin *Arabidopsis thaliana*, pochodzących z trzech różnych ekotypów, nie wykazano szkodliwego wpływu stosowanych „przedtraktowań” oraz mrożenia zawieszin w LN na morfologię regeneratów, tj. system korzeniowy, kwitnienie, zawiązywanie łuszczyń oraz liczbę nasion (78). Choć doniesienia nad badaniami w tym zakresie są ciągle jeszcze ograniczone, to dotychczasowy brak dowodów na morfologiczne, cytologiczne i genetyczne zmiany wynikające z krioprzechowywania są obiecujące (130).

## 7. Podsumowanie

W ochronie różnorodności biologicznej *ex situ* coraz częściej sięga się po nowoczesne metody, które daje biotechnologia. Łącząc technikę kultur *in vitro*, umożliwiającą intensywne rozmnażanie materiału roślinnego, z krioprezerwacją, pozwalającą na długoterminowe jego zabezpieczenie, możliwe jest obecnie tworzenie banków tkanek roślin rozmnażanych wegetatywnie. Nowe techniki krioprezerwacji opracowane w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku umożliwiły uniezależnić się od stosowania kosztownej aparatury do powolnego schładzania i otworzyły drogę do przechowywania w ciekłym azocie tkanek zorganizowanych oraz gatunków roślin, które nie wykazują tolerancji na niskie temperatury. Upraszczanie i standaryzacja procedur z jednoczesnym zachowaniem na wysokim poziomie przeżywalności i stabilności genetycznej, zapewniają większą uniwersalność zabiegu krioprezerwacji. Obecnie jest ona wykorzystywana dla około 100 gatunków roślin wyższych i licznych gatunków glonów (131) – zarówno w tworzeniu banków tkanek, jak i do zabezpieczenia samych kultur.

Coraz szersze zainteresowanie metodą krioprezerwacji materiału roślinnego przyczyniło się do stworzenia międzynarodowych programów badawczych (USDA, ang. *Foreign Agricultural Service 2001/2003*; CRYMCEPT, ang. *Establishing CRYopreservation Methods For Conserving European Plant T Germplasm Collections 2003/05*). Celem ich było znalezienie naukowych podstaw zachowania komórki roślinnej w warunkach stresowych, jak również wdrażanie metod i ocena problemów technicznych i praktycznych oraz wymiana doświadczeń. System międzynarodowej współpracy w zakresie poznawania zagadnień krioprezerwacji przyczynił się do utworzenia nowego wieloletniego programu o nazwie CRYOPLANET, który został uruchomiony w czerwcu 2006 r.

## Literatura

1. Grout B. W. W., (1995), *Genetic preservation of plant cells in vitro*, Ed. Grout B. W. W., 1-20, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
2. Engelman F., Engels J. M. M., (2002), *Managing Plant Genetic Diversity*, Eds. Engels J. M. M., Ramanatha Rao V., Brown A. H. D., Jackson M. T., 89-104, Wallingford and Rome, CAB International and IPGRI.

3. FAO (1997), *Report on the State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 83-135, <http://www.fao.org/ag/agp/AGPS/Pgrfa/pdf/swrfull.pdf>
4. Elleuch H., Gazeau C., David H., David A., (1998), *Plant Cell Rep.*, 18, 94-98.
5. Hitmi A., Sallanon H., Barthomeuf C., (1997), *Plant Cell Rep.*, 17, 60-64.
6. Brison M., de Boucaud M.-T., Pierronnet A., Dosba F., (1997), *Plant Science*, 123, 189-196.
7. Helliot B., Panis B., PouMay Y., Swennen R., Lepoivre P., Frison E., (2002), *Plant Cell Rep.*, 20, 1117-1122.
8. Luyet B. J., Gehenio P. M., (1938), *Biodynamica*, 42, 1-7.
9. Sakai A., (1956), *Low Temp. Sci. Ser. B*, 14, 17-23.
10. Sakai A., (1966), *Plant Physiology*, 41, 1050-1054.
11. Sakai A., Otsuka K., (1967), *Plant Physiology*, 42, 1680-1694.
12. Polge C., Smith A. U., Parkes A. S., (1949), *Nature*, 164, 666.
13. Lovelock J. E., Bishop W. H., (1959), *Nature*, 183, 1394-1395.
14. Quatrano R. S., (1968), *Plant Physiology*, 43, 2057-2061.
15. Latta R., (1971), *Can. J. Bot.*, 49, 1253-1254.
16. Nag K. K., Street H. E., (1973), *Nature*, 245, 70-72.
17. Withers L. A., (1979), *Plant Physiology*, 63, 460-467.
18. Meryman H. T., Williams R. J., (1985), *Cryopreservation of plant cells and organs*, Ed. Kartha K. K., 13-47, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
19. Pearce R. S., (1999), *Plant Growth Regulation*, 29, 47-76.
20. Fowler D. B., Gusta L. V., Tyler N. J., (1981), *Crop Sci.*, 21, 896-901.
21. Li Ch., Junttila O., Palva E. T., (2004), *Acta Physiol. Plantarum*, 26, 213-222.
22. Fujikawa S., Takabe K., (1996), *Protoplasma*, 190, 189-203.
23. Thomashow M. F., (1999), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 571-599.
24. Palva E. T., Thiharju S., Tamminen I., Puhakainen T., Laitinen R., Svensson J., Helenius E., Heino P., (2002), JIRCAS Working Report, 9-15, <http://ss.jircas.affrc.go.jp/kanko/Working%20Report/No23/02.pdf>
25. Hon W. Ch., Griffith M., Mlynarz A., Kwok Y. C., Yang D. S. C., (1995), *Plant Physiol.*, 109, 879-889.
26. Bian H-W., Wang J-H., Lin W-Q., Han N., Zhu M-Y., (2002), *Plant Physiol.*, 159, 1139-1145.
27. Hitmi A., Coudret A., Barthomeuf C., Sallanon H., (1999), *CryoLetters*, 20, 45-54.
28. Kalengamaliro N. E., Gana J. A., Cunningham S. M., Volenec J. J., (2000), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 61, 143-151.
29. Shibli R. A., Haagensohn D. M., Cunningham S. M., Berg W. K., Volenec J. J., (2001), *Plant Cell Rep.*, 20, 445-450.
30. Takagi H., (2000), *Cryopreservation of tropical plant germplasm*, Eds. Engelmann F., Takagi H., 178-193, *Current Research Progress and Application*, IPGRI, Rome, Italy.
31. Helliot B., Swennen R., Poumay Y., Frison E., Lepoivre P., Panis B., (2003), *Plant Cell Rep.*, 21, 690-698.
32. Panis B., Piette B., Swennen R., (2005), *Plant Sci.*, 168, 45-55.
33. Alpert P., Oliver M. J., (2002), *Desiccation and survival in plants: drying without dying*, Eds. Black M., Pritchard H. W., 3-43, CABI Publishing, Wallingford, Oxon.
34. Gnanapragasam S., Vasil I. K., (1992), *Plant Cell Rep.*, 11, 169-174.
35. Mikula A., Tykarska T., Kuraś M., (2005), *CryoLetters*, 26, 367-378.
36. Turner S. R., Senaratna T., Touchell D. H., Bunn E., Dixon K. W., Tan B., (2001), *Plant Sci.*, 160, 489-497.
37. Touchell D. H., Chiang V. L., Tsai C.-J., (2002), *Plant Cell Rep.*, 21, 118-124.
38. Touchell D. H., Turner S. R., Bunn E., Dixon K. W., (2002), *Cryopreservation of plant germplasm II*, Ed. Towill L. E., 50, 373-390, Springer, Berlin.
39. Burke M. J., (1986), *Membranes, metabolism and dry organisms*, Ed. Leopold A. C., 358-363, Cornell University Press, Ithaca, New York.
40. Jitsuyama Y., Suzuki T., Harada T., Fujikawa S., (2002), *CryoLetters*, 23, 103-112.

41. 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., 57-66, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
42. Engelmann F., (2004), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 40, 427-433.
43. Withers L. A., King P. J., (1980), *CryoLetters*, 1, 213-220.
44. Singh J., Miller R. W., (1985), *Cryopreservation of plant cells and organs*, Ed. Kartha K. K., 61-73, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
45. Mazur P., (1984), *American Journal of Physiology*, 247, C125-C142.
46. Touchell D. H., Dixon K. W., (1996), *In vitro conservation of plant genetic resources*, Eds. Normah M. N., Narimah M. K., Clyde M. M., 169-180, Plant Biotechnology Laboratory, Faculty of Life Sciences, University Kebangsaan, Malaysia.
47. Luyet B. J., (1937), *Biodynamica*, 29, 1-14.
48. Fahy G. M., McFarlane D. R., Angell C. A., Meryman H. T., (1984), *Cryobiology*, 21, 407-426.
49. Uragami A., Sakai A., Nagai M., Takahashi T., (1989), *Plant Cell Rep.*, 8, 418-421.
50. Langis R., Schnabel B., Earle E. D., Steponkus P. L., (1989), *CryoLetters*, 10, 421-428.
51. Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I., (1990), *Plant Cell Rep.*, 9, 30-33.
52. Sakai A., (2000), *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, Eds. Engelmann F., Takagi H., 1-7, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
53. Joshi A., Teng., (2000), *Plant Cell Rep.*, 19, 971-977.
54. Nishizawa S., Sakai A., Amano Y., Matsuzawa T., (1993), *Plant Science*, 91, 67-73.
55. Yongjie W., Engelmann F., Frattarelli A., Damiano C., Withers L. A., (1997), *CryoLetters*, 18, 317-324.
56. Fabre J., Dereuddre J., (1990), *CryoLetters*, 11, 413-126.
57. Schäfer-Menuhr A., Schumacher H. M., Mix-Wagner G., (1997), *Acta Hort.*, 447, 447-482.
58. Zhao Y., Wu Y., Engelmann F., Zhou M., Chen S., (1999), *CryoLetters*, 20, 109-112.
59. Mix-Wagner G., Conner A. J., Cross R. J., (2000), *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28, 283-287.
60. Mix-Wagner G., Schumacher H. M., Cross R. J., (2002), *CryoLetters*, 24, 33-41.
61. Halmagyi A., Deliu C., Coste A., (2005), *CryoLetters*, 26, 313-322.
62. Halmagyi A., Fischer-Klüver G., Mix-Wagner G., Schumacher H. M., (2004), *Plant Cell Rep.*, 22, 371-375.
63. Leunufna S., Keller E. R. J., (2003), *Plant Cell Rep.*, 21, 1159-1166.
64. Sakai A., (1997), *Conservation of Plant Genetic Resources In Vitro*, Eds. Razadan M. K., Oiyama I., 1, 53-66, General Aspects. Science Publishers Inc., Enfield, USA.
65. Panis B., Totté N., van Nimmen K., Withers L.A., Swennen R., (1996), *Plant Sci.*, 121, 95-106.
66. Engelmann F., (2000), *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, Eds. Engelmann F., Takagi H., 8-20, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
67. Suzuki M., Ishikawa M., Akihama T., (1998), *Plant Science*, 135, 69-76.
68. Berjak P., Walker M., Mycock D. J., Wesley-Smith J., Watt P., Pammenter N. W., (2000), *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, Eds. Engelmann F., Takagi H., 140-155, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
69. Cyr D. R., (1999), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, Eds. Jain S. M., Gupta P. K., Newton R. J., 4, 239-261, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Boston, London, the Netherlands.
70. Benson E. E., Reed B. M., Brennan R. M., Clacher K. A., Ross D. A., (1996), *CryoLetters*, 347-362.
71. Sherlock G., Block W., Benson E. E., (2005), *CryoLetters*, 26, 45-54.
72. Martínez D., Revilla M. A., Espina A., Jaimez E., García J. R., (1998), *Thermochimica Acta*, 317, 91-94.
73. Wang Q., Gafny R., Sahar N., Sela I., Mawassi M., Tanne E., Perl A., (2002), *Plant Science*, 162, 551-558.
74. Sadia B., Anthony P., Lowe K. C., Power J. B., Davey M. R., (2003), *Cellular & Molecular Biology Letters*, 8, 979-989.

75. Meijer E. G. M., Vaniren F., Schrijnemakers E., Hensgens L. A. M., Vanzijderveld M., Schilperort R. A., (1991), *Plant Cell Rep.*, 10, 171-174.
76. Reinhoud P. J., van Iren F., Kijne J. W., (2000), *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, Eds. Engelmann F., Takagi H., 91-102, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
77. Bachiri Y., Bajon C., Sauvanet A., Gazeau C., Morisset C., (2000), *Protoplasma*, 214, 227-243.
78. Ribeiro R. C. S., Jekkel Z., Mulligan B. J., Cocking E. C., Power J. B., Davey M. R., Lynch P. T., (1996), *Plant Science*, 115, 115-121.
79. Bachiri Y., Gazeau C., Hansz J., Morisset C., Dereuddre J., (1995), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 43, 241-248.
80. Winkelmann T., Mußmann V., Serek M., (2004), *Plant Cell Rep.*, 23, 1-8.
81. Chen Y., Wang J-H., (2002), *CryoLetters*, 24, 57-64.
82. Tsukazaki H., Mii M., Ishikawa K., (2000), *Plant Cell Rep.*, 19, 1160-1164.
83. Mikula A., Fiuk A., Rybczyński J. J., (2005), *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.*, 47, 227-236.
84. Mikula A., (2006), *CryoLetters* (submitted).
85. Reinhoud P. J., Schrijnemakers W. M., van Iren F., Kijne J. W., (1995), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 42, 261-267.
86. Kobayashi T., Niino T., Kobayashi M., (2005), *Plant Biotechnology*, 22, 105-112.
87. Gazeau C., David A., Morisset C., (1998), *CryoLetters*, 19, 147-159.
88. 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.
89. Ishikawa M., Tandon P., Suzuki M., Yamaguishi-Ciampi A., (1996), *Plant Science*, 120, 81-88.
90. Panis B., Schoofs H., Remy S., Sági L., Swennen R., (2000), *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, Eds. Engelmann F., Takagi H., 103-109, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
91. Watanabe K., Steponkus P. L., (1995), *CryoLetters*, 16, 255-262.
92. Watanabe K., Kuriyama A., Kawai F., Kanamori M., (1999), *CryoLetters*, 20, 377-382.
93. Zhang Y-X., Wang J-H., Bian H-W., Zhu M-Y., (2001), *CryoLetters*, 22, 221-228.
94. Hao Y-J., You Ch-X., Deng X-X., (2002), *CryoLetters*, 23, 27-35.
95. Bhatti M. H., Percival T., Davey C. D. M., Henshaw G. C., Blakesley D., (1997), *Plant Cell Rep.*, 16, 802-806.
96. Martínez-Montero M. E., González-Arno M. T., Borroto-Nordelo C., Puentes-Díaz C., Engelmann F., (2000), *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, Eds. Engelmann F., Takagi H., 110-114, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
97. Park Y-S., (2002), *Ann. For. Sci.*, 59, 651-656.
98. Cyr D. R., (2000), *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, Eds. Engelmann F., Takagi H., 261-268, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
99. Wilkinson T., Wetten A., Prychid Ch., Fay M. F., (2003), *Ann. Bot.*, 91, 65-74.
100. Sarkar D., Naik P. S., (1998), *Ann. Bot.*, 82, 455-461.
101. Lambardi M., Lynch P. T., Benelli C., Mehra A., Siddika A., (2002), *Adv. Hort. Sci.*, 16, 165-174.
102. Tessereau H., Florin B., Meschine M. C., Thierry C., Pétiard V., (1994), *Ann. Bot.*, 74, 547-555.
103. Martínez D., Tamés R. S., Revilla M. A., (1999), *Plant Cell Rep.*, 19, 59-63.
104. Thinh N. T., Takagi H., Yashima S., (1999), *CryoLetters*, 20, 163-174.
105. Panis B., Lambardi M., (2005), *The role of biotechnology*, 43-54. Electronic forum on biotechnology in Food and Agriculture. International workshop, 5-7 March 2005, Turin, Italy <http://www.fao.org/Biotech/torino05.htm>
106. Thinh N. T., Takagi H., Sakai A., (2000), *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current Research Progress and Application*, Eds. Engelmann F., Takagi H., 227-232, IPGRI, Rome, Italy.
107. Golmirzaie A. M., Panta A., (2000), *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, Eds. Engelmann F., Takagi H., 250-254, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

108. Towill L. E., (2002), *Biotechnology in agriculture and forestry: cryopreservation of plant germplasm II*, 3-21, Eds. Towill L. E., Bajaj Y. P. S., Springer-Verlag, Berlin.
109. Wang Z. C., Deng X. X., (2004), *CryoLetters*, 25, 43-50.
110. Harvengt L., Meier-Dinkel A., Dumas E., Collin E., (2004), *Can. J. For. Res.*, 34, 43-55.
111. Lambardi M., de Carlo A., (2003), *Micropropagation of woody trees and fruit*, Eds. Jain S. M., Ishii K., 815-840, Kluwer Ac. Pub., Dordrecht.
112. Martínez M. T., Ballester A., Vieitez A. M., (2003), *Cryobiology*, 46, 182-189.
113. Fang J-Y., Wetten A., Hadley P., (2004), *Plant Science*, 166, 669-675.
114. Dumet D., Engelmann F., Chabrilange N., Duval Y., Dereuddre J., (1993), *CryoLetters*, 14, 243-250.
115. Roca W. M., Escobar R. H., Mafla G., Fregene M., (2000), *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, Eds. Engelmann F., Takagi H., 273-279, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
116. Kim H. H., Cho E. G., Baek H. J., Kim C. Y., Keller E. R. J., Engelmann F., (2004), *CryoLetters*, 25, 59-70.
117. Towill L. E., Bonnart R., (2003), *CryoLetters*, 24, 341-346.
118. Wang Q., Laamanen J., Uosukainen M., Valkonen J. P. T., (2005), *Plant Cell Rep.*, 24, 280-288.
119. Touchell D. H., (2000), *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, Eds. Engelmann F., Takagi H., 269-272, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
120. Turner S. R., Senaratna T., Bunn E., Tan B., Dixon K. W., Touchell D. H., (2001), *Ann. Bot.*, 87, 371-378.
121. Dumet D., Grapin A., Bailly Ch., Dorion N., (2002), *Plant Science*, 163, 1121-1127.
122. Muranyi R., Niedzielski M., Puchalski J., (1995), *Biuletyn Ogrodów Botanicznych*, 4, 65-70.
123. Kryszczuk A., (2005), praca doktorska, Zakład Genetyki i Materiałów Wyjściowych Ziemiaka IHAR, 1-81.
124. Chmielarz P., Grenier-de March G., de Boucaud M-T., (2005), *CryoLetters*, 26, 349-355.
125. Sowa S., Oleszczuk S., Zimny J., (2005), *Acta Physiol. Plantarum*, 27, 237-243.
126. Larkin P. J., Scowcroft W. R., (1981), *Theor. Appl. Gen.*, 60, 197-214.
127. Côte F. X., Goue O., Domergue R., Panis B., Jenny C., (2000), *CryoLetters*, 21, 19-24.
128. Dixit S., Mandal B. B., Ahuja S., Srivastava P. S., (2003), *CryoLetters*, 24, 77-84.
129. Hirai D., Sakai A., (2000), *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, Eds. Engelmann F., Takagi H., 205-211, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
130. Harding K., (2004), *CryoLetters*, 25, 3-22.
131. Harding K., Johnston J., Benson E., (2005), *Contributing to a Sustainable Future*, Eds. Bennett I. J., Bunn E., Clarke H., McComb J. A., 112-120, Proceedings of the Australian Branch of the IAPTC&B, Perth, Western Australia (21-24<sup>th</sup> September).