

Sposoby przechowywania materiału roślinnego w kulturach *in vitro*

Roman Marecik

Paweł Króliczak

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Akademia Rolnicza
Poznań

Roślinne kultury *in vitro* stanowią prężnie rozwijającą się dziedzinę biotechnologii. Znajdują one szerokie zastosowanie w badaniach nad fizjologią komórki, w biologii molekularnej, inżynierii genetycznej, genetyce oraz innych działach nauki. Kultury *in vitro* mają również duże znaczenie w hodowli oraz wegetatywnym rozmnażaniu roślin uprawnych i ozdobnych (1). Szybko zwiększająca się ilość genotypów utrzymywanych w kulturach *in vitro* zmusza badaczy do opracowania skutecznych metod ich przechowywania. Szczególnie ważna, jak się wydaje, jest ochrona roślin, którym w skutek zmian ich środowiska naturalnego grozi wyginięcie. Dotyczy to również prymitywnych, „dzikich” szczepów roślin uprawnych, które często stanowią cenne źródło genów, np. odporności na choroby, suszę itp. w wyprowadzaniu nowych odmian. Przechowywanie nasion takich roślin jest często niepraktyczne, a czasami wręcz niemożliwe ze względu na ich krótką żywotność (od jednego do kilku tygodni), czy zmieniającą się jakość materiału siewnego w trakcie suszenia i przechowywania, a co za tym idzie, konieczność częstej regeneracji roślin i otrzymywania nowych nasion. Dużą niedogodnością jest także utrzymywanie nasion związane z dojrzałością roślin, która np. w przypadku drzewiastych, osiągnięta jest po upływie kilku czy kilkunastu lat (2). Także utrzymywanie kolekcji *in situ* (polowe banki genów) jako długoterminowego sposobu zachowania stwarza wiele problemów. Plantacje takie narażone są na działanie wielu niekorzystnych czynników, takich jak: choroby, szkodniki czy naturalne kataklizmy.

Utrzymywanie komórkowych czy tkankowych kultur *in vitro* w warunkach normalnego wzrostu jest już traktowane jako metoda krótkoterminowego przechowywania materiału biologicznego. Jednakże tkanka rosnąca w optymalnych warunkach wymaga częstego przenoszenia na świeże podłoże co może powodować zmiany w stabilności genetycznej komórki. Zmienność w kulturach *in vitro* często określa się jako zmienność somaklonalną, która powodowana jest zarówno zmianami w genotypie rośliny jak i czynnikami epigenetycznymi. Częste pasażowanie zwiększa także zagrożenie zakażeniami mikrobiologicznymi, wymaga zwiększonego nakładu pracy oraz podnosi koszty procesu (1,3).

Duże nadzieje pokłada się w możliwości przechowywania materiału biologicznego w postaci kultur *in vitro*, do tego celu wykorzystuje się takie ich formy jak: kultury merystemów, kalus, zawiesiny komórek, zygocytne i somatyczne embriony, pyłek, protoplasty. Spośród przeprowadzonych doświadczeń, wiele zostało uwieńczone sukcesem (tab. 1).

1. Metody krótko- i średnioterminowe

1.2. Metoda ograniczonego wzrostu

Jest to metoda, w której poprzez spowolnienie wzrostu wydłuża się czas hodowli, a tym samym częstotliwość przenoszenia kultury na świeżą pożywkę jest wielokrotnie mniejsza, aniżeli w przypadku optymalnego wzrostu. Znalazła ona zastosowanie jako metoda krótko- i średnioterminowego przechowywania uorganizowanych kultur tzn. tkanek i organów, jednakże po dłuższym okresie może prowadzić do niepożądanych selekcji, spowodowanych stresowymi warunkami hodowli (3). Ograniczenie wzrostu można osiągać różnymi metodami. Najczęściej modyfikuje się stężenia składników mineralnych oraz cukrów w pożywce, obniża temperaturę hodowli, zmniejsza intensywność światła. Dobre efekty daje także modyfikacja atmosfery (zmniejszenie ilości O_2), w której wzrasta tkanka, czy też pokrycie komórek warstwą oleju mineralnego. Powszechnie stosuje się również ABA (kwas abscysynowy) oraz mannitol jako retardanty wzrostu kultur roślinnych (4,5). Umetsu i wsp. (6) przechowywali w temperaturze $4^\circ C$ embriogenną kulturę zawiesinową kopru włoskiego (*Foeniculum vulgare* Miller). Po 6 tygodniach takiego przechowywania komórki w dalszym ciągu wykazywały swój embriogenny charakter, jednakże traciły go po 12 tygodniach. Kultury zawiesinowe lawendy wąskolistnej (*Lavendula vera*) oraz tytoniu szlachetnego (*Nicotiana tabacum*) Takahashi i wsp. (7) przechowywali w szczelnie zamkniętych butelkach szklanych. Hodowlę prowadzono w zaciemnieniu, w temperaturze $4^\circ C$. Po 30 dniach tak prowadzonej kultury komórki lawendy zdolne były do pełnego wzrostu, a także zachowały zdolność do produkcji niebieskiego barwnika będącego ich specyficznym metabolitem wtórnym. Kapsułkowanie komórek w alginianie wapnia wydłużało możliwość przechowywania ich do ponad 50 dni. Pozytywny wpływ otoczek alginianowych potwierdza także Engelman (4) oraz Shigeta (8), który przechowywał umieszczone w alginianowych otoczkach somatyczne embriony marchwi. Embriony zachowywały 95% żywotność po 3 miesiącach hodowli w $4^\circ C$, w pełnym zaciemnieniu.

2. Metody długoterminowe

2.1. Krioprezerwacja

Krioprezerwacja jest najszerzej opisywaną i najczęściej stosowaną metodą długoterminowego przechowywania materiału roślinnego w kulturach *in vitro*. Jest ona podstawową metodą przechowywania somatycznych embrionów, kultur zawieszinowych i kalusa. Krioprezerwacja polega na zamrożeniu materiału biologicznego i przechowywaniu go w bardzo niskich temperaturach, najlepiej w temperaturze ciekłego azotu (*liquid nitrogen* — LN), tj. w -196°C lub w jego oparach ok. -150°C (3). W tej temperaturze ustają wszelkie podziały komórkowe, a procesy metaboliczne ulegają zatrzymaniu. Materiał może być przechowywany w niezmienionym stanie, teoretycznie przez nieograniczony czas. Największym zagrożeniem dla mrożonej tkanki jest powstawanie i wzrost kryształów lodu. Przyczyną tych zagrożeń jest duża ilość wody występująca w komórkach. Komórki roślinne zawierają duże ilości wody, znacznie większe aniżeli komórki zwierzęce czy bakteryjne (9). Jest to woda wolna oraz woda związana, strukturalna. Woda strukturalna, stanowiąca integralną część biopolimerów komórki, w warunkach niskiej temperatury nie zamarza, podczas gdy woda wolna w czasie mrożenia tworzy wewnątrzkomórkowe kryształy lodu, które mogą uszkadzać struktury komórkowe. Uszkodzenia te polegają na fizycznym rozerwaniu błon komórkowych, szczególnie plazmalemy, oraz na zmianach chemicznych dotyczących głównie DNA i białek. Podczas odprowadzania ciepła z cieczy jej temperatura obniża się, w efekcie czego maleje energia ruchu jej cząsteczek. Powstaje taki stosunek energii ruchu i wielkości ładunków polarnych, przy którym odbywa się wzajemna orientacja cząstek. Z pewnej ilości trwale związanych i właściwie zorientowanych molekuł powstają centra krystalizacji, gdzie następuje dalsze porządkowanie cząstek z otaczającej cieczy i wzrost kryształów. Czynnikiem dającym początek niszczącym efektom mrożenia, a pojawiającym się jeszcze przed powstawaniem lodu we wnętrzu komórki, są zewnątrzkomórkowe kryształki lodu. Najpierw odwadniają one komórkę, a następnie mogą wnikać do jej wnętrza, indukując tam powstawanie lodu. Ilość i wielkość powstających kryształków zależy od szybkości mrożenia. Mechanizm powstawania i niszczącego działania lodu został opisany przez Popova (9) i Karlsona (10).

Zaobserwowano zjawisko naturalnej, uwarunkowanej genetycznie odporności na niskie temperatury. Rośliny posiadające zdolność przystosowania się do niskich temperatur wytwarzają pod ich wpływem różne metabolity, pośrednio lub bezpośrednio wpływające na przeżywalność. Tego typu aklimatyzacja niektórych roślin wynika z ich przystosowania do sezonowych zmian temperatury. Sugeruje to możliwość przeprowadzenia takich manipulacji warunkami kultury, aby również w warunkach *in vitro* pojawiła się naturalna odporność na obniżoną temperaturę. Dotyczy to jednak niewielkiej liczby gatunków roślin. Większość gatunków nie posiada takiego mechanizmu i wymagają one stosowania krioprotektantów indukujących sztuczną odporność

na niskie temperatury. Odpowiednia mieszanina związków ochronnych zmniejsza aktywność wody w komórce i wpływa na prawidłowy stan plazmalemmy. Zapobiega to wnikaniu zewnątrzkomórkowego lodu do wnętrza komórki, obniża punkt zamarzania, a także chroni przed szkodliwym działaniem zwiększonego stężenia elektrolitów będącego efektem konwersji wody w lód. Idealne krioprotektanty powinny działać ochronnie na komórki podczas ich mrożenia i przechowywania w bardzo niskiej temperaturze oraz podczas rozmrażania. Istnieją dwa rodzaje krioprotektantów: wnikające do komórki, oraz nie przenikające przez błony komórkowe. Do pierwszej kategorii należą np. DMSO (*dimethyl sulfoxide*, sulfotlenek dwumetylu), glicerol czy glikol propylenowy. Przenikając przez membrany komórkowe chronią komórkę od wewnątrz, jednakże zbyt wysokie stężenia tych związków mogą działać toksycznie. Szybkość przenikania tych krioprotektantów zależy od gatunku rośliny oraz od temperatury inkubacji. Drugą kategorię stanowią cukry, wysokocząsteczkowe alkohole, glikol polietylenowy, glikol etylenowy i dekstran. Najbardziej kompleksową ochronę zapewnia mieszanina związków z obu kategorii, zwykle w stężeniu 1-2 M, aby nie powodowały nagłej plazmolizy, mogącej jeszcze przed mrożeniem doprowadzić do śmierci komórek.

Robertson (11) wykazał, że obecność ABA (kwas absycynowy) w pożywce, na której hodował on kulturę zawiesinową *Bromus inermis* (Leyess) powoduje wzrost tolerancji komórek na zamrażanie. ABA indukował ekspresję genów odpowiedzialnych na poziomie molekularnym za zwiększanie tolerancji na proces krioprezerwacji. Stwierdził on, że w komórkach inkubowanych z ABA występuje 15 białek, których brak jest w materiale roślinnym nie poddanym inkubacji. Do związków zwiększających odporność komórek na mrożenie należą także aminokwasy, przede wszystkim prolina oraz walina, glicyna, treonina, które wpływają stabilizująco na białka enzymatyczne i białka membran komórkowych (12).

Na procesy krioprezerwacji składają się głównie trzy etapy: przygotowawczy (ang. *pretreatment*), zamrażanie, przechowywanie, rozmrażanie (ang. *the freeze-thaw cycle*) oraz regeneracja kultury (ang. *post-treatment*). W pierwszym etapie komórki lub organy hoduje się w określonych warunkach w celu zwiększenia odporności na mrożenie. Zmienia się temperaturę, intensywność światła czy modyfikuje podłoże zmieniając stężenie sacharozy, regulatorów wzrostu lub stosując dodatkowe substancje, tj. mannitol, sorbitol, DMSO (5,13). Kolejną fazą tego etapu jest inkubacja materiału biologicznego w roztworze krioprotektantów przed bezpośrednim zamrożeniem. Ważnym czynnikiem wpływającym na przeżywalność komórek jest także dobranie odpowiedniej fazy wzrostu kultury poddawanej krioprezerwacji. Mrożenie w zależności od metody krioprezerwacji może polegać na stopniowym ochładzaniu (około 0,2-1°C/min) lub bezpośrednim umieszczeniu tkanek w temperaturze ciekłego azotu. Równie istotnym, jak sam proces zamrażania, jest rozmrażanie próbek. Powolne rozmrażanie może doprowadzić do zwiększenia kryształów lodu wewnątrz komórek, które są tak samo niebezpieczne dla struktur komórkowych jak kryształki podczas zamrażania. Aby temu zapobiec próbki zwykle umieszcza się w łaźni wodnej o temperaturze 35-40°C (12). W etapie

regeneracji następuje usunięcie krioprotektantów oraz „odzyskiwanie” przez komórki ich pierwotnego wigoru. Etap ten trwa zwykle od 1 dnia do 1 tygodnia. Podczas tego okresu kultura wymaga czasami modyfikacji pożywki oraz zmiany rodzaju lub koncentracji hormonów w celu utrzymania żywotności i zainicjowania wzrostu (2).

Efektywność procesu krioprezerwacji szacuje się przez obserwację wzrostu komórek, oznaczanie świeżej bądź suchej masy lub przez pomiar aktywności biochemicznej komórek: określanie ilości ATP, DNA, białka i aminokwasów, ilości powstającego etylenu, określanie poziomu aktywności dehydrogenaz przy użyciu TTC (ang. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) czy wybarwienie dwuoctanem fluoresceiny (14). Żywotność można też oznaczać poprzez badanie integralności membran lub obecności cytoplazmy w komórce, robiąc to za pomocą różnego rodzaju barwników, np. fenylosafraniny, błękitu Trypanu (ang. *Tryphan blue*) lub błękitu Evansa (ang. *Evans blue*) (15). Najlepszym sposobem sprawdzenia efektywności danej metody przechowywania materiału roślinnego jest bez wątpienia jego całkowita regeneracja. Jednakże proces ten jest długotrwały i wymaga aseptycznych warunków. Dodatkowo martwe komórki mogą hamować wzrost tych, które przeżyły poprzez uwalnianie toksycznych związków.

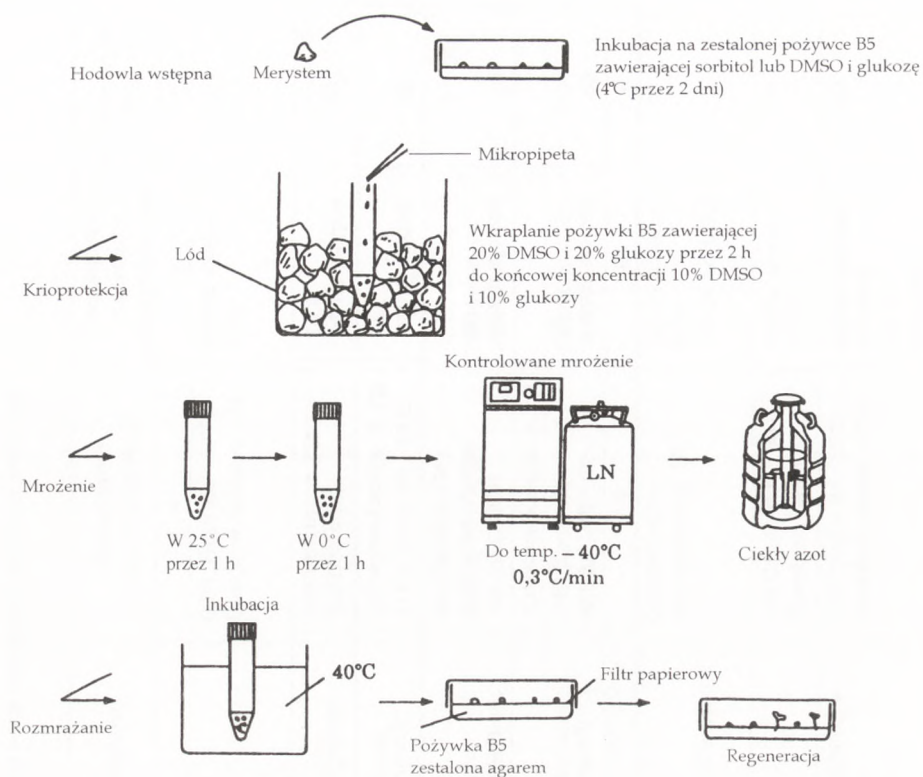
3. Konwencjonalne metody krioprezerwacji

Tradycyjna metoda krioprezerwacji jest często nazywana także wolnym mrożeniem lub zamrażaniem dwustopniowym, ze względu na jej dwuetapowy przebieg (rys. 1). W pierwszej fazie następuje stopniowe schładzanie materiału biologicznego do temperatury -30 , -40°C , a następnie przeniesienie go w temperaturę ciekłego azotu. W metodzie tej dehydratacja komórek odbywa się przez powstawanie i wzrost kryształów lodu w otaczającym je medium. Podczas odpowiednio wolnego mrożenia ($0,2-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) kryształki lodu powstające w medium powodują wzrost gradientu stężeń pomiędzy roztworem cytoplazmy komórki a pożywką, wymuszając wypływ wody z komórki. Postępująca dehydratacja komórek prowadzi do zagęszczenia cytoplazmy, co obniża temperaturę zamrażania i powoduje powstawanie małych kryształków lodu nie niszczących struktur komórkowych (4). Ochrona przed tworzeniem wewnątrzkomórkowego lodu uzależniona jest zarówno od wewnętrznych parametrów komórki, tj. obecności i skuteczności jąder krystalizacji, stabilności membran cytoplazmatycznych uniemożliwiających przenikanie zarodków kryształów, stosunku powierzchni do objętości komórek, jak i dostosowania odpowiednich warunków procesu, tj. doboru krioprotektantów i ich stężenia, szybkości mrożenia, minimalnej temperatury do której schładza się próby (2). Dużym mankamentem tej metody jest stosunkowo wysoka cena zamrażarek umożliwiających kontrolowanie szybkości ochładzania tkanki. Z tego względu opracowano uproszczone metody nie wymagające kosztownej aparatury. Nishizawa (16) z powodzeniem stosował uproszczoną metodę krioprezerwacji do przechowywania embriogennej kultury zawieszinowej komórek

TABELA 1
 PRZYKŁADY KRIOPREZERWACJI RÓŻNYCH FORM ROŚLINNYCH KULTUR IN VITRO (25)

Gatunek	Materiał	Preinkubacja i krioprotektanty	Zamrażanie i przechowywanie	Rozmrażanie i usuwanie krioprotektantów	Przeżywalność (%)
1	2	3	4	5	6
<i>Asparagus officinalis</i>	merystemy wierzchołkowe	4% DMSO + 3% glukoza 2 dni preinkubacji. Zamrażanie w 11% DMSO	0,5°C/min do -40°C. Przechowywanie w LN	łaźnia wodna 40°C	100
<i>Asparagus officinalis</i>	somatyczne embryony (stadium globularne)	12% EG + 0,5 M sorbitol 22°C przez 10 min. Wkrapianie PVS1 0°C, 10 min PVS1 0°C, 10 min	bezpośrednie zanurzenie w LN	łaźnia wodna 22°C	48
<i>Brassica napus</i>	embryony mikrospor (stadium torpeda)	0,75 M sacharoza 1 dzień preinkubacji, kapsułkowanie. Suszenie laminarnym przepływem powietrza	bezpośrednie zanurzenie w LN	w powietrzu temperatura pokojowa	83
<i>Brassica olerace</i>	merystemy wierzchołkowe	pozyskiwane zimą (temp. minimum -3°C), 3% glukoza + 1,5 M DMSO 20°C, 2 h	0,5°C/min do -40°C. Przechowywanie w LN	łaźnia wodna 40°C	93
<i>Brassica campestris</i>	kultura zawieszinowa	1,5 M EG + 3% sacharozy 0°C, 90 min, następnie, 7 M EG + 0,88 M sorbitol 0°C 3 min	bezpośrednie zanurzenie w LN	łaźnia wodna 20°C 1,5 M sorbitol	40
<i>Daucus carota</i>	kultura zawieszinowa	zamrażanie w 5% DMSO	1-2°C/min do -100°C. Przechowywanie w LN	łaźnia wodna 37°C	65
<i>Daucus carota</i>	protoplasty	zamrażanie w 10% (v/v), DMSO + 20% (v/v) glukozy	1-2°C/min do -35°C. Przechowywanie w LN	łaźnia wodna 30-40°C 0,4 M mannitol	40

1	2	3	4	5	6
<i>Fragaria × ananassa</i>	merystemy	5% DMSO, 2 dni preinkubacji. Zamrażanie w 5% DMSO	0,84°C/min do -40°C. Przechowywanie w LN	łaznia wodna 37°C	6
<i>Lycopersicon esculenta</i>	merystemy	zamrażanie w 10-15% DMSO	22-55°C/min. Przechowywanie w oparach LN	łaznia wodna 40°C	30
<i>Pisum sativum</i>	merystemy	5% DMSO, 2 dni preinkubacji. Zamrażanie w 5% DMSO	0,6°C/min do -40°C. Przechowywanie w LN	łaznia wodna 37°C	60
<i>Cucumis melo</i>	somatyczne embryony	10 mg/l ABA + 50 g/l sacharoza. Suszenie do 50-65% RH	bezpśrednie zanurzenie w LN	łaznia wodna 40°C	65



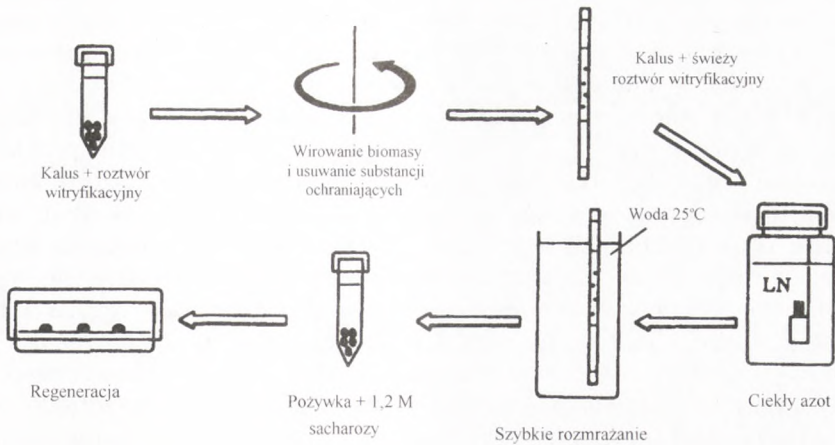
Ryc. 1. Konwencjonalna metoda mrożenia dla merystemów *Trifolium repens* L. (21).

asparagusa (*Asparagus officinalis* L.). Po preinkubacji w podłożu o wysokim stężeniu glicerolu i sacharozy umieszczał on zawiesinę w temperaturze -30°C , a po upływie jednej godziny przenosił komórki do ciekłego azotu. Traktowane w ten sposób komórki przeżywały w 80%. Również 80% przeżywalność uzyskał Lecounteux i wsp. (17) stosując podobną metodę krioprezerwacji somatycznych embrionów marchwi (*Daucus carota* L.). Dobre efekty uzyskał Niino (18) zamrażając wierzchołki pedów morwy (*Morus bombycis* Koiz.). Stosował on skokowe (co 5°C) obniżanie temperatury od 0 do -20°C przed zanurzeniem prób w ciekłym azocie.

4. Nowe techniki krioprezerwacji

4.1. Witryfikacja

Witryfikacja to stosunkowo niedawno odkryta metoda przechowywania materiału biologicznego w niskich temperaturach. Określa się ją jako metodę jednostopniową, ponieważ polega na szybkim schłodzeniu tkanki przez bez-



Ryc. 2. Schemat witrifikacji.

pośrednie zanurzenie w ciekłym azocie. Ma to duże znaczenie ze względów ekonomicznych, gdyż eliminuje potrzebę kontrolowania mrożenia, znacznie zmniejszając koszty. Istota witrifikacji polega na transformacji fazy ciekłej w stan „zeszklenia” (amorficzny stan, przypominający strukturą szkło), który obejmuje zarówno wnętrze komórki jak i roztwór zewnętrzny. Proces ten zachodzi w obecności bardzo wysokich stężeń substancji ochronnych sięgających 5-8 M (2,19). Tak wysokie stężenie krioprotektantów prowadzi do usunięcia z komórki 90% wolnej wody co powoduje podwyższenie koncentracji roztworu cytoplazmy, która jest wymagana do uzyskania efektu witrifikacji. Stan witrifikacji może niekiedy zostać osiągnięty bez użycia środków ochronnych, z zastosowaniem tylko ultraszybkiego ochładzania (10^5 °C/min). W praktyce jednak stosuje się kombinację środków ochronnych z umiarkowanie szybkim ochładzaniem (10-2000°C/min) (20). Wysoka koncentracja roztworu witrifikacyjnego powoduje, że działa on toksycznie na komórki, tym bardziej, że jego część wnika do ich wnętrza. W związku z tym inkubację przeprowadza się często dwuetapowo. W pierwszym etapie stosuje się niższą koncentrację roztworu witrifikacyjnego (stężenie „wprowadzające”, ang. *loading*), a dopiero później, bezpośrednio przed umieszczeniem prób w ciekłym azocie, dany roztwór w pełnym stężeniu (2,19,13). Witrifikację z powodzeniem stosuje się do przechowywania: merystemów (21-24), embriogennych kultur kalusowych (25,26), kultur zawieszinowych (12, 27) czy komórek (28). Schemat przebiegu procesu witrifikacji przedstawiono na rysunku 2.

4.2. Mrożenie kapsułkowanego materiału roślinnego

W pracach mających na celu stworzenie metody długoterminowego przechowywania zakapsułkowanego materiału roślinnego wskazuje się, że metodę

tę można z powodzeniem stosować w krioprezerwacji somatycznych embriónów oraz merystemów (uorganizowanych struktur). Umieszczane w alginianowych kapsułkach merystemy trzciny cukrowej (*Saccharum officinarum*), manioku (*Manihot esculenta*) i kawy (*Coffea racemosa*, *Coffea sessiliflora*) krioprezerwował Egelman i wsp. (29). Otoczkowane merystemy inkubowano w płynnej pożywce o wysokim stężeniu sacharozy, a następnie poddawano suszeniu w kabinie o laminarnym przepływie powietrza. Wysuszone kapsułki z zaimmobilizowanym materiałem roślinnym zamrażano w ciekłym azocie. W metodzie tej nie zachodzi konieczność stosowania dodatkowych krioprotektantów, a mrożone w ten sposób merystemy charakteryzują się wysoką przeżywalnością. Otoczkowane embriony rzepaku (*Brassica napus* L.) preinkubowane w obecności sacharozy, a następnie suszone i zamrażane przeżywały nawet w 95% (30). 70% przeżywalność uzyskał Niino i wsp. (31) traktując w podobny sposób zakapsułkowane w alginianie wierzchołki pędów (*Morus bombycis*, *Malus domestica*, *Malus paradisica*, *Pyrus communis*).

4.3. Suszenie

Przechowywanie materiału roślinnego o zmniejszonej zawartości wody stanowi alternatywę dla krioprezerwacji i innych metod utrzymywania kultur *in vitro*. Od niedawna dużym zainteresowaniem cieszy się możliwość przechowywania somatycznych embriónów w postaci wysuszonej. Opracowanie odpowiednich warunków hodowli i suszenia somatycznych embriónów rysuje perspektywę wyprodukowania „sztucznych nasion”. Zrewolucjonizowałyby one niektóre gałęzie rolnictwa, np. nasiennictwo, hodowlę czy ochronę roślin, a oprócz tego poważnie obniżyłyby nakłady związane z kwalifikacją, czyszczeniem, suszeniem, magazynowaniem, a także zaprawianiem nasion.

Znaczną przeszkodą ograniczającą stosowanie tej metody jest wrażliwość tkanki na suszenie. Tertteroo i wsp. (32) indukował tolerancją na suszenie w somatycznych embriónach marchwi (*Daucus carota* L.). Największą tolerancją cechowały się embriony w stadium torpeda, preinkubowane w ABA. Nie bez znaczenia pozostawała też szybkość suszenia oraz sposób rehydratacji. Najlepszą efektywność (100% przeżywalność) uzyskano susząc tkankę z prędkością $0,05\text{g H}_2\text{Og}^{-1}\text{SM/dobę}$. Wpływ szybkości suszenia oraz preinkubacji somatycznych embriónów lucerny (*Medicago sativa* L.) na pożywce z ABA potwierdza w swojej pracy Senaratna i wsp. (33). Również w tym przypadku wolne suszenie preinkubowanych z ABA embriónów dawało 100% przeżywalności. Lecouteux i wsp. (34) przechowywał wysuszone somatyczne embriony marchwi przez 8 miesięcy, w warunkach zaciemnienia, w obniżonej do $+4^\circ\text{C}$ temperaturze i 45% wilgotności względnej. Także po tak długim przechowywaniu embriony kiełkowały w 100%. Preinkubowane na pożywce z ABA (0,13 mg/l), kapsułkowane w alginianie embriony marchwi suszył Liu i wsp. (35). 97% embriónów odwodnionych o 88% zachowywało zdolność do kiełkowania po rehydratacji. Zwiększenie stężenia ABA powyżej 0,13 mg/l obniżało tolerancję na suszenie. Możliwość przechowywania somatycznych embriónów marchwi otoczkowanych syntetycznym polimerem Polyox WSR-N

750 badań Janick i wsp. (36). Jednakże suszenie tak traktowanych embriónów powodowało 97% spadek przeżywalności.

5. Podsumowanie

Roślinne kultury *in vitro* są wciąż marginalnie wykorzystywanymi technikami w konserwacji zasobów genetycznych. W przedstawionych przykładach wskazuje się jednak na duże możliwości zastosowania tych technik dla średnio- i długoterminowego przechowywania materiału roślinnego. Nie udało się, jak dotąd, opracować uniwersalnej metody konserwacji dla wszystkich form kultur *in vitro*. Zachodzi także konieczność szczegółowego określania warunków procesu dla poszczególnych gatunków czy nawet odmian roślin. Pokonanie tych przeszkód wymaga dalszych badań i jest niezbędne dla pełnego zastosowania wymienionych technik.

Literatura

1. Schrijnemakers E. W. M., van Iren F., (1995), in: *Methods in Molecular Biology*, Eds. Day J. G., McLellan M. R., Humana Press Inc, 38, 103-111.
2. Steponkus P. L., Langis R., Fujikawa S., (1992), in: *Advances in Low-Temperature Biology*, Ed. Steponkus P. L., JAI Press Ltd., 1, 1-61.
3. Withers L. A., (1991), in: *Maintenance of microorganisms*, Academic Press Limited, 243-267.
4. Engelmann F., (1991), *Euphytica*, 57, 227-243.
5. Dereuddre J., Engelman F., (1987), *International Association For Plant Tissue Culture*, Eds. Baccon-Gibod J., Benbadis A., Short K. C., E.N.I.T.H.P., Angers, (8-9 October), 48-78.
6. Umetsu H., Wake H., Saitoh M., Yamaguchi H., Shimomura K., (1995), *Journal of Plant Physiology*, 146, 337-342.
7. Takahashi J., Nakajima H., Sonomoto K., Sato F., Ichimura K., Yamada Y., Tanaka A., (1991), *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 72(2), 71-73.
8. Shigeta J., Mori T., Sato K., (1993), *Biotechnology Techniques*, 7(3), 165-168.
9. Popov A. S., (1993), *Russian Journal of Plant Physiology*, 40(3), 421-430.
10. Karlsson J. O. M., Cravalho E. G., Toner M., (1993), *Cryo-Letters*, 14, 323-334.
11. Robertson A. J., Ishikawa M., Gusta L. V., (1995), *Plant Physiology*, 145, 137-142.
12. Kartha K. K., Engelman F., (1994), in: *Plant Cell and Tissue Culture*, Eds. Vasil I. K., Thorpe T. A., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 195-230.
13. Reinhold P. I., Uragami A., Sahai A., van Iren F., (1995), in: *Methods in Molecular Biology*, Eds. Dixon R. A., Gonzales R. A., Humana Press Inc., 38, 113-120.
14. Duncan D. R., Witholm J. M., (1990), in: *Methods in Molecular Biology*, Eds. Pollard J. W., Walker, Humana Press, 6, 29-37.
15. Witholm J. M., (1972), *Stain Technology*, 47(4), 189-194.
16. Nishizawa S., Sakai A., Amano Y., Matsuzawa T., (1992), *Cryo-Letters*, 13, 379-388.
17. Lecouteux C. G., Florin B., Tessereau H., Bollon H., Petiard V., (1991), *Cryo-Letters*, 12, 319-328.
18. Niino T., Sakai A., (1992), *Cryo-Letters*, 13, 51-58.
19. Benson E., (1994), in: *A Practical Approach Plant Cell Culture*, Eds. Dixon R. A., Gonzales R. A., Oxford UniTri Press, 147-167.
20. Bielański A., Tischner M., (1993), *Biotechnologia Rozrodu Zwierząt Gospodarskich*, Universitas, Kraków.

21. Yamada T., Sakai A., Matsumura T., Higuchi S., (1993), *Euphytica*, 70, 197-203.
22. Niino T., Sakai A., Enomoto S., Magosi J., Kato S., (1992), *Cryo-Letters*, 13, 303-312.
23. Matsumoto T., Sakai A., Yamada K., (1995), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 41, 237-241.
24. Niino T., Sakai A., Yakuwa H., Nojiri K., (1992), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28, 261-266.
25. Uragami A., (1993), *JICA GRP REF*, 6, 109-135.
26. Uragami A., Sakai A., Nagai M., (1993), *Japan Agricultural Research Quarterly*, 27, 112-115.
27. Reinhoud P. J., Schrijnemakers E. W. M., van Iren F., Kijne J.W., (1995), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 42, 261-267.
28. Towill L. E., (1995), in: *Genetic preservation of plant cells in vitro*, Springer/Verlag, New York, 99-111.
29. Engelmann F., Benson E. E., Chabrilange N., Gonzalez Arnao M. T., Mari S., Michaux-Ferriere N., Paulet F., Glaszman J. C., Charrier A., (1995), in: *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*, Eds. Trzi M., Cella R., Falavigna, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 315-320.
30. Uragami A., Lucas M. O., Ralambosoa J., Renard M., Dereuddre J., (1993), *Cryo-Letters*, 14, 83-90.
31. Niino T., Sakai A., (1992), *Plant Science*, 87, 199-206.
32. Terttero F. A. A., Hoekstra F. A., Karssen C. M., (1995), *Plant Physiology*, 145, 349-356.
33. Senaratna T., McKersie B. D., Bowley S. R., (1989), *Plant Science*, 65, 253-259.
34. Lecouteux C. G., Florin B., Tessereau H., Courtois D., Petiard V., (1992), *C. R. Acad. Sci. Paris*, 314, III, 423-428.
35. Liu J. R., Jeon J. H., Lee H. S., Song N. H., Jeong W. J., (1992), *Scientia Horticulturae*, 51, 1-11.
36. Janick J., Kitto S., Kim Y. H., (1989), *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 25, 1167-1172.

Methods of preservation of *in vitro* plant cell culture

Summary

Tissue culture has been utilized for producing virus free plants for vegetative propagation and genetic engineering. In addition, altered cells lines showing higher productivity of secondary metabolites can be obtained using tissue culture. The wide use of tissue culture requires the development of new preservation techniques for *in vitro* culture material.

One of this method is growth reduction achieved by modifying various parameters such as: temperature, culture medium, gaseous environment. However, cryopreservation (i. e. storage in liquid nitrogen -196°C) is the only method available nowadays for long-term conservation. New cryopreservation techniques such as encapsulation-dehydration, vitrification and desiccation helped expand the list of plant species that can tolerate low temperatures and are characterized by a normal rate of growth. Each step of the cryopreservation process requires specific conditions.

Key words:

preservation, slow growth, cryopreservation, vitrification, desiccation.

Adres do korespondencji:

Roman Marecik, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza, ul. Mazowiecka 48, 60-623 Poznań.