



Krioprezewacja w zabezpieczeniu (epi)genetycznej stabilności materiału roślinnego

Anna Mikuła

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

Cryopreservation efficacy in protection of (epi)genetic stability of plant material

Summary

Cryopreservation is important for the long-term conservation of plant genetic resources, especially for the species producing recalcitrant seeds and clonally propagated crops which are proliferated through grafting or as vegetative cuttings, suckers, roots, tubers and bulbs. Despite the fact that in liquid nitrogen temperature the cell division and metabolism are arrested, the factors associated with cryotreatment, cryostorage or plant recovery could be a source of somaclonal variations. The lecture assesses an attempt of attained knowledge within the influence of cryopreservation on the genetic integrity of regenerated plants or recovered tissue.

Assessment of genetic and epigenetic stability of the recovered plants derived from cryopreserved plant material is an important step to success of any storage protocol. Until now, from among 64 published papers, only 7 have shown genetic changes in plantlets regenerated after cryopreservation, and 3 – variability in tissue recovered after cryostorage without consequences in regenerants. Epigenetic changes were described using isoschisomers and MSAP, AMP or RAPD methods in 9 works. It was suggested that the processes of cryoprotection and cryostorage had an impact on DNA methylation status, it could lead to alterations in chromatin structure and changes in gene expression. However, majority of the works reported on the insignificant or any influence of cryopreservation on the plant material.

Adres do korespondencji

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

bioechnologia

2 (8) 23–37 2010

Key words:

cryopreservation, genetic and epigenetic variability, DNA methylation.

1. Wstęp

Krioprezerwacja, której początki sięgają lat siedemdziesiątych (zamrożenie zawiesiny lnu), a burzliwy rozwój przypada na przełom lat osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku, jest obecnie z powodzeniem stosowana do przechowywania różnorodnego materiału roślinnego. Najwcześniej ciekły azot (LN) znalazł praktyczne wykorzystanie w bankach klonów elitarnych linii roślin iglastych, zakładanych na bazie embriogenicznego kalusa (1,2). Dzięki połączeniu kultur *in vitro* i temperatury ciekłego azotu (-196°C) udało się w znaczący sposób usprawnić selekcję elitarnych genotypów. Rutynowe gromadzenie roślinnej bioróżnorodności w LN, innej niż nasiona czy zarodniki, jest relatywnie nową praktyką (3). Po raz pierwszy, rozmnożony w warunkach kultury *in vitro* materiał roślinny ziemniaka, manioku, banana oraz gruszy został wykorzystany do utworzenia banku tkanki około 2000 r. (4). Od tego czasu, do banków genów wprowadzono przeszło 200 gatunków roślin, które w większości stanowią rozmnażane wyłącznie wegetatywnie rośliny uprawne (5,6). Krioprezerwacja stała się zatem na równi z kulturami o spowolnionym wzroście oraz bankami polowymi powszechnie akceptowaną strategią gromadzenia bioróżnorodności w warunkach *ex situ* (4). Ponadto w wyniku wykorzystania transgenicznych kultur roślinnych (tytoniu, ryżu, kukurydzy) do wytwarzania rekombinowanych biofarmaceutyków otworzyły się nowe możliwości stosowania krioprezerwacji w praktyce (7,8).

Ciekły azot skutecznie ogranicza metabolizm komórek, dzięki czemu przechowywanie materiału roślinnego może być kontynuowane przez setki, a nawet tysiące lat bez obawy o utratę jego żywotności/właściwości (9). Ta forma przechowywania, dzięki wyeliminowaniu pasażu standardowo prowadzonych do utrzymywania materiału roślinnego w warunkach *in vitro*, sprzyja ograniczeniu postępowania zmienności somaklonalnej (10). Jednakże krioprezerwacja, będąca czterostopniowym procesem obejmującym: prekulturę, przedtraktowanie (traktowanie krioprotektantami, dehydratacja osmotyczna i/lub powietrzna), mrożenie-krioprezechowywanie-rozmrażanie oraz odtwarzanie roślin, może być potencjalną przyczyną fizycznego, chemicznego i fizjologicznego stresu, wynikającego z toksyczności krioprotektantów, formowania lodu czy stresu oksydacyjnego. Krioprezerwacja przyczynia się do powstawania wolnych rodników, które z kolei mogą prowadzić do zmian w sekwencjach DNA, liczbie chromosomów, ekspresji genów, profilach białkowych oraz morfologii (11). Skuteczność krioprezerwacji komórek i tkanek roślinnych jest, jak dotąd zwykle opisywana przeżywalnością, zdolnością do odtwarzania kultury, utrzymywania fizjologicznych kompetencji i biosyntetycznej aktywności, rzadziej zaś genetyczną stabilnością postmrożeniowego materiału roślinnego (11). W dotychczasowych badaniach wskazuje się, że wysoka żywotność rozmrożonej tkanki nie jest gwarancją zachowania ciągłości genetycznej (12,13). Prowadzenie analiz molekularnych, choć kosztowne, jest niezbędne do uzupełnienia naszej wiedzy w zakresie wpływu LN na genom komórki roślinnej i dalszych tego konsekwencji. Ważne jest

także wdrażanie technik molekularnych do rutynowego monitorowania stabilności genetycznej roślin zgromadzonych w bankach genów.

Celem tej pracy jest podsumowanie dotychczasowej wiedzy w zakresie oddziaływania szeroko rozumianej krioprezerwacji na stabilność genetyczną materiału roślinnego. Przeglądu pozycji literaturowych, które ukazały się do 2002 r. dokonał Harding (11). Obecnego podsumowania podjęto się głównie na podstawie najnowszych publikacji oraz tych, w których stwierdzono jakiegokolwiek zmiany w genomie roślinnym materiału poddanego krioprezerwacji (tab. 1).

Tabela 1

Badania genetycznej stabilności materiału roślinnego po krioprezerwacji. Liczbowe przedstawienie publikacji i wykorzystanych technik

Technika molekularna	Publikacje		**L.b.
	do 2002 r. liczba lub odwołanie do literatury	od 2003 r. odwołanie do literatury	
Badania sekwencji DNA			
RFLP	17*	–	66
techniki PCR	3*	–	
RAPD	7* + (14,15)	(16-30)	
AFLP	7*	(12,13,20,28,29,31,32)	
SSR	1*	(12,33,34)	
RAF	–	(35,36)	
ISSR	–	(34)	
VNTR	–	(37)	
Badania metylacji DNA			
MSAP	3*	(28,29,38)	10
trawienie izoschizomerami + RAPD	–	(27)	
AMP	–	(35,36)	
analiza HPLC (metylacja DNA i RNA)	–	(39)	
**L.b.:	40	36	76

* liczba artykułów cytowanych przez Hardinga (11);

**L.b.: Liczba badań wykorzystujących różne techniki molekularne.

2. Wpływ traktowań przedmrożeniowych na stabilność (epi)genetyczną materiału roślinnego

Genetyczna zmienność materiału roślinnego narażonego na wpływ czynników stresowych może uwidaczniać się chromosomowymi aberracjami, zmianami w se-

kwencjach DNA oraz jego statusie metylacyjnym. Kompleksowe badania nad wpływem poszczególnych etapów przygotowania materiału roślinnego do krioprzechowywania przeprowadzono dla pięciu genotypów *Carica papaya* (35). Wykorzystując metodę RAF autorzy wykazali, że samo odcięcie stożka wzrostu od rośliny matecznej i jego kilkugodzinna kultura na pożywce agarowej, jak również dalsze jego traktowanie (prekultura) pożywką płynną (z 0,2 m/l BA, 0,5 mg/l IAA, 0,2 mg/l GA₃) zawierającą 3% sacharozę nie indukują żadnych zmian w strukturze DNA. Oba etapy przyczyniły się jednak do powstania zmian w sekwencjach metylacyjnych DNA w zakresie 0,76-1,15% u dwóch spośród pięciu badanych genotypów *Carica papaya* (badania wykonywano metodą AMP). Dalsze, traktowanie roztworem witryfikacyjnym (PVS2) było źródłem strukturalnych zmian DNA u czterech, i metylacyjnych u trzech badanych genotypów, na zbliżonym poziomie wynoszącym od 0,43 do 0,92%. Należy zwrócić przy tym uwagę na fakt, że zmiany na obu badanych poziomach zachodziły niezależnie od siebie. Genotypy, u których wykazano różnice sekwencyjne niekoniecznie reagowały również zmianami metylacyjnymi DNA, i odwrotnie (35). W badaniach Johnstona i wsp. (39) również potwierdzono występowanie zmian w genomie roślinnym (opisywane poziomem ogólnej metylacji DNA i RNA oraz zmianami w obecności pseudourydyny) po kolejnych etapach kriotraktowania. Siedmiodniowe traktowanie pozbawionych liści węzłowych fragmentów pędów (utrzymywanych w kulturze *in vitro* 4 tygodnie) czterech genotypów *Ribes* pożywką zawierającą 0,75 M sacharozę znalazło odbicie w około 0,5% wzroście pseudourydyny i około 0,5% obniżeniu metylacji cytydyny RNA. Natomiast procent metylowanych sekwencji DNA był skorelowany z wrażliwością na stres badanych genotypów. U dwóch genotypów *Ribes nigrum* o wysokiej tolerancji na stres dehydratacji stwierdzono 23-24% metylowanych sekwencji DNA. Po 7-dniowej kulturze na pożywce zawierającej 2% sacharozę odnotowano około 4% spadek, podczas gdy po traktowaniu 0,75 M sacharozą nastąpił 1-5% wzrost poziomu metylacji DNA w stosunku do pędów kontrolnych. W genotypach wrażliwszych na stres dehydratacji wyjściowy poziom metylacji DNA wynosił 17-18%. Poziom ten był utrzymany w czasie 7-dniowej kultury na pożywce do regeneracji pędów, zaś obniżony o 2-3% po zastosowaniu prekultury. Dalsze kriogeniczne przedtraktowania powodowały nasilenie się zmian. U genotypów wrażliwych na stres, kapsułkowanie i dehydratacja przyczyniały się do obniżenia większości badanych parametrów, zaś u tolerancyjnych ich wzrost (39). W 2-dniowych, całych siewkach *Arabidopsis thaliana* przygotowywanych do krioprezervacji metodą witryfikacji, stwierdzono wystąpienie aż 50. metylowanych miejsc DNA w roślinach otrzymanych po traktowaniu roztworem witryfikacyjnym (PVS2) w stosunku do kontrolnych (38). O różnicach we wzorach fragmentów RAPD, wynikających z traktowania dehydratacyjnego w ramach metody kapsułkowania/dehydratacji donoszą Martín i González-Benito (24). Szkodliwego wpływu PVS2 nie wykazano w genotypie TS2 *Carica papaya* (35), w zarodkach somatycznych sześciu genotypów *Quercus robur* (22) oraz regenerantach *Prunus* (27,40). Szkodliwe oddziaływanie DMSO (w stężeniu 5 i 7,5%) na embriogeniczną tkankę kalusową *Pinus nigra*

i *Abies cephalonica*, objawiające się zmianami strukturalnymi DNA, wykazali Salaj i wsp. oraz Aronen i wsp. (26,41). Jednakże, co ciekawe, zmiany te dotyczyły jedynie tkanki nie poddanej dalej mrożeniu w LN. Podobne zjawisko zaobserwowano także w przypadku genotypu 35 *Carica papaya*, u którego ujawnione po witrifikacji zmiany, nie były wykryte po mrożeniu w LN (35).

Niebezpieczeństwo modyfikacji związane jest także ze stosowaniem polihydroksyalkoholi, wśród których wysoką skuteczność w indukowaniu desykacyjnej i mrozowej tolerancji wykazano dla sorbitolu i glicerolu (42,43). Zmiany epigenetyczne (metodą MSAP) po zastosowaniu 6% manitolu stwierdzono w roślinach *Solanum tuberosum* utrzymywanych w kulturze o spowolnionym typie wzrostu (44).

W literaturze można znaleźć przykłady prac, w których autorzy wskazują, że niewymagająca użycia krioprotektantów metoda kapsułkowania/dehydratacji, również może indukować zmienność (12,23). Fernandes i wsp. (12) w swoich badaniach wykazali, że nadmierna dehydratacja zamkniętych w alginianowe kapsułki zarodków somatycznych *Quercus suber*, przyczyniła się do modyfikacji w sekwencjach DNA. W zarodkach odwadnianych do 25% zawartości wody stwierdzono 3 dodatkowe prążki AFLP, których nie obserwowano w materiale kontrolnym oraz suszonym powietrznie do wilgotności 35%. Poza tymi zmianami nie stwierdzono żadnych różnic morfologicznych, zmian w całkowitej zawartości jądrowego DNA (analiza cytometryczna) i w sekwencjach mikrosatelitarnych (SSR). Również żywotność po krioprechowaniu w obu przypadkach była zbliżona i wynosiła 90-95%. Możliwych przyczyn wniesionej zmienności autorzy upatrują w mutacji, metylacji DNA lub/i krioselekcji (12). Jednakże stres osmotyczny, podobnie jak stres zasolenia, może wywoływać niestabilność genetyczną, której zasięg może być skorelowany z natężeniem stresu (45,46).

3. Efektywność LN w zabezpieczeniu stabilności genetycznej na poziomie sekwencji DNA

U badanych dotychczas gatunków roślin, do mrożenia w LN wykorzystywano najczęściej merystemy (19,25) lub stożki wzrostu (14,16-18,20,21,28,31,34,40,47,48), a analizie molekularnej poddawano odtworzone w postmrożeniowej kulturze regeneranty. Do badania DNA na poziomie sekwencji pierwotnie wykorzystywano technikę RFLP, natomiast obecnie najczęściej używane są RAPD i AFLP (tab. 1). W materiale roślinnym odtworzonym po krioprezerwacji, jak dotąd, znaleziono niewiele modyfikacji na poziomie sekwencji DNA (tab. 2). Wśród 66. badań wykonanych z użyciem różnych technik molekularnych, zaledwie w przypadku 10. opisano zmiany, które najczęściej dotyczą pojawienia się jednego (23,30,49) lub dwóch nowych prążków (24,37) nie występujących w materiale niemrożonym. Ponadto obserwowana w rozmrożonej tkance kalusowej zmienność somaklonalna nie zawsze znajduje swoje odzwierciedlenie w regenerantach. Przykładem może być 6 embriogenicz-

nych linii kalusowych *Picea glauca*, pasażowanych przez 2 i 12 miesięcy po rozmrożeniu, w których wykazano obecność 3 zmian w profilach RAPD (użyto 8 starterów) (50). Nowych prążków nie potwierdzono natomiast w regeneratach pochodzących z tych linii. Podobnie Sánchez i wsp. (22) wykazali zmieniony po krioprezerwacji profil RAPD w zarodkach somatycznych jednej z sześciu linii *Quercus robur*, podczas gdy w otrzymanych roślinach stabilność sekwencji DNA była utrzymana.

Tabela 2

Zmiany na poziomie sekwencji DNA wykryte w materiale roślinnym poddanym krioprezerwacji (10 spośród 66 doniesień)

Gatunek /mrożony eksplantat	Zmiany (liczba badanych próbek/regenerantów)	Technika	Literatura
<i>Dioscorea floribunda</i> wierzchołki pędów	1 nowy marker (80 regenerantów)	RAPD	(49)
<i>Dioscorea bulbifera</i> embriogeniczna tkanka	1 nowy marker (80 regenerantów)	RAPD	(30)
<i>Dendranthema grandiflora</i> wierzchołki pędów	1 nowy marker (46 regenerantów)	RAPD	(23)
<i>Dendranthema grandiflora</i> wierzchołki pędów	2 nowe markery	RAPD	(24)
<i>Oryza sativa</i> 3 linie kalusa	1 nowy marker w jednej linii (12 próbek kalusa)	RAPD	(51)
<i>Picea glauca</i> 6 klonów embriogenicznych kultur	3 zmiany w embriogenicznej tkance; brak zmian w regenerantach (po 3 i 4 latach w LN i odpowiednio po 2 i 12 miesiącach postmrożeniowej kultury); (po 1 próbce tkanki; od 2 do 25 regener. dla sześciu klonów; w sumie 230 roślin)	RAPD	(50)
<i>Quercus robur</i> zarodki 6 genotypów	1 zmiana w 1 zarodku somat.; brak zmian w regenerantach (1 tydzień i 1 rok w LN) (w sumie 40 zarodków)	RAPD	(22)
<i>Hypericum perforatum</i> wierzchołki pędów 5 genotypów	2 zmiany w sekwencjach niekodujących (w sumie 50 regenerantów)	VNTR	(37)
<i>Carica papaya</i> wierzchołki pędów kątowych 6 genotypów	0-10,07% (do 14 zmian) (regeneranty)	RAF	(35)
<i>Carica papaya</i> wierzchołki pędów kątowych 1 genotypu	0,45-4,15% (1-9 zmian). Rośliny po krioprezerwacji, po 6 tygodniach wzrostu w warunkach połowych (w sumie 33 rośliny)	RAF	(36)

Poważny stres (wynikający np. z zastosowania skrajnych warunków mrożenia) może prowadzić do fizjologicznych i epigenetycznych zmian, z niewielkimi modyfikacjami w sekwencjach DNA. Przykładem mogą być trzy linie kalusowe ryżu poddane jedynie przedtraktowaniu ABA i następnie zanurzone bezpośrednio w LN. Uży-

skana po rozmrożeniu tkanka wykazywała wyższą odporność na ujemną temperaturę i wyższą podatność na transformację genetyczną (51). Na poziomie molekularnym, dla jednego spośród 20. użytych starterów, w przypadku tylko jednej z badanych linii (L-12), ujawniono niewielkie różnice w profilach RAPD powiązane z krioprezerwacją. Stwierdzono natomiast zmienność sekwencyjną zarówno pomiędzy trzema badanymi liniami, jak i wśród kalusów tej samej linii, nie związaną z krioprechowaniem. Autorzy sugerują, że zmienność w obrębie linii mogła wynikać ze zmienności somaklonanej i nie mieć powiązań z oddziaływaniem presji selekcyjnej (51). Natomiast zmienność pomiędzy liniami może pochodzić ze zmienności wyjściowego materiału roślinnego wykorzystanego do założenia kultur, którym były dojrzałe zarodki zygocytne pobrane z różnych roślin.

Dwie zmiany w sekwencjach niekodujących genomu regenerantów, otrzymanych z krioprechowanych stożków wzrostu, stwierdzono u *Hypericum perforatum* (37). Najszersze zmiany, bo obejmujące od 2 do 14 prążków pojawiających się *de novo* lub zanikających (1,5-10,07% zmienność), obserwowano w roślinach czterech spośród sześciu genotypów *Carica papaya* zamrożonych w LN w postaci stożków wzrostu (35). Pozostałe dwa genotypy nie wykazywały postmrożeńowych zmian w sekwencjach DNA. Na podstawie przeprowadzonych badań sugeruje się, że wrażliwość niektórych gatunków na krioprezerwację może uwidaczniać się na poziomie sekwencji DNA, mimo że nie jest widoczna na poziomie przeżywalności, czy zdolności do odtwarzania kultury.

W literaturze znaleźć można dowody na to, że zarówno krótko- (1 h-30-dni) (16,17,20,21,34), jak i długoterminowe (1-2-letnie) (15,19,22,32,47) przechowywanie materiału roślinnego w ciekłym azocie zachowuje stabilność genetyczną odtworzonych regenerantów. Po dwunastu miesiącach krioprechowwania brak zmian genetycznych potwierdzono w roślinach *Anigozanthos viridis* i *Cosmos atrosanguineus* odtworzonych z przechowywanych w LN stożków wzrostu (32,47) oraz w regenerantach sześciu linii *Quercus robur*, u których mrożeniu poddawano somatyczne zarodki (22). Podobnie, żadnego zróżnicowania nie wykryto w profilach RAPD wśród regenerantów *Betula pendula* po 14. i 70. miesiącach krioprechowwania merystemów (19), czy *Datura obscura* po 24. miesiącach (15). Jednym z najdłużej utrzymywanych w LN gatunków (u którego jednocześnie monitorowano genetyczną stabilność) jest glon *Coccomyxa arvernensis* (13). W badaniach wykazano brak różnic w profilach AFLP po 27 latach jego kriogenicznego utrzymywania. Mimo że reakcja komórek na jednorazowo zastosowany „kriogeniczny stres” może nie znaleźć odbicia w zmianach sekwencyjnych DNA, to powtórne jego zastosowanie może być źródłem dodatkowej zmienności. Dowody w tym zakresie przedstawiono wykorzystując glony (13). U dwóch spośród pięciu badanych gatunków stwierdzono pojawienie się 0,3-0,8% zróżnicowania w profilach AFLP, dopiero po drugim i/lub trzecim cyklu mrożenia-rozmrażania-odtworzenia. Müller i wsp. (13) zaobserwowali również nasilenie się różnic w zmienności fragmentów AFLP w kolejnych tygodniach (2, 3-tygodnie) kultury postmrożeńowej, w stosunku do zmian opisanych po 12 h od roz-

mrożenia. W tym względzie trudno jednak doszukiwać się podobieństw z roślinami, gdyż seksualna reprodukcja jest algom obca i wobec tego spontaniczne mutacje, prowadzące do różnicowania się subpopulacji jako efekt adaptacji na stres, występują tu znacznie częściej. Generalnie jednak z badań przeprowadzonych dla 28 prób alg wynika wyraźnie, że początkowo dość wysoka i różnorodna zmienność wynosząca 0-3,6%, u większości (u 18 prób) zostaje całkowicie lub bardzo mocno ograniczona po mrożeniu (0,3-0,7%) (13).

U większości krioprezechowywanych gatunków, u których podjęto badania molekularne wykazano, że LN nie indukuje dodatkowej zmienności somaklonalnej. W badaniach tych uwzględniono również mikrosatelity (SSR) zaliczane do jednych z bardziej precyzyjnych markerów detekcji zmienności (12,33,34,48) oraz polimorfizm odcinków DNA między DNA mikrosatelitarnym (ISSR) (34). W przypadku wykrytych, sporadycznie zdarzających się zmian, wielu autorów winą za ich wystąpienie obarcza kulturę *in vitro* (14,29,50-52). Potwierdzeniem korzyści płynących z wdrażania krioprezerwacji do zabezpieczania materiału roślinnego pozyskanego w kulturach *in vitro* mogą być badania Wanga i wsp. (52). Podczas gdy w utrzymywanych długoterminowo zawiesinach *Festuca arundinacea* i w zregenerowanych z nich roślinach stwierdzono nowe wzory RAPD, to odtworzony po 6-miesięcznym przechowywaniu w LN materiał roślinny wykazywał całkowitą zgodność z kontrolą w zawieszynie odtworzonej po przechowywaniu w LN.

4. Efektywność LN w zabezpieczeniu stabilności epigenetycznej

Metody wykorzystane dotychczas w badaniu zmian epigenetycznych w materiale roślinnym po krioprezerwacji bazują na stosowaniu izoschizomerów charakteryzujących się odmienną wrażliwością na metylację cytozyny (53), a następnie technik molekularnych: MSAP, AMP lub RAPD. Każdą z dotychczas wykorzystanych metod i dla każdego analizowanego gatunku wykryto zmiany na poziomie metylacji DNA (tab. 3). Co ciekawe, we wszystkich pracach, w których badano poziom metylacji DNA i jednocześnie kontrolowano jego stabilność sekwencyjną, wykorzystane techniki RAPD, AFLP i RAF nie wykazały żadnych zmian sekwencji DNA (27,28,35,36, 38,54-56).

Tabela 3

Zmiany we wzorach metylacji DNA (RNA) wykryte w materiale roślinnym

Gatunek /mrożony eksplantat	Zmiany/badany materiał roślinny	Technika	Literatura
1	2	3	4
<i>Carica papaya</i> ; 6 genotypów; wierzchołki pędów kątowych	odcięcie: 0-0,81% (2 zmiany) prekultura: 0-1,15% (3 zmiany) PVS2: 0-0,81% (2 zmiany) LN: 0,52-6,62% (1-9 zmian); regeneranty	AMP	(35)

1	2	3	4
<i>Carica papaya</i> ; 1 genotyp; wierzchołki pędów kątowych	0-1,42% (0-3 zmiany). Rośliny po krioprezerwacji, po 6 tygodniach wzrostu w warunkach polowych	AMP	(36)
<i>Melus pumila</i> ; genotyp M ₂₆ ; stożki wzrostu	5 miejsc demetylacji DNA; regeneranty; wzrost efektywności ukorzeniania	MSAP	(54)
<i>Fragaria gracilis</i> cv. Joho; stożki wzrostu	1 demetylacja DNA; regeneranty	MSAP	(55)
<i>Citrus sinensis</i> cv. Newhall; zawieszina komórkowa	3 demetylacje i 1 metylacja <i>de novo</i> ; odtworzony kalus; wzrost efektywności SE	MSAP	(56)
<i>Arabidopsis thaliana</i> ; 2-dniowe siewki	Po PVS2: 50 miejsc metylacji DNA (15 metylacji <i>de novo</i> , 6 miejsc demetylacji); Po LN: 33 miejsca metylacji (11 <i>de novo</i> , 7 miejsc demetylacji); rośliny	MSAP	(38)
<i>Prunus dulcis</i> ; 2 kultywary oraz hybryda <i>P. dulcis</i> 'Titan' x <i>P. persica</i> ; stożki wzrostu	Zmiany stwierdzono między roślinami <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> oraz regenerantami po krioprezerwaniu	Izozochimery + RAPD	(27)
<i>Humulus lupulus</i> ; 3 kultywary; stożki wzrostu	Całkowita zmienność wynikająca z krioprezerwacji: 2,7; 4,3 i 8,7% w zależności od kultywaru; regeneranty po 4 miesiącach	MSAP	(28)
<i>Ribes</i> ; 4 genotypy; merystemy wierzchołkowe	Po pierwszym cyklu pasaży (12 tyg.): metylacja DNA: u 2 genotypów wrażliwych na stres obniżenie o 2-5%; u 2 genotypów tolerancyjnych podniesienie o 5-8%; metylacja RNA: utrzymanie na poziomie kontrolnym (2 genotypy); 3%-spadek (genotyp wrażliwy) i 6%-wzrost (genotyp tolerancyjny); pseudourydyna: u genotypów wrażliwych utrzymanie na poziomie kontrolnym (ok. 6,5%); u tolerancyjnych wzrost o 0,6-1,2%. Po drugim cyklu pasaży (18-20 tyg.) stopień metylacji powrócił do poziomu kontrolnego.	analiza HPLC	(39)

Zmiany metylacyjne mogą być wskaźnikiem odpowiedzi adaptacyjnej na stres związany z warunkami krioprezerwacji, odtwarzania kultury i regeneracji roślin (57). Mogą wystąpić już na etapie pobierania materiału roślinnego i jego prekultury (35), i nasilać się podczas dalszych zasadniczych etapów krioprezerwacji, tj. traktowania krioprotektantami i postmrozeniowej kultury (35,38). Zmiany metylacji DNA mogą prowadzić do modyfikacji struktury chromatyny i kolejno wpływać na ekspresję genów znajdujących się w rejonach aktywnych transkrypcyjnie (58). Z tego względu zakłócenia we wzorach metylacji DNA mogą mieć strukturalne i funkcjonalne konsekwencje (59). W następstwie krioprezerwacji, w odpowiedzi na sygnały środowiskowe, wystąpieniu zmian metylacyjnych może towarzyszyć podniesienie potencjału embriogenicznego (56) czy zdolności do rizogenezy (54). Jednakże, co wykazano u *Arabidopsis thaliana*, rozległym zmianom metylacyjnym nie muszą towarzyszyć żadne modyfikacje fenotypowe, włączając czas rozpoczęcia formowania łodyg, kwitnienia czy efektywność plonowania (38).

Biorąc pod uwagę odkrycia ostatnich lat dowodzące obecności mechanizmów naprawy DNA dzięki funkcjonowaniu w komórce enzymów glikozylazy DNA i endonukleazy AP (58), zmiany metylacyjne DNA mogą wykazywać charakter przejściowy. Z tego względu, znaczącą rolę w badaniach nad metylacją DNA może mieć czas pobrania materiału roślinnego do analiz. Kaity i wsp. (35) poddawali krioprezerwacji metodą kropli (w roztworze PVS2) wierzchołki pędów kątowych sześciu genotypów *Carica papaya*. Badania z wykorzystaniem techniki AMP przeprowadzono na roślinkach zregenerowanych pomiędzy 2 a 4 miesiącem postmrozeniowej kultury, przy czym badany materiał pochodził bezpośrednio z rozmrożonych eksplantatów. Wykorzystując 5 par starterów otrzymano 136-328 markerów AMP. Zmiany w sekwencjach metylacyjnych DNA dotknęły regeneranty wszystkich badanych genotypów, jednak z różnym nasileniem. Procent zmian wahał się w zakresie 0,52-6,62% i obejmował nowe markery nieobecne w roślinach kontrolnych, utratę markerów obecnych w kontroli oraz alternatywne typy markerów wykryte w tej samej pozycji co oryginalne w roślinach kontrolnych. W przypadku dwóch genotypów *C. papaya* (35 i Z6), u których wcześniej wykluczono negatywny wpływ prekultury i toksyczne oddziaływanie PVS2 (czynniki te nie mają wpływu na zmiany metylacyjne DNA), wydaje się, że cała 4,64 i 0,56% zmienność w sekwencjach metylacyjnych DNA może wynikać z uszkodzeń indukowanych mrożeniem-rozmrażaniem i postmrozeniową regeneracją.

Hao i wsp. krioprezerwacji metodą kapsułkowania/dehydratacji poddali stożki wzrostu jabłoni genotypu M₂₆ (54) i truskawki cv. Joho (55), które wcześniej były wystawione na 30- i 21-dniowe traktowanie chłodem (5°C; 12 h fotoperiod). Analizę MSAP przeprowadzono na roślinach z odtworzonym systemem korzeniowym (nie podano czasu jaki upłynął od rozmrożenia). Otrzymano w sumie 381 i 312 markerów MSAP dla 8 użytych kombinacji starterów. W odtworzonych po mrożeniu roślinach jabłoni wykryto zmiany we wzorach metylacji DNA. Zmiany te polegały głównie na demetylacji cytozyny (5 zmian), podczas gdy nie stwierdzono występowania metylacji *de novo* (54). Pędy zregenerowane z krioprzechowywanych stożków wzrostu charakteryzowały się zwiększonym współczynnikiem ukorzeniania. Ze względu na to, że metylacja DNA odgrywa ważną rolę w sterowaniu rozwojem roślin, różnicowaniem organów i tkanek (60), jest prawdopodobne, że w tym przypadku zmiany metylacji DNA wpłynęły na ekspresję genów powiązanych z ukorzenianiem roślin jabłoni. Jednakże, w odtworzonych po krioprzechowywaniu regenerantach truskawki wykryta 1 zmiana polegająca na demetylacji cytozyny nie znalazła odbicia we wzroście i ukorzenianiu pędów (55).

Zawiesinę komórkową *Citrus sinensis* cv. Newhall wprowadzono do LN metodą wityfikacji (PVS2) (56). Analizie MSAP poddano tkankę kalusową odtworzoną po krioprzechowywaniu (nie podano czasu pobrania próbek). Używając 8 par starterów otrzymano 358 i 368 fragmentów MSAP dla trawienia *HpaI-EcoRI* i *MspI-EcoRI*. Krioprezerwacja prowadziła do obniżenia liczby specyficznych fragmentów DNA (stwierdzono 3 miejsca demetylacji) i pojawienia się 1 metylacji *de novo*.

W badaniach prowadzonych na dwóch kultywarach migdałowca zwyczajnego wykazano, że stożki wzrostu poddane hartowaniu chłodem (w 4°C przez 21 dni) i następnie wityfikacji przeżywają krioprezerwację w 54 i 80% (27). Do trawienia DNA autorzy wykorzystali cztery enzymy restrykcyjne tworzące dwie pary izoschizomerów: *HpaII/MspI* i *Bsp143I/MboI*, o różnej wrażliwości na metylację (*HpaII* i *Bsp143I* – wrażliwe; *MspI* i *MboI* niewrażliwe). Genomowe DNA było trawione każdym z tych enzymów osobno. Dla obu badanych kultywarów zasadnicze zmiany wykryto pomiędzy drzewami rosnącymi *in vivo* a materiałem roślinnym wyprowadzonym w kulturze *in vitro*, co jest często spotykanym zjawiskiem (61). Były one widoczne przez cały proces krioprezerwacji. Nie stwierdzono natomiast negatywnego wpływu wynikającego z użycia PVS2. Różnice we wzorach metylacji DNA były znalezione również pomiędzy regenerantami *Prunus dulcis* odtworzonymi ze stożków wzrostu przechowywanych w LN krótko (3 dni) i długoterminowo (24 miesiące). Jednakże autorzy nie sugerują, by samo krioprezechowywanie miało tu negatywny wpływ. Przyczyn zmienności upatrują raczej w różnej liczbie pasaży, którym poddano materiał wyjściowy przed pobraniem z niego stożków wzrostu (27).

Dla trzech kultywarów *Humulus lupulus*, używając sześciu kombinacji starterów MSAP, wykazano, że 63,3% wszystkich wykrytych loci w roślinach pochodzących z mrożonych stożków wzrostu nie uległo zmianom (28). O 1% wyższą stabilność genomu odnotowano dla roślin utrzymywanych przez co najmniej 1 rok w warunkach spowolnionego wzrostu *in vitro*, w obniżonej do 4°C temperaturze. Zmiany w pozostałej części genomu obejmowały demetylację, metylację *de novo* oraz modyfikacje powstałe z innych przyczyn, przy czym demetylacja występowała najczęściej. Całkowita zmienność wykryta w loci MSAP, powiązana ze ściśle określonym typem przechowywania zależała od badanego kultywaru i wynosiła: 2,7/2,7% dla Calicross, 4,3/5,1% dla USDA 21055 i 8,7/9,8% dla Tardif de Bourgogne, przy czym pierwsza liczba wskazuje zmiany tłumaczone krioprezerwacją, druga zaś przechowywaniem w chłodzie. Autorzy w jednym z kultywarów wykazali skłonność do zachodzenia metylacji *de novo*. Analiza dystansu genetycznego podzieliła trzy badane kultywary w osobne grupy, wśród których rosnące w szklarni rośliny kontrolne, rośliny zregenerowane po krioprezechowywaniu i rośliny rosnące *in vitro* w 4°C tworzyły osobne populacje. Pomimo że część wykrytej zmienności epigenetycznej może wynikać z traktowań poprzedzających przechowywanie materiału roślinnego, to jednak pewien jej element pochodzi wyłącznie od krioprezerwacji (28).

U *Arabidopsis thaliana* pomiędzy roślinami kontrolnymi i zregenerowanymi z podanych krioprezerwacji 2-dniowych siewek, stwierdzono wystąpienie 33. odmiennych prążków MSAP (38). W odniesieniu do niemrożonego materiału roślinnego, próbki traktowane LN pokazywały większą liczbę miejsc, które przeszły demetylację. Najczęściej również stwierdzana jest przewaga demetylacji nad metylacją *de novo*, co wykazano u *Humulus lupulus*, *Fragaria gracilis* i *Malus pumila* (28,55,56). Czynniki stresowe mogą przyczyniać się również do aktywowania retrotranspozonów (29,62). Mutacje będące wynikiem wstawiania kopii retrotranspozonu do genomu

mogą prowadzić do powstania genotypu odpornego na dany stres. Badania w tym kierunku wykonane za użyciem techniki REMAP przeprowadzono dla dwóch kultywarów *Humulus lupulus* ('Nugget' i 'Columbus'), utrzymywanych w kulturze *in vitro* przez 2 lata, i w tym czasie przeprowadzonych przez szereg pasaży (62). Mimo że nie wykryto wpływu długoterminowego utrzymywania roślin w warunkach kultury *in vitro* na aktywność retrotranspozonów, to jednak temu zagadnieniu w korelacji z krioprezerwacją warto by poświęcić więcej uwagi.

Nowe spojrzenie na procesy metylacyjne, których wystąpienie po zadziałaniu czynnikiem stresowym, jak się wydaje, jest oczywiste, dają badania Johnstona i wsp. (39). Krioprezerwacja merystemów *Ribes* spowodowała obniżenie poziomu metylowanych sekwencji DNA, obniżenie lub utrzymanie na poziomie kontrolnym metylacji RNA i utrzymanie na poziomie kontroli występowania pseudourydyny u dwóch genotypów wrażliwych na stres, podczas gdy wszystkie badane parametry ulegały podniesieniu u genotypów tolerancyjnych. Taka tendencja była odnotowana po pierwszym cyklu pasaży, tj. po 12. tygodniach kultury odtworzonych po mrożeniu w LN pędów. Jednakże obserwowane różnice zanikały wraz z wydłużaniem postmrozeniowej kultury, i po 18-20. tygodniach od rozmrożenia (po drugim cyklu pasaży) nie stwierdzono zmian w metylacji w utrzymywanych *in vitro* pędach (38).

W długofalowym monitorowaniu stabilności genetycznej roślin *Carica papaya*, zregenerowanych z krioprezechowywanych stożków wzrostu wykazano, że zarówno zmiany sekwencyjne, jak i metylacyjne niewystępujące w materiale roślinnym *in vitro* oraz po 8-tygodniach aklimatyzacji, pojawiają się w warunkach polowych (36). W roślinach rosnących 8 tygodni w gruncie genomowa zmienność sekwencyjna sięgała 0,45-4,15%, zaś metylacyjna 0-1,42%. Tak zatem, aby uzyskać pełną informację o wpływie krioprezerwacji i powiązanej z nią nierozzerwalnie techniki kultur *in vitro* na stabilność materiału roślinnego zachodzi konieczność prowadzenia kompleksowych badań, począwszy od roślin pozostających w warunkach postmrozeniowej kultury *in vitro*, a skończywszy na badaniu kolejnych ich pokoleń już w warunkach *in vivo*.

5. Podsumowanie

W dotychczasowych badaniach molekularnych wykazano, że zmiany w postmrozeniowym materiale roślinnym na poziomie sekwencji DNA występują sporadycznie, przypadkowo i raczej są wnoszone przez pojedyncze osobniki. Zmienność ta najczęściej jest rozważana jako efekt wpływu biotechnologicznych manipulacji będących podstawą uzyskiwania materiału roślinnego do krioprezerwacji i/lub wprowadzania regenerantów w postmrozeniowej kulturze.

Zmiany we wzorach metylacji DNA wykryto we wszystkich podjętych dotychczas badaniach (10 prac). Ich wystąpienie jest bezpośrednio skorelowane z czynnikiem stresowym i może uwidaczniać się na każdym etapie procedury krioprezerwacji,

począwszy od pierwszego kroku, którym jest pobranie eksplantatu z rośliny macicznej i wprowadzenie go do kultury *in vitro*. Pojawienie się i zasięg zmian metylacyjnych jest niezależne od wykorzystanej techniki krioprezerwacji, rodzaju eksplantatu i jego przeżywalności. Zmienność ta, jak się wydaje, jest natomiast skorelowana z badanym gatunkiem czy kultywarem. W stwierdzonej postmrozeniowej zmienności metylacyjnej dominująca demetylacja wskazuje potencjalne obszary dalszych poszukiwań, którymi są retrotranspozony.

Ze względu na specyfikę poszczególnych markerów genetycznych, jak się wydaje, celowe jest przeprowadzenie kompleksowych badań, z wykorzystaniem różnych technik molekularnych jednocześnie dla gatunków lub kultywarów różniących się tolerancją na stres. Również interesujące jest zagadnienie nasilania się zmienności w wyniku wielokrotnego przeprowadzania procedury mrożenia. Ze względu na ograniczone, jak dotąd, badania wpływu krioprezerwacji na zmiany we wzorach metylacji DNA otwarte pozostaje pytanie o ich następstwa i dziedziczenie w następnych pokoleniach.

Wobec całej zgromadzonej dotychczas wiedzy o wpływie LN na materiał roślinny, wspartej analizami molekularnymi odtworzonych roślin można stwierdzić, że krioprezerwacja jest obecnie najbezpieczniejszą metodą gromadzenia i długoterminowego przechowywania materiału roślinnego. Badania stabilności genetycznej powinny być jednak bezwzględnie kontynuowane.

Stosowane skróty

- RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*
- RAPD – *Randomly Amplified Polymorphic DNA*
- AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism*
- SSR – *Simple Sequence Repeats*
- RAF – *Randomly Amplified DNA Fingerprinting*
- ISSR – *Inter-Simple Sequence Repeat*
- VNTR – *Variable Number of Tandem-Repeats*
- MSAP – *Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism*
- AMP – *Amplified DNA Methylation Polymorphism*
- REMAP – *REtransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*

Literatura

1. Gupta P. K., Durzan D. J., Finkle B. J., (1987), *Can. J. Forest Res.*, 17, 1130-1134.
2. Cyr D. R., (1999), in: Eds. Jain S. M., Gupta P. K., Newton R. J., *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, vol. 4, 239-261, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Boston, London, the Netherlands.
3. Engelmann F., (2004), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 40, 427-433.
4. Engelmann F., Engels J. M. M., (2002), in: Eds. Engels J. M. M., Rao V. R., Brown M. T., Jackson A. H. D., *Managing Plant Genetic Diversity*, Wallingford and Rome, CAB International and IPGRI, 89-104.

5. Keller E. R. J., Senula A., Leunufna S., Grube M., (2006), *International Journal of Refrigeration*, 29, 411-417.
6. Gonzalez-Arnao M. T., Panta A., Roca W. M., Escobar R. H., Engelmann F., (2008), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 92, 1-13.
7. Cho J.-S., Hong S.-M., Joo S.-Y., Yoo J.-S., Kim D.-I., (2007), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73, 1470-1476.
8. Schmale K., Rademacher T., Fischer R., Hellwig S., (2006), *J. Biotechnol.*, 124, 302-311.
9. Walters C., Wheeler L., Stanwood P. C., (2004), *Cryobiology*, 48, 229-244.
10. Larkin P. J., Scowcroft W. R., (1981), *Theor. App. Genet.*, 60, 197-214.
11. Harding K., (2004), *Review, CryoLetters*, 25, 2-22.
12. Fernandes P., Rodriguez E., Pinto G., Roldán-Ruiz I., de Loose M., Santos C., (2008), *Tree Physiology*, 28, 1841-1850.
13. Müller J., Day J. G., Harding K., Hepperle D., Lorenz M., Friedl T., (2007), *Am. J. Bot.*, 94, 799-808.
14. Sales E., Nebauer S. G., Arrillaga I., Segura J., (2001), *Planta Med.*, 67, 833-838.
15. Gavida I., Del Castillo Agudo L., Pérez-Bermúdez P., (1996), *Plant Science*, 121, 197-205.
16. Gagliardi R. F., Pacheco G. P., Carneiro L. A., Vallas J. F. M., Vieira M. L. C., Mansur E., (2003), *CryoLetters*, 24, 103-110.
17. Jokipii S., Rynnänen L., Kallio P. T., Aronen T., Häggman H., (2004), *Plant Science*, 166, 799-806.
18. Zhai Z., Wu Y., Engelmann F., Chen R., Zhao Y., (2003), *CryoLetters*, 24, 315-322.
19. Rynnänen L., Aronen T., (2005), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 83, 21-32.
20. Liu Y., Wang X., Liu L., (2004), *Plant Science*, 166, 677-685.
21. Mandal B. B., Ahuja-Ghosh S., Srivastava P. S., (2008), *CryoLetters*, 29, 399-408.
22. Sánchez C., Martínez M. T., Vidal N., San-José M. C., Valladares S., Vieitez A. M., (2008), *CryoLetters*, 29, 493-504.
23. Martín C., González-Benito M. E., (2005), *Cryobiology*, 51, 281-289.
24. Martín C., González-Benito M. E., (2009), in: *Programme and Abstracts, 1st International Symposium "Cryopreservation in horticultural species"* Leuven, Belgium, 5-8. 04. 2009, 28.
25. Scocchi A., Faloci M., Medina R., Olmos S., Mroginski L., (2004), *Euphytica*, 135, 29-38.
26. Salaj T., Matušíková I., Piršelová B., (2009), in: *Programme and Abstracts, 1st International Symposium "Cryopreservation in horticultural species"*, Leuven, Belgium, 5-8 April 2009, 26.
27. Channuntapipat Ch., Sedgley M., Collins G., (2003), *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 128, 890-897.
28. Peredo E. L., Arroyo-García R., Reed B. M., Revilla M. Á., (2008), *Cryobiology*, 57, 234-241.
29. Peredo E. L., Cires E., Arroyo-García R., Revilla M. Á., (2009b), in: *Proceedings of the scientific commission. International Hop Growers' Convention I.H.G.C. León, Spain, 21-25.06.2009*, 64-67, http://www.lfl.bayern.de/ipz/hopfen/10585/sc09_proceedings.pdf
30. Dixit S., Mandal B. B., Ahuja S., Srivastava P. S., (2003), *CryoLetters*, 24, 77-84.
31. Zarghami R., Pirseyedi M., Hasrak S., Sardrood B. P., (2008), *African Journal of Biotechnology*, 7, 2798-2802.
32. Wilkinson T., Wetten A., Prychid Ch., Fay M. F., (2003), *Ann. Bot.*, 91, 65-74.
33. Richards Ch. M., Reilley A., Touchell D., Antolin M. F., Walters Ch., (2004), *Conservation Genetics*, 5, 853-859.
34. Liu Y.-G., Liu L.-X., Wang L., Gao A.-Y., (2008), *CryoLetters*, 29, 7-14.
35. Kaity A., Ashmore S. E., Drew R. A., Dulloo M. E., (2008), *Plant Cell. Rep.*, 27, 1529-1539.
36. Kaity A., Ashmore S. E., Drew R. A., (2009), *Plant Cell. Rep.*, 28, 1421-1430.
37. Urbanová M., Košuth J., Čellárová E., (2006), *Plant Cell. Rep.*, 25, 140-147.
38. Wang Z., He Y., (2009), *Life Science Journal*, 6, 55-60.
39. Johnston J. W., Benson E. E., Harding K., (2009), *Plant Physiol. Bioch.*, 47, 123-131.
40. Helliot B., Madur D., Dirlwanger E., de Boucaud M. T., (2002), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 38, 493-500.
41. Aronen T. S., Krajnakova J., Häggman H. M., Rynnänen L. A., (1999), *Plant Science*, 142, 163-172.
42. Touchell D. H., Chiang V. L., Tsai C.-J., (2002a), *Plant Cell Rep.*, 21, 118-124.
43. Touchell D. H., Turner S. R., Bunn E., Dixon K. W., (2002b), in: Eds. L. E. Towill, Y. P. S. Bajaj, *Bio-technology in Agriculture and Forestry 50: Cryopreservation of Plant Germplasm*, part II., 357-372, Springer-Verlag, Berlin.

44. Harding K., (1994), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 37, 31-38.
45. Lu G., Wu X., Chen B., Gao G., u K., (2007), *J. Integr. Plant Biol.*, 49, 1599-1607.
46. Martín C., González-Benito M. E., (2009), in: *Conference programme, abstracts & participants. "Fundamental aspects of plant cryopreservation"* (17-18th February 2009), Royal Botanic Gardens, Kew, Wakehurst Place, West Sussex, UK, 31.
47. Turner S., Krauss S. L., Bunn E., Senaratna T., Dixon K., Tan B., Touchell D., (2001), *Plant Science*, 161, 1099-1106.
48. Harding K., Benson E. E., (2001), *CryoLetters*, 22, 199-208.
49. Ahuja S., Mandal B. B., Dixit S., Srivastava P. S., (2002), *Plant Science*, 163, 971-977.
50. DeVerno L. L., Park Y. S., Bonga J. M., Barrett J. D., (1999), *Plant Cell Rep.*, 18, 948-953.
51. Moukadiri O., Lopes C. T., Cornejo M. J., (1999), *Physiol. Plant*, 105, 442-449.
52. Wang Z. Y., Legris G., Nagel J., Potrykus I., Spangenberg G., (1994), *Plant Science*, 103, 93-106.
53. Xiong L. Z., Xu C. G., Maroof M. A. S., Zhang Q., (1999), *Mol. Gen. Genet.*, 261, 439-446.
54. Hao Y. J., Liu Q. L., Deng X. X., (2001), *Cryobiology*, 43, 46-53.
55. Hao Y. J., You C. X., Deng X. X., (2002a), *CryoLetters*, 23, 37-46.
56. Hao Y. J., You C. X., Deng X. X., (2002b), *CryoLetters*, 23, 27-35.
57. Harding K., Benson E. E., (2000), *CryoLetters*, 21, 279-288.
58. Chan S. W., Henderson I. R., Jacobson S. E., (2005), *Nat. Rev. Genet.*, 6, 351-360.
59. Ronemus M. J., Galbiati M., Ticknor C., Chen J., Dellaporta S. L., (1996), *Science*, 273, 654-657.
60. 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.
61. Li X., Xu M., Korban S. S., (2002), *J. Plant Physiol.*, 159, 1229-1234.
62. Peredo E. L., Arroyo-García R., Revilla M. Á., (2009a), *J. Plant Physiol.*, 166, 1101-1111.