

Kultury *in vitro* i krioprezerwacja w zachowaniu różnorodności roślin – standardy dla banku genów

Anna Mikula, Damian Makowski, Karolina Tomiczak, Jan J. Rybczyński

Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej w Powsinie
ul. Prawdziwka 2, 02-973 Warszawa, Polska

Abstrakt. Celem pracy jest przedstawienie nowych metod ochrony *ex situ* zasobów genowych roślin. Pierwsza polega na gromadzeniu materiału roślinnego w warunkach spowolnionego wzrostu kultury *in vitro*, druga zaś na zabezpieczaniu tkanek roślinnych (zarodków zygotycznych i somatycznych lub ich osi, pąków, wierzchołków wzrostu, merystemów) w ciekłym azocie (-196°C). Metody te uzupełniają tradycyjne sposoby zabezpieczania różnorodności roślin, których nie można gromadzić w postaci nasion.

Praca pokazuje postęp w badaniach na przestrzeni minionego stulecia i wykorzystanie zdobytej wiedzy w zachowaniu różnorodności roślin (głównie użytkowych), których wyraźne przyspieszenie nastąpiło dopiero z wejściem w nowe tysiąclecie. Przegląd dostępnej literatury oraz stanu zasobów roślinnych zgromadzonych w wybranych bankach genów wskazuje, że banki tkanek *in vitro* i ciekłego azotu są ciągle nową praktyką, wymagającą specjalistycznej wiedzy, sprzętu i personelu oraz stosunkowo wysokich nakładów finansowych i czasu na opracowywanie procedur mikrorozmnazania i krioprezerwacji. Wypracowane dotychczas standardy ułatwiają rozwijanie tych metod w różnych krajach na całym świecie. Wydaje się, że wysoki poziom bezpieczeństwa, długoterminowość i niski koszt wieloletniego utrzymywania materiału roślinnego w ciekłym azocie oraz współczesne wymogi ochrony zasobów genowych doprowadzą w najbliższej dekadzie do szerszego wykorzystania krioprezerwacji wspomaganej kulturami *in vitro*.

słowa kluczowe: ciekły azot, kriobanki, krioprezerwacja, ochrona *ex situ*

WSTĘP

Przechowywanie nasion/zarodników jest preferowaną metodą zabezpieczania roślinnych zasobów genowych.

Autor do korespondencji:

Anna Mikula
e-mail: amikula@obpan.pl
tel. +48 22 6483856

Praca wpłynęła do redakcji 12 czerwca 2013 r.

Jednakże nie dla wszystkich gatunków/odmian metoda ta może być wykorzystana. Kultury *in vitro* i krioprezerwacja otworzyły drogę gromadzeniu zasobów tych roślin, które nie tworzą nasion, np. banan, czosnek. Pozwalają na konserwację puli genowej kultywarów, których nasiona są wysoce heterozygotyczne, a ich walory użytkowe są przekazywane wyłącznie dzięki rozmnażaniu wegetatywnemu. Do tej grupy należą wiodące rośliny uprawne, których roczna światowa produkcja liczona jest w miliardach lub milionach ton, np. trzcina cukrowa (1,7 mld ton), ziemniak (324,4 mln ton), maniok (230,3 mln ton), słodki ziemniak (107,6 mln ton), banan (102 mln ton), czosnek (78,5 mln ton), jabłoń (69,5 mln ton), winorośl (67,1 mln ton) czy pochrzyn (48,3 mln ton) (FAOstat, 2010). Kolejną grupę stanowią rośliny, które produkują nasiona nietolerujące dehydratacji (ang. recalcitrant seeds), np. wiele drzew (dąb, orzech włoski, leszczyna, kasztanowiec, wierzba), liczne ważne gospodarczo rośliny klimatu tropikalnego (np. kauczukowiec, kawa, kakaoowiec, olejowiec gwinejski) i większość roślin wodnych. Ponadto metody te umożliwiają gromadzenie produktów manipulacji biotechnologicznych, które mogą wnieść nową jakość w poszerzanie walorów użytkowych roślin uprawnych czy nową wiedzę w badania podstawowe wykorzystujące rośliny modelowe. Dla wymienionych czterech grup roślin kultury *in vitro* w połączeniu z krioprezerwacją dostarczają narzędzia gwarantującego zabezpieczanie i długoterminowe przechowywanie ich zasobów genowych. Uzupełniają one w ten sposób tradycyjne sposoby zabezpieczania roślinnej bioróżnorodności. Metody te są rozwijane w ramach strategii *ex situ* ochrony zasobów genowych i prowadzą do tworzenia banków tkanek *in vitro* i ciekłego azotu (LN) (Engelmann, Engels, 2002). Drugi raport FAO poświęcony zabezpieczaniu światowych zasobów genowych donosi, że w ponad 1750 bankach genów, na które składają się banki nasion, kolekcje polowe, banki tkanek *in vitro* i ciekłego azotu, zgromadzono dotychczas około 7,4 mln obiektów (FAO, 2010). W raporcie brakuje jednak danych liczbo-

wych dotyczących udziału omawianych technik w zabezpieczonej puli obiektów.

Istotnym elementem strategii ochrony bioróżnorodności jest identyfikacja gatunków wymagających wykorzystania nowych metod gromadzenia zasobów genowych i stworzenie baz danych dla tej grupy roślin (Pennisi, 2010). Wiedza w tym zakresie pozwoli na oszacowanie kosztów, które należy wyasygnować na rozwijanie banków tkanek, w tym na kształtowanie odpowiedniej kadry i zaplecza sprzętowego. Podczas gdy liczba gatunków roślin uprawnych wymagających rozmnażania wegetatywnego i przechowywania niekonwencjonalnymi metodami jest znana, to liczba gatunków zagrożonych i wymierających przynależących do tej grupy jest trudna do określenia. Wstępnie szacuje się, że sięga ona co najmniej 5000 (Pence, 2011). Identyfikacja gatunków, dla których metody *in vitro* i krioprezervacja są niezbędne dla zabezpieczania ich zasobów genowych, polega na udzieleniu odpowiedzi na następujące pytania (rys. 1):

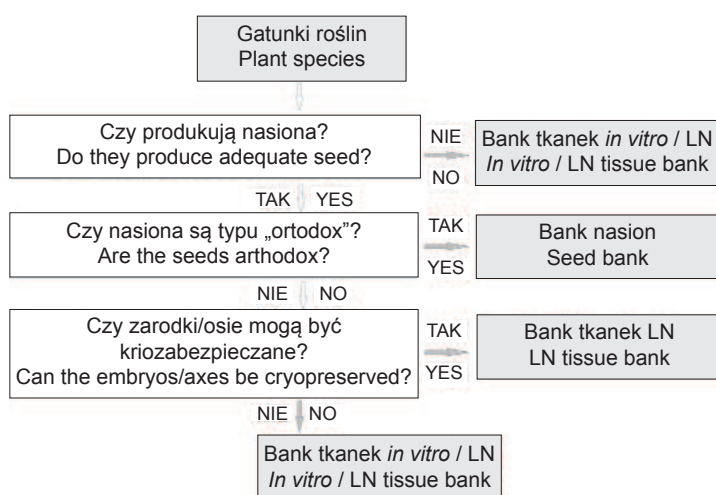
- 1) Czy gatunki produkują nasiona? Jeżeli dany gatunek nie produkuje nasion, wówczas alternatywą jest gromadzenie pąków wegetatywnych, stożków wzrostu, merystemów (pochodzących z natury lub *in vitro*) czy zarodków somatycznych w bankach tkanek *in vitro* i/lub ciekłego azotu. W przeciwnym razie należy odpowiedzieć na następne pytanie.
- 2) Czy produkowane nasiona są typu „orthodox”? Jeżeli gatunek produkuje nasiona „orthodox” gwarantujące właściwą reprodukcję, wówczas jego zasoby powinny być zabezpieczane za pomocą nasion. Jest to najprostsza i najtańsza forma gromadzenia zasobów różnorodności roślinnej, gwarantująca w krótkim czasie szybkie deponowanie odpowiednio dużych prób, reprezentujących wszystkie populacje ze stanowisk naturalnych. Je-

żeli nasiona są niezdolne do przetrwania dehydratacji, to należy udzielić odpowiedzi na pytanie nr 3.

- 3) Czy zarodki zygotyczne lub ich osie mogą być deponowane w LN? Dla gatunków produkujących nasiona „non-orthodox” w pierwszej kolejności zalecane jest wykorzystywanie izolowanych zarodków zygotycznych lub ich osi. Pozwala to na ograniczenie zaangażowania kultur *in vitro* i obniżenie kosztów wprowadzania materiału roślinnego do banku tkanek LN. W przypadku gatunków, dla których zarodki zygotyczne nie mogą być izolowane z nasion (np. są zbyt małe, zbyt wrażliwe na dehydratację czy uszkodzenia mechaniczne lub są niezdolne do osiągnięcia pełnej dojrzałości w kulturze *in vitro* i dalej do konwersji w roślinę), jedynym wyjściem jest wprowadzenie namnożonego *in vitro* materiału roślinnego do banku tkanek *in vitro* lub LN.

Kultury *in vitro* w zachowaniu różnorodności roślin i wypracowane standardy

Technika kultur *in vitro*, która do zainicjowania wymaga niewielkich fragmentów tkanek rośliny, wspiera konserwację roślinnych zasobów genowych przez: 1) udostępnienie nowych narzędzi gromadzenia i przechowywania komórek i tkanek roślinnych; 2) dostarczanie nieograniczonej ilości materiału roślinnego; 3) podniesienie bezpieczeństwa i usprawnienie dystrybucji zasobów genowych; 4) umożliwienie wykrywania i eliminowania chorób w materiale roślinnym; 5) usprawnienie identyfikacji użytecznych genów. Konserwacja *in vitro* polega na wieloletnim utrzymywaniu materiału roślinnego w sterylnych warunkach (odnawianych poprzez okresowe pasażę), jego dystrybucji, wymianie i reintrodukcji (Crop Genebank Knowledge Base - CGIAR, 2012; Pence i in., 2002). Dla większości roślin, które wymagają niekonwencjonalnego gromadzenia ich zasobów genowych, tworzenie banku tkanek *in vitro* poprzedzone jest opracowaniem warunków kultury. Do kluczowych elementów tego etapu należy opracowanie warunków: (I) inicjacji kultur (tj. wybór odpowiedniego eksplantatu, metody dezynfekcji i stabilizacji kultury), (II) mikro-rozmnażania (tj. eksperymentalne opracowanie warunków efektywnego mnożenia materiału roślinnego), (III) regeneracji pędów i korzeni, (IV) aklimatyzacji (polegającej na hartowaniu roślin do warunków *ex vitro*) oraz (V) kultury *in vitro* o spowolnionym typie wzrostu (rys. 2; białe strzałki). Dziesiątki lat doświadczeń w prowadzeniu



Rysunek 1. Identyfikacja gatunków wymagających wykorzystania kultur *in vitro* i/lub ciekłego azotu (LN) dla długoterminowego zabezpieczenia ich zasobów genowych w warunkach *ex situ*.

Figure 1. Identification of species which need *in vitro* propagation and/or liquid nitrogen (LN) storage for long-term *ex situ* preservation of their biodiversity.

kultur *in vitro* zaowocowały opracowaniem protokołów dla różnych gatunków roślin. Warunki mikrorozmnażania dla ponad 1000 gatunków opisano już w 1997 roku (Ashmore, 1997). W obecnie dostępnych opracowaniach literaturowych nikt nie podjął się ponownego podsumowania tych danych, jednakże śledząc liczbę ukazujących się co roku publikacji można wnioskować, że znacząco wzrosła także liczba wprowadzonych do kultur *in vitro* gatunków. Mimo nabytej wiedzy i doświadczenia w zakresie mikrorozmnażania roślin istniejąca zmienność międzyrodzajowa i międzygatunkowa nakłada obowiązek dopracowywania warunków kultury indywidualnie dla każdego nowo wprowadzanego gatunku i odmiany. Dopiero skuteczny i powtarzalny system inicjacji kultury *in vitro* oraz efektywnego rozmnażania zakończony pozyskiwaniem kompletnych roślin zdolnych do przystosowania się do warunków polowych otwiera drogę do tworzenia banku tkanek *in vitro* danego gatunku (rys. 2; szare strzałki).

Banki tkanek *in vitro* umożliwiają przechowywanie kompletnych roślin lub pędów. Bazują one na kulturach o spowolnionym typie wzrostu, który uzyskuje się poprzez liczne ograniczenia i zmiany w standardowych warunkach, aplikowanych pojedynczo lub w kombinacji. Modyfikacje dotyczą czynników fizycznych (tj. obniżenie temperatury, redukcja natężenia światła, zmiana fotoperiodu, zmniejszenie dostępu tlenu, indukowanie stresu osmotycznego za pomocą sorbitolu, mannitolu, sacharozy), zastosowania chemicznych substancji ograniczających wzrost (włączenie do pożywki inhibitorów wzrostu np. kwasu abscysynowego czy ancymidolu, podniesienie stężenia substancji żelujących, zmniejszenie ilości standardowo stosowanych roślinnych hormonów wzrostu) oraz substancji odżywczych (obniżenie zawartości makro- i mikroelementów, sacharozy, azotu) (Benson i in., 2011a). Najczęściej stosowane modyfikacje warunków kultury polegają na obniżeniu temperatury, która dla roślin tolerujących chłód oscyluje w zakresie 0–5°C, dla gatunków tropikalnych w zakresie 9–20°C (Engels, Visser, 2003). Stosując stałe oświetlenie 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (24 h/24 h), temperaturę 16°C i pożywki pozbawione hormonów wzrostu w *Musa International Transit Centre* (ITC) w Leuven, genotypy banana przechowuje się bez pasażu od 13 do 17 miesięcy (Benson i in., 2011b). Dla roślin manioku, które są znacznie bardziej wrażliwe na niską temperaturę niż banan, ograniczenie tempa wzrostu o 20% uzyskano obniżając temperaturę z 25–30°C do 20°C (Angel i in., 1996). Spowolnienie wzrostu w przypadku mięty i czosnku utrzymywanych w banku IPK w Gatersleben osiągnięto stosując temperaturę 2°C w kombinacji z innymi czynnikami ograniczającymi wzrost (Keller i in., 2005, 2006). Dla genotypów tych roślin pasażę są wykonywane odpowiednio co 15–18 miesięcy i co 12 miesięcy. Przykładem najdłużej utrzymywanego bez pasażu materiału roślinnego są pędy topoli, które w temperaturze 4°C wymagają pasażu raz na 5 lat (Son i in., 1991). Więcej przykładów modyfikowania składu pożywki

w celu uzyskania spowolnionego wzrostu *in vitro* można znaleźć w opracowaniu Benson i in. (2011a), a szczegółowe procedury funkcjonujące dla najważniejszych roślin użytkowych zostały zebrane przez Pence i in. (2002) czy Reed i in. (2004).

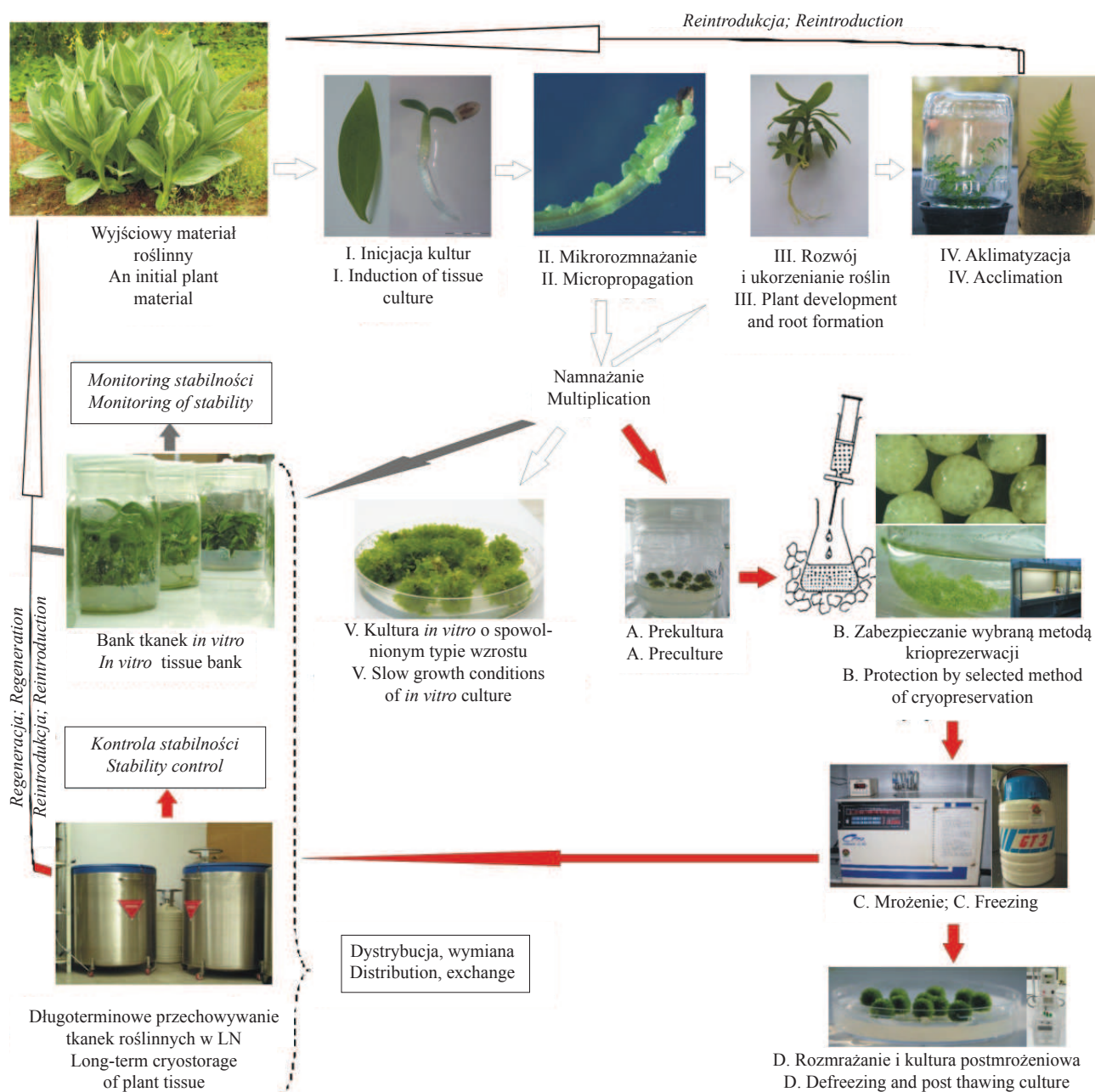
Opisane modyfikacje warunków kultury mają na celu spowolnienie wzrostu materiału roślinnego utrzymywanego *in vitro*, dzięki czemu uzyskuje się wiele korzyści: 1) ograniczenie liczby pasażu w ciągu roku; 2) obniżenie kosztów utrzymywania kultur; 3) zmniejszenie ryzyka utraty materiału roślinnego z powodu błędu człowieka; 4) ograniczenie ryzyka wystąpienia zmienności somaklonalnej. Podstawowe warunki kultur o spowolnionym typie wzrostu zostały opracowane i są wykorzystywane już od lat 70. XX wieku, kiedy to zaczęto wdrażać kultury *in vitro* do masowej produkcji roślin (Altman, Loberant, 1997). Ich głównym zadaniem było długoterminowe utrzymywanie wolnego od chorób materiału matecznego roślin ozdobnych (np. z rodzaju *Dianthus*, *Syngonium*) i użytkowych (np. *Solanum*, *Musa*, *Malus*, *Pyrus*, *Citrus*). Pierwszym etapem wdrażania metod *in vitro* dla konserwacji zasobów genowych w bankach tkanek było powołanie w 1982 r. przez IBPGR (obecnie IPGRI: International Plant Genetic Resources Institute) Komitetu Doradczego (ang. Advisory Committee for *In Vitro* Storage), którego celem było zbieranie możliwości wykorzystania tej techniki dla zachowania bioróżnorodności (Pence i in., 2002).

Jedną z głównych zalet konserwacji zasobów genowych w warunkach *in vitro* jest utrzymywanie materiału roślinnego wolnego od patogenów grzybowych i większości bakteryjnych. W przypadku wirusów, których standardowe metody dezynfekcji nie usuwają, istnieje możliwość ich eliminowania za pomocą innych dostępnych metod (termo-, chemo- i krioterapia) (Wang i in., 2009). Kolejną zaletą jest zwiększenie bezpieczeństwa i obniżenie kosztów prowadzenia wymiany materiału roślinnego np. między bankami i ogrodami botanicznymi. Duża ilość materiału potomnego, uzyskiwana w stosunkowo krótkim czasie, daje możliwość jego wszechstronnej eksploatacji, np. na potrzeby banków tkanek *in vitro* i LN, do bezpośredniego wykorzystania do celów badawczych czy użytkowych, wymiany i reintrodukcji, jak również opracowywania i modyfikowania warunków krioprezerwacji i postmroźniowej regeneracji.

Wadą utrzymywania materiału roślinnego w kulturach *in vitro* o spowolnionym typie wzrostu jest konieczność prowadzenia okresowych pasażu. Niosą one ryzyko wystąpienia zakażeń oraz utraty tkanek z powodu błędu człowieka. Innym poważnym ograniczeniem jest ryzyko wystąpienia zmienności somaklonalnej. Zjawisko to towarzyszy głównie roślinom regenerowanym za pośrednictwem tkanki kalusowej oraz przez pąki przybyszowe. Częstotliwość występowania zmienności somaklonalnej zwiększa się wraz z wydłużaniem czasu trwania kultury, czego wyraźnym symptomem jest obniżanie się totipotencjalnych zdol-

ności (Benson i in., 2011a). Biorąc pod uwagę powyższe mankamenty, w czasie przygotowywania materiału roślinnego na potrzeby konserwacji *in vitro* jego zasobów genowych zalecane jest: 1) unikanie mikrorozmnażania przez kalus i pąki przybyszowe, 2) ograniczenie do niezbędnego

minimum wykorzystywania roślinnych regulatorów wzrostu, które stymulują odróżnicowanie i tworzenie tkanki kalusowej oraz rozwój pąków przybyszowych, 3) pobieranie materiału roślinnego z młodych kultur, 4) każdy genotyp powinien być reprezentowany przez odpowiednio



Rysunek 2. Kluczowe elementy kultury *in vitro* (strzałki białe), tworzenia banku tkanek *in vitro* (szare strzałki) i kriobanku (czerwone strzałki). I–V: etapy wymagające eksperymentalnego opracowania przed inicjacją banku tkanek *in vitro*. A–D: etapy krioprezervacji wymagające eksperymentalnego opracowania przed inicjacją banku tkanek w ciekłym azocie (LN).

Figure 2. Key elements of *in vitro* tissue (white arrows), of *in vitro* bank (grey arrows) and of cryobank (red arrows). I–V: stages of experimental studies for *in vitro* bank establish. A–D: stages of cryopreservation procedure need experimental studies for cryobank establish.

dużą próbkę i zdeponowany, dla bezpieczeństwa, w kilku różnych bankach; wielkość próby powinna być określana eksperymentalnie np. w zależności od zdolności regeneracyjnych badanego gatunku, 5) warunki przechowywania zduplikowanej próbki w różnych bankach powinny być jednakowe.

Oprócz konieczności wykonywania okresowych pasży istotnym elementem utrzymywania banku tkanek *in vitro* jest monitorowanie stabilności genetycznej materiału roślinnego (w tym z wykorzystaniem markerów molekularnych) oraz usuwanie eksplantatów wykazujących jakiegokolwiek cechy chimerizmu. Regularne kontrolowanie stabilności genetycznej jest szczególnie zalecane dla materiału roślinnego o podwyższonym ryzyku występowania zmienności somaklonalnej (np. ziemniak, słodki ziemniak, trzcina cukrowa) (Benson i in., 2011a).

Krioprezerwacja w zachowaniu różnorodności roślin i wypracowane standardy

Idealne warunki długoterminowego gromadzenia zasobów genowych roślin można uzyskać łącząc wysoką efektywność mikrorozmnażania *in vitro* z właściwościami ciekłego azotu (rys. 2), którego ultraniska temperatura hamuje podziały komórkowe i skutecznie spowalnia wszelkie procesy życiowe zachodzące w komórce (Engelmann, 2011). Mimo często spotykanego twierdzenia, ciekły azot nie zatrzymuje całkowicie chemicznych i fizycznych reakcji w komórkach. Badania przeprowadzone na nasionach 42 gatunków roślin przechowywanych w LN lub jego parach przez okres od 10 do 21 lat wykazały obniżenie zdolności do kiełkowania nasion 12 gatunków, w tym sałaty (Walters i in., 2004). Na podstawie dokonanych obliczeń, szacowany czas połowicznej utraty żywotności nasion sałaty przechowywanych w parach LN (-135°C) wynosi około 500 lat, zaś w LN (-196°C) około 3400 lat. Pomimo iż procesy starzenia w komórkach nie ustają całkowicie, to jednak LN może być uznany za najbezpieczniejszy poznany dotychczas sposób długoterminowego przechowywania materiału roślinnego (Walters i in., 2004). Teoretycznie w takich warunkach można deponować każdy rodzaj materiału roślinnego, tj. od pozbawionego ścian komórkowej protoplastu, poprzez pojedyncze komórki i agregaty komórkowe, merystemy czy wierzchołki wzrostu, po struktury bardziej zróżnicowane, jakimi są pąki i zarodki (Reed, 2008). Ostatecznie jednak dla zachowania różnorodności roślin w kriobankach najczęściej wykorzystuje się merystemy, wierzchołki wzrostu zawierające od jednego do trzech zawiązków liści, zarodki somatyczne w stadium młodocianym, osie zarodków zygotycznych oraz pąki spoczynkowe. Sięgając po mniej uorganizowany materiał roślinny dąży się do ograniczenia histologicznego zróżnicowania i wynikającej z niego silnej wakuolizacji pewnych grup komórek (Engelmann, 2011). Zmienny poziom uwodnienia różnych tkanek znacznie ogranicza właściwe kriozabezpieczanie

i może prowadzić do powstawania nekroz w eksplantacie i dalej do proliferacji niepożądanego tkanki kalusowej. Odpowiedni eksplantat wyjściowy jest więc podstawą udanej krioprezerwacji, a jego dobór odbywa się drogą eksperymentalną.

Warunkiem utworzenia kriobanku jest, w pierwszym etapie, opracowanie efektywnej i powtarzalnej procedury rozmnażania klonalnego (rys. 2; białe strzałki). Dopiero posiadanie dużej puli roślin pozwala na przejście do etapu drugiego, tj. opracowania procedury kriozabezpieczania, na którą składają się następujące elementy: A. prekultura (hartowanie), B. zabezpieczanie materiału roślinnego wybraną metodą krioprezerwacji, C. mrożenie i D. rozmrażanie i kultura postmrożeniowa (rys. 2; czerwone strzałki). Poszczególne etapy dla jednych gatunków mogą być pomijane, dla innych rozbudowywane w zależności od naturalnej tolerancji na stres chłodu i/lub niedostatku wody. Są to sekwencje, których wykorzystanie ma na celu jak najlepsze przygotowanie materiału biologicznego do przetrwania stresu mrożenia i rozmrażania oraz towarzyszących im konsekwencji (Benson, 2008). Każdy etap protokołu musi być indywidualnie zoptymalizowany. Wypracowane dotychczas standardy postępowania i konkretne procedury kriozabezpieczania dla różnych typów eksplantatów oraz różnych grup roślin zebrano i przedstawiono w opracowaniu wydanym pod redakcją Barbary Reed (2008). Podstawowe uwarunkowania obejmujące następstwa mrożenia i rozmrażania żywych tkanek, wpływ morfologicznego zróżnicowania materiału roślinnego na jego przeżywalność, fizykochemiczne zmiany adaptacyjne komórek w czasie prekultury (będącej alternatywną drogą nabywania mrozowej tolerancji w warunkach *in vitro*), techniki krioprezerwacji i warunki ich modyfikowania zostały omówione wyczerpująco na łamach kwartalnika Biotechnologia i nie będą poruszane w niniejszej pracy (Mikuła, Rybczyński, 2006; Mikuła, 2008).

Zdolność do przetrwania mrożenia w LN bez jakiegokolwiek zabezpieczania ma nieliczna grupa roślin, charakteryzująca się wysoką tolerancją na stres chłodu i suszy. Taki materiał roślinny można wprowadzać niemalże bezpośrednio do LN, oczywiście pod warunkiem, że znajduje się on w stanie głębokiego spoczynku. Najlepszym przykładem są pąki spoczynkowe (zimowe) roślin drzewiastych klimatu umiarkowanego, np. jabłoni, gruszy, wiązu, morwy, czereśni czy róży (tab. 1). Zabezpieczone przez „naturę”, pobierane w styczniu lub lutym, poddane jedynie dodatkowej 13-tygodniowej dehydratacji do wilgotności około 30% są bezpiecznie deponowane w ciekłym azocie, najczęściej z wykorzystaniem metody powolnego schładzania (Towill, Ellis, 2008). Przykłady roślin oraz banki genów wykorzystujące pąki spoczynkowe do gromadzenia roślinnych zasobów genowych lub opracowujące protokoły ich kriozabezpieczania zebrano w tabeli 1. Inne eksplantaty, takie jak zarodki zygotyczne i somatyczne lub ich osie, są znacznie częściej wykorzystywanym rodzajem materiału roślinnego, o czym może świadczyć fakt, że pro-

Tabela 1. Przykłady roślin i banków genów/placówek naukowych, które opracowały protokoły krioprezerwacji i/lub wykorzystują pąki spoczynkowe dla zabezpieczania zasobów genowych

Table 1. Example of plants and of genebanks/research centres that worked out crypreservation protocols and/or exploit the dormant buds for biodiversity conservation.

Rodzaj Genus	Wielkość kolekcji Collection size	Bank genów/Uniwersytet Genebank/University	Literatura References
<i>Malus</i>	2563 obiektów; accessions	USDA (Fort Collins, USA)	Keller i in., 2008 Fort Collins, Colorado, 2012
<i>Pyrus</i>	100 obiektów; accessions		
<i>Prunus</i>	75 obiektów; accessions		
<i>Salix</i>	27 obiektów; accessions		
<i>Ulmus</i>	440 obiektów; accessions	AFOCEL (Nangis, Francja)	Harvenget i in., 2004
<i>Morus</i>	420 obiektów; accessions	NIAR (Japonia)	Niino, 1995
<i>Malus</i>	105 odmian; varieties	Narodowy Bank Genów (PAN OB-CZRB, Warszawa, Polska) National Genebank (PAS BG-CBDC, Warsaw, Poland)	Woliński, informacja ustna, 2012 Woliński, personal communication 2012
<i>Pyrus</i>	10 odmian; varieties		
<i>Prunus</i>	5 odmian; varieties		
<i>Rosa</i>	5 gatunków; species	Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Polska University of Agriculture in Krakow, Poland	Pawłowska, 2012

tokoły ich krioprezerwacji opisano dla ponad 100 różnych gatunków strefy klimatu tropikalnego i umiarkowanego, roślin warzywnych, sadowniczych, drzew leśnych oraz wielu gatunków chronionych. Zwięzła charakterystyka tego materiału roślinnego oraz zaangażowane techniki krioprezerwacji zostały podsumowane w najnowszej pracy Engelmann (2011).

Kontrolowanie stabilności genetycznej materiału roślinnego poddawanego krioprezerwacji jest istotnym elementem funkcjonowania kriobanków, jakkolwiek badania w tym zakresie są ciągle jeszcze sporadycznie prowadzone (Mikuła, 2010). Teoretycznie w czasie długoterminowego przechowywania tkanek w ultraniskiej temperaturze ciekłego azotu nie powinny być indukowane żadne zmiany. Sprzyja temu blokowanie metabolizmu i brak pasażu. Potwierdzają to dane literaturowe opublikowane dla wierzchołków wzrostu *Rubus* przechowywanych w LN ponad 12 lat (Castillo i in., 2010), embriogenicznej zawiesziny komórkowej *Gentiana cruciata* pozostającej w LN 1,5 roku (Mikuła i in., 2011b) oraz embriogenicznych linii 6 genotypów *Quercus robur* i wierzchołków wzrostu *Cosmos atrosanguineus* krioprechowywanych 1 rok (Sánchez i in., 2008; Wilkinson i in., 2003).

Mimo że samo przechowywanie w LN jest bezpieczne, to do utraty stabilności genetycznej mogą prowadzić procedury zabezpieczające materiał roślinny, bazujące na silnej dehydratacji oraz traktowaniu krioprotektantami. Przykładem mogą być modyfikacje w sekwencjach DNA (3 dodatkowe prążki AFLP) odwodnionych do 25% zawartości wody zarodków somatycznych *Quercus suber*

(Fernandes i in., 2008). Zmiany nie były odnotowane, gdy zarodki odwadniano do wilgotności 30%. W wierzchołkach wzrostu *Chrysanthemum x morfolium* dehydratacja osmotyczna (wywołana 0,3 M sacharozą – pierwszy krok metody kapsułkowania/dehydratacji) była przyczyną zaniku 1 produktu RAPD we wszystkich analizowanych próbkach (Martin i in., 2011). Każdy kolejny etap procedury przygotowania do przechowywania w LN, pogłębiający dehydratację, poszerzał również pulę zmienności. Inną przyczyną niestabilności genetycznej może być różna wrażliwość poszczególnych genotypów, co doprowadziło np. do powstania 7 zmian RAPD w jednym i tym samym zarodku somatycznym spośród przebadanych w sumie 240 osobników (Sánchez i in., 2008). Tego typu modyfikacje są najczęściej wywoływane warunkami kultury *in vitro*.

Dane zebrane w tabeli 2 wskazują, że zmiany sekwencyjne związane z krioprezerwacją (rozumianą jako oddziaływanie kompleksowe lub poszczególnych jej etapów, tj. mikrorozmnażania, krio zabezpieczania, krioprechowowania, postmrozeniowej regeneracji) są indukowane stosunkowo rzadko. W sumie w 2014 przebadanych roślinach wykryto zaledwie 45 polimorficznych fragmentów (tab. 2). W większości prac autorzy stwierdzają, że zmiany te wynikają bardziej z wpływu samej kultury *in vitro* niż z czynności związanych z przygotowaniem tkanki do przechowywania w LN i jej przechowywania. Ostateczną konkluzją większości prac jest podkreślenie celowości prowadzenia badań molekularnych, które pozwalają z jednej strony na wskazanie gatunków wrażliwych na kriotraktowanie, wskazanie metod krioprezerwacji bardziej niebezpiecznych z punktu widzenia stabilności genetycznej (jeśli

takie są), z drugiej zaś na wyeliminowanie pojedynczych osobników, w których doszło do wystąpienia zmian.

Zalety i wady przechowywania roślinnych zasobów genowych w kriobankach

W kriogenicznych kolekcjach, dzięki ultraniskiej temperaturze, jaką zapewnia ciekły azot, nasiona, fragmenty roślin, tkanki czy komórki mogą być niemalże bezterminowo przechowywane w stosunkowo niedużej objętości (Walters i in., 2004). Ogromną zaletą kriokonserwacji jest bezpieczeństwo, długoterminowość i niski koszt utrzymywania materiału roślinnego. Dla porównania, roczny koszt utrzymania jednego drzewa owocowego w kolekcji polowej NCGR, Corvallis, USA oszacowano na 77 \$, jednego obiektu w kulturze *in vitro* na 23 \$, zaś rocznego przechowywania próbki w LN na 1 \$ (Hummer, Reed, 2000). Podsumowując pełne koszty pożywek i pracy, utrzymanie 200 linii genetycznych przez 20 lat w kulturze *in vitro* kosztuje ok. 102 tys. \$, podczas gdy próbek przechowywanych

w warunkach kriogenicznych 62 tys. \$ (Pence, 2011). Istotnym atutem krioprzechowywania jest brak konieczności okresowego odtwarzania kolekcji roślinnych, prowadzenia zabiegów pielęgnacyjnych czy regularnego monitorowania żywotności. Materiał utrzymywany w ciekłym azocie nie jest narażony na choroby, szkodniki, zmiany klimatyczne oraz błąd człowieka; w mniejszym stopniu podlega również klęskom żywiołowym.

Wadą, która znacząco ogranicza wdrażanie krioprezerwacji do rutynowego wykorzystywania, jest konieczność posiadania dobrze wyposażonego laboratorium biotechnologicznego oraz fachowego personelu. Ponadto wysokie są koszty mikrorozmnażania i krio zabezpieczania materiału roślinnego, które są ponoszone jednorazowo przed jego zdeponowaniem w LN. Są one szacowane średnio na ok. 25 do 200 \$ (Pence, 2011). Koszty te rozłożone (potencjalnie) na setki, a nawet tysiące lat przechowywania są jednak minimalne w porównaniu z regularnymi, corocznymi nakładami na utrzymanie i prowadzenie np. kolekcji polowych (Li, Pritchard, 2009). Jak oszacowano, średni

Tabela 2. Liczbowe zmiany w sekwencjach DNA w materiale roślinnym poddanym krioprezerwacji
Table 2. Numerical data showing DNA structure changes in cryopreserved plant material.

Gatunek Species	Technika Technique	Liczba fragmentów polimorficznych No. of polymorphic fragments		Liczba próbek No. of samples	Literatura References
<i>Dioscorea floribunda</i>	RAPD	1		80	Ahuja i in., 2002
<i>Dioscorea bulbifera</i>		1		80	Dixit i in., 2003
<i>Dendranthema grandiflora</i>		1		46	Martín, González-Benito, 2005
<i>Oryza sativa</i>		1		12	Moukadiri i in., 1999
<i>Picea glauca</i>		0		230	DeVerno i in., 1999
<i>Quercus robur</i>		0	0		
(6 genotypów)		0	0	240	Sánchez i in., 2008
(6 genotypes)		0	7		
<i>Hypericum perforatum</i>	VNTR	2		50	Urbanová i in., 2006
<i>Rubus</i> sp. (4 kultywary) (4 cultivars)	SSR	0		27	Castillo i in., 2010
<i>Rubus</i> sp. (4 kultywary) (4 cultivars)	AFLP	0		27	Castillo i in., 2010
<i>Gentiana cruciata</i>		2		288	Mikuła i in., 2011b
<i>Carica papaya</i>	RAF	0	0		
(6 genotypów)		2	9	900	Kaity i in., 2008
(6 genotypes)		5	14		
Przed i po aklimatyzacji Before and after acclimation		0		34	Kaity i in., 2009
Suma; Total:		45		2014	

Użyte skróty; Abbreviation:

RAPD – Randomly Amplified Polymorphic DNA; VNTR – Variable Number of Tandem-Repeats; SSR – Simple Sequence Repeats; AFLP – amplified DNA methylation polymorphism; RAF – randomly amplified DNA fingerprinting.

roczny koszt krioprezerwacji, kultur *in vitro* i aklimatyzacji jednego wierzchołka wzrostu *Solanum tuberosum* wynosi 13–20 euro, co stanowi ok. 25% kosztów (50–60 euro) utrzymywania jednego osobnika w kolekcji polowej (Keller i in., 2008). Najbardziej kosztowne i pracochłonne jest jednak opracowywanie warunków mikrorozmnażania, kriozabezpieczania i regeneracji nowo wprowadzanych do kultur *in vitro* gatunków. Koszty te można zredukować wykorzystując opracowaną procedurę (często wymagającą jedynie drobnych modyfikacji) dla wielu roślin, co jest możliwe w przypadku odmian uprawnych jednego gatunku lub różnych gatunków w obrębie jednego rodzaju. Z tego względu w obecnie funkcjonujących kriobankach roślin użytkowych dostrzec można wyraźną specjalizację gatunkową lub rodzajową. Innym ograniczeniem banków tkanek LN może być wielkość próby reprezentującej daną populację, która z jednej strony nie powinna być zbyt duża (ze względu na koszty kriozabezpieczania), z drugiej zaś powinna być reprezentatywna.

Krioprezerwacja – od pomysłu do praktycznego wykorzystania

Rośliny jako organizmy niezdolne do ucieczki przed niskimi temperaturami, a jednocześnie zdolne do ich przetrwania, swoimi predyspozycjami jako pierwsze przyciągnęły uwagę badaczy. Pod koniec XIX wieku zaczęto baczniej przyglądać się ich wytrzymałości na ujemne temperatury, ich mrozowej tolerancji oraz reakcji komórek roślinnych na mrożenie. Istotnym elementem ówczesnych badań było odkrycie istnienia endogennych substancji ochronnych aktywowanych niskimi temperaturami. W 1897 roku Hans Molisch w swojej monografii dowiódł, że skład i koncentracja substancji zawartych w cytoplazmie komórek roślinnych wpływa na ich przeżywalność po mrożeniu (za Stout, 1982). W 1907 r. Lidforss pracując nad wiecznie zielonymi roślinami zwrócił uwagę, że węglowodany w okresie zimowym zmieniają swój skład chemiczny, a dzięki eksperymentom *in vitro* wykazał ich krioochronne właściwości (za Benson, 2004). Dalszy istotny wkład w rozwój kriobiologii wniósł rosyjski naukowiec z Uniwersytetu w Petersburgu, który w 1912 r. jako pierwszy zaprezentował „teorię krioochrony”. Maximov postulował, że śmierć komórek w czasie mrożenia następuje w wyniku nagromadzenia kryształów lodu w przestworach międzykomórkowych, które odwadniają (zagęszczając sok komórkowy) i mechanicznie uszkadzają komórki (za Benson, 2004). Dla potwierdzenia swojej hipotezy badacz ten testował ochronne właściwości egzogenego glicerolu (którego późniejsze ponowne odkrycie zrewolucjonizowało krioprezerwację), glukozy, mannitolu, alkoholu etylowego i metylowego na przeżywalność tkanek czerwonej kapusty głowistej eksponowanych na temperatury w zakresie od -5,8° do -32°C.

Podwaliny, które dały kriobiologii/krioprezerwacji organizmy roślinne, stały się źródłem inspiracji do dalszych badań, kontynuowanych z wykorzystaniem różnorodnego materiału żywego (od bakterii i drożdży, poprzez komórki jajowe i plemnikowe, zarodniki i nasiona, aż po tkanki wybranych przedstawicieli świata roślin i zwierząt). Jednym z najważniejszych osiągnięć przełomu lat 30. i 40. były badania Basilea Luyeta, nazywanego dziś ojcem współczesnej kriobiologii. Odkrył on i zdefiniował proces witrifikacji zachodzący podczas schładzania, polegający na przechodzeniu ze stanu ciekłego w stan zeszklenia z pominięciem krystalizacji (Luyet, Gehenio, 1940). Efektem badań tego okresu było zregenerowanie po raz pierwszy mrożonych w ciekłym azocie gametofitów mchu (Luyet, Gehenio, 1938) oraz otrzymanie żywotnych plemników żaby (Luyet, Hodapp, 1938).

Od momentu zamrożenia w LN pierwszych tkanek roślinnych do wykorzystywania tego narzędzia dla rutynowego zabezpieczania materiału roślinnego minęło niemalże 60 lat. Ten czas był potrzebny na wypracowanie metod pozwalających na omijanie niekorzystnego wpływu obecności ściany komórkowej i wakuol, oraz na pokonanie niemożności indukowania mrozowej tolerancji u gatunków klimatu tropikalnego. W czasie mozolnego zgłębiania teoretycznych podstaw kriozabezpieczania materiału roślinnego (Sakai, 2004; Benson, 2008) krioprezerwacja tkanek zwierzęcych stała się aktywnym obszarem badawczym. Było to możliwe dzięki ponownemu odkryciu (tym razem dla tkanek zwierzęcych) krioochronnych właściwości glicerolu (Polge i in., 1949), odkryciu DMSO (Lovelock, Bishop, 1959) oraz roztworu witrifikacyjnego (Nash, 1966), co w konsekwencji doprowadziło w latach 50. XX wieku do burzliwego rozkwitu badań, szybkiego postępu oraz praktycznego wykorzystania ciekłego azotu dla tkanek zwierzęcych i ludzkich. W tym zakresie najwcześniej, bo już w 50–60. latach XX wieku, wypracowano metody zabezpieczania komórek krwi (Fuller, 2004). Kolejnym ważnym etapem było opanowanie techniki efektywnego mrożenia plemników i oocytów. Od wielu lat na całym świecie z powodzeniem funkcjonują kriobanki krwi pępowinowej, skóry i naskórka, tkanek oka, zastawek serca i naczyń krwionośnych, komórek wysp trzustkowych, chrząstki i kości do autologicznego przeszczepiania. Jak dotąd nieosiągalne pozostaje przechowywanie w LN całych organów, tj. nerek, wątroby czy serca. Jednocześnie zaczęto wykorzystywać ciekły azot jako narzędzie wspierające konserwację zagrożonych gatunków zwierząt (Wildt, 1992), co jest z powodzeniem rozwijane w wielu kriobankach na świecie oraz wspólnych międzynarodowych przedsięwzięciach (Frozen Ark Project, 2012).

Na spektakularne osiągnięcia w zakresie krioprezerwacji materiału roślinnego trzeba było czekać do 1973 roku, kiedy to do ciekłego azotu z powodzeniem wprowadzono komórki zawiesiny marchwi (Nag, Street, 1973). Wyniki

tych badań opublikowano na łamach czasopisma *Nature*, co świadczy o dużej ich wartości. Kolejnych 8 lat było potrzebne, by zamrozić w LN silnie uwodnione, zróżnicowane tkankowo i organowo struktury, jakimi są zarodki somatyczne (Withers, 1979). Ciekły azot najwcześniej znalazł praktyczne zastosowanie dla zabezpieczania wyprawdzonych *in vitro* embriogenicznych tkanek kalusowych klonów elitarnych genotypów roślin iglastych (Cyr, 1999). Dla tego typu materiału roślinnego i tej grupy roślin nadal pozostaje wysoce efektywna, opisana najwcześniej, technika powolnego schładzania (Withers, King, 1980). Krokiem milowym w rozwoju roślinnej krioprezerwacji było opisanie w latach 90. XX wieku tzw. nowych technik kriozabezpieczania: wityfikacji (Sakai i in., 1990), kapsułkowania-dehydratacji (Fabre, Dereuddre, 1990) i kropli (Schäfer-Menuhr i in., 1997). Umożliwiają one wprowadzanie do LN wszystkich gatunków, bez względu na ich klimatyczne pochodzenie oraz stopień histologicznego i organowego zróżnicowania eksplantatów.

Do roślinnych banków genów ciekły azot zaczęto wdrażać dopiero na przełomie XX i XXI wieku. Pierwsze doniesienia o wykorzystaniu protokołów krioprezerwacji dla tworzenia kolekcji roślinnych zostały przytoczone w raporcie FAO opublikowanym w 1995 r. (Ashmore, 1997). Były to 4 ośrodki zlokalizowane na Kubie, w Chinach, Indiach i Pakistanie, w których ciekły azot użyto dla konserwacji materiału roślinnego otrzymanego *in vitro*, w sumie 20 gatunków roślin. Od 1997 r. krioprezerwację zaczęto wdrażać w jednym z najstarszych europejskich banków genów, IPK (Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research) w Gatersleben w Niemczech (założony w 1943 r.) (Keller i in., 2011).

Banki tkanek *in vitro* i ciekłego azotu na świecie

Pierwsze banki genów ustanowiono ponad pół wieku temu. Funkcjonowały one głównie w oparciu o kolekcje polowe oraz gromadzenie nasion. Obecnie na świecie zarejestrowanych jest ponad 1750 banków (FAO, 2010), jednakże trudno jest określić, ile z nich wdrożyło już ciekły azot. Wiadomo natomiast, że spośród około 500 banków zarejestrowanych w Europie zaledwie 20 wykorzystuje ciekły azot do gromadzenia zasobów różnorodności roślinnej. Tak niewielka liczba może wskazywać na to, że nowoczesne metody ochrony zasobów genowych roślin są ciągle nową praktyką, wymagającą specjalistycznej wiedzy, sprzętu i personelu oraz stosunkowo wysokich nakładów finansowych na opracowywanie procedur kriozabezpieczania.

Większość banków genów, które sięgnęły po nowoczesne metody zabezpieczania tkanek roślinnych, oprócz nasion, utrzymuje również olbrzymie kolekcje polowe roślin użytkowych. Można więc pokusić się o stwierdzenie, że to wysokie koszty i duże ryzyko utrzymywania materiału roślinnego w kolekcjach polowych skłoniły te banki

do wdrażania nowych narzędzi ochrony *ex situ*. Przykładem banku genów o tak szerokiej działalności jest IPK w Gatersleben (Niemcy), w którym zgromadzono w postaci nasion, tkanek i roślin ponad 151 tys. obiektów należących do 3312 gatunków i 776 rodzajów. W banku tym znajdują się depozyty roślin warzywnych, leczniczych, zbożowych, strączkowych, pastewnych i starych odmian ziemniaka. W bankach polowych IPK utrzymywanych jest 9,2% obiektów, zaś w LN zgromadzono do tej pory 1180 odmian ziemniaka, 79 obiektów czosnku i 48 mięt, co stanowi niecały 1% całej kolekcji utrzymywanej w tym banku (IPK, Gatersleben 2012).

Innym bankiem gromadzącym zarówno zasoby genowe roślin uprawnych, jak i zwierząt hodowlanych jest NCGRP (National Center for Genetic Resources Preservation) w Fort Collins, Colorado. W banku tym zgromadzono ponad 410 tys. obiektów roślinnych reprezentowanych przez 1410 rodzajów i 8355 gatunków (98,8% to nasiona przechowywane w -18°C) (Fort Collins, 2012). W ciekłym azocie przechowuje się pąki zimowe *Malus* (2563 obiekty), *Pyrus* (100 obiektów), *Prunus* (75 obiektów) i *Salix* (27 obiektów) (tab. 1) oraz wierzchołki wzrostu *Pyrus*, *Rubus*, *Ipomoea*, *Allium sativum*, *Solanum*, *Fragaria*, *Humulus*, *Mentha*, *Lolium*. W sumie w ciekłym azocie zgromadzono dotychczas w tym banku 3351 obiektów (Keller i in., 2008; Fort Collins, 2012).

Często banki specjalizują się w zabezpieczaniu gatunków należących do tylko jednego lub zaledwie kilku wybranych rodzajów. Przykładem takiego funkcjonowania może być bank tkanek w KU Leuven (Katholieke Universiteit Leuven) w Belgii. Gromadzone są tam odmiany *Musa balbisiana* i *M. acuminata* oraz *Ensete* spp. utrzymywane od połowy lat osiemdziesiątych w kolekcjach polowych w Hondurasie, Nigerii, Burundi, Gwadelupie i Kostaryce. Do końca 2004 r. w LN zdeponowano w tym banku 306 obiektów banana, a 1177 obiektów utrzymywano w warunkach spowolnionego wzrostu *in vitro* (van den Houwe i in., 2004). Obecnie liczba obiektów zgromadzonych w LN sięga 760, a w *in vitro* 1185, co przekracza połowę przechowywanych na świecie zasobów tej rośliny (KU Leuven, 2012). Ze względu na koszty konserwacji i dystrybucji zasobów *Musa* zalecanym kierunkiem rozwoju jest zastępowanie kolekcji *in vitro* długoterminowym przechowywaniem obiektów w LN (Garmin i in., 2010).

Innym przykładem jest CIP (International Potato Center) w Limie, Peru, który jest jednym z 15 centrów wspieranych przez CGIAR (Consultative Group on International Agricultural Research). Bank ten utrzymuje obecnie 7180 odmian ziemniaka, 8026 obiektów słodkiego ziemniaka i 1556 odmian korzeniowych i bulwiastych gatunków dzikich i udomowionych roślin andyjskiego pochodzenia (CIP, 2012). Wśród zgromadzonych obiektów ziemniaka 446 jest utrzymywanych w LN, zaś 7 tys. w warunkach kultur *in vitro* (Gonzalez-Arnan i in., 2008). Bank RDA (Rural Development Administration) przy NAC (National

Agrobiodiversity Center) w Suwon, w Republice Korei zgromadził w postaci nasion oraz żywych kolekcji 173217 obiektów roślin uprawnych (m.in. pieprz, pomidor, kapustne) (RDA, 2012). W jego kriobanku (utworzonym w 2008 r.) gromadzone są zasoby genowe czosnku, herbaty i ziemniaka. W CRI (Crop Research Institute) w Czechach utrzymywane są zasoby ziemniaka i chmielu (w LN zdeponowano dotychczas 55 obiektów ziemniaka i 50 obiektów chmielu) (Faltus, Vagner, 2011). W CIAT (International Center for Tropical Agriculture), w Kolumbii, obok kolekcji *Phaseolus* spp. oraz roślin paszowych znajduje się największa na świecie kolekcja manioku utrzymywana w kulturze *in vitro* (CIAT, 2012). W sumie zgromadzono tam 6592 obiekty z 28 krajów, reprezentowane przez 5709 klonów *Manihot esculenta* i 883 genotypy gatunków dzikich. Materiały pochodzą przede wszystkim z Kolumbii (38,5%), Brazylii (24,7%) i Ameryki Południowej (21,7%). Jak dotąd spośród zgromadzonych obiektów aż 33556 próbek zostało rozdyskrebowanych do instytucji i użytkowników z 69 różnych krajów.

Obecnie istnieje możliwość wykorzystania nowoczesnych technik ochrony *ex situ* dla ponad 200 gatunków roślin, dla których opracowano zarówno efektywne systemy regeneracji *in vitro*, jak i krioprezerwacji (Reed, 2008). Większość aktywności kriogenicznej poświęcona jest jednak komercyjnie ważnym roślinom uprawnym, podczas gdy badania nad krioprezerwacją zasobów genowych roślin chronionych i zagrożonych są ciągle jeszcze podejmowane sporadycznie. W dostępnej literaturze poświęconej tej grupie roślin, opublikowanej w latach 1986–2010 (40 artykułów), najczęściej wykorzystywano zarodki zygocytne izolowane z nasion typu non-orthodox lub ich osie (Berjak i in., 2011). Analiza tych prac pokazuje, że systemy regeneracyjne *in vitro* często zawodzą i zaledwie dla 52 gatunków udało się opracować kompletną regenerację, zakończoną wykształceniem pędu i korzenia. Spośród tych 52 gatunków, po poddaniu ich krioprezerwacji, zaledwie 31 było zdolnych do przejścia pełnej regeneracji w kulturze postmrożeniowej. O tym, że opracowywanie warunków krioprezerwacji dla zagrożonych gatunków roślin jest dużym wyzwaniem, mogą świadczyć także wyniki wieloletnich badań nad rodzimymi gatunkami flory Australii (Kaczmarczyk i in., 2011). Efektywną krioprezerwację z wykorzystaniem wierzchołków wzrostu, gwarantującą ponad 50% przeżywalność, udało się opracować dla 13 spośród 35 badanych gatunków (tj. reprezentantów 4 rodzin spośród 12 wybranych). W oparciu o te badania, w Kings Park and Botanic Garden in Perth, Western Australia, w ciekłym azocie zabezpieczono 9 wyprowadzonych *in vitro* klonów *Grevillea scapigera* (ekstremalnie zagrożony gatunek australijski) oraz 6 zagrożonych wyginięciem gatunków z rodziny *Haemodoraceae* (Turner i in., 2001). Inne instytucje rozwijające aktywne kriogeniczne programy badawcze dla roślin zagrożonych to m.in.: National Seed Storage Laboratory in Fort Collins, Colora-

do (Touchell, Walters, 2000), Cincinnati Zoological and Botanic Gardens, Cincinnati, Ohio (Pence, 2000), Royal Botanic Gardens, Kew (Barnicoat i in., 2011), National Gene Bank w Tropical Botanic Garden and Research Institute, Palode w Indiach (Krishnan i in., 2011), University of KwaZulu-Natal w Durbanie (Berjak i in., 2011) czy PAN Ogród Botaniczny – CZRB w Powsinie (Mikuła i in., 2011a). Niektóre z badań np. prowadzone nad mikrorozmnażaniem i krioprezerwacją paproci drzewiastych (Mikuła i in., 2011a; Rybczyński, Mikuła, 2011) nie tylko wspierają ochronę ich zasobów genowych *sensu stricto*, ale także mogą pośrednio być wykorzystane w programach odbudowy tropikalnych lasów deszczowych (Riviere i in., 2008).

W rozważaniach nad wykorzystaniem nowoczesnych metod ochrony *ex situ* gatunków zagrożonych warto zwrócić uwagę na działalność banków hiszpańskich, które zabezpieczają bogatą florę Hiszpanii i Makaronezji. Ich działalność rozpoczęła się w latach 80. XX wieku opracowywaniem protokołów mikrorozmnażania rodzimych endemitów i gatunków zagrożonych w celu zredukowania utraty ich populacji w naturze (González-Benito, Martín, 2011). Efektem tych badań jest opisanie efektywnych protokołów rozmnażania *in vitro* dla 60 zagrożonych wyginięciem gatunków (z 19 rodzin) i wskazanie 17 gatunków, dla których opracowane protokoły mogą być włączone w strategię konserwacji *ex situ* (González-Benito, Martín, 2011). Bankiem genów, który zainicjował w Hiszpanii kriogeniczne gromadzenie wegetatywnie namnożonych eksplantatów roślin zagrożonych jest Plant Germplasm Bank Uniwersytetu Politécnica w Madrycie (UPM).

Kriobanki w Polsce

W Polsce ochroną *ex situ* wykorzystującą nowe technologie zajmują się trzy banki. Najstarszy, działający od 1991 r., Narodowy Bank Genów zlokalizowany jest w Polskiej Akademii Nauk Ogródzie Botanicznym – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej w Powsinie. W banku tym gromadzone są zasoby roślin chronionych i zagrożonych flory Polski, ziarniaki żyta oraz pąki zimowe roślin sadowniczych. W warunkach ciekłego azotu zgromadzono dotychczas nasiona 83 gatunków roślin chronionych i zagrożonych z 315 populacji oraz pąki spoczynkowe 105 starych odmian jabłoni, 10 odmian gruszy i 5 odmian czereśni (tab. 1). W banku tym, w ramach V Osi Programu Operacyjnego UE „Infrastruktura i Środowisko”, w latach 2010–2013 realizowano projekt konserwatorski pt. „Ochrona *ex situ* dziko rosnących, zagrożonych i chronionych roślin w Polsce wschodniej – FlorNaturOB”. Jego celem było zabezpieczenie różnorodności genetycznej 61 wymierających i rzadkich przedstawicieli flory polskiej występujących na terenie 12 województw, głównie Polski wschodniej i środkowej. Duplikaty zgromadzonych kolekcji nasion są przechowywane równolegle w Millennium Seed Bank, Royal Botanic Gardens, Kew w Anglii.

Od 1996 roku gromadzenie zasobów genowych drzew i krzewów leśnych oraz monitoring jakości materiału rozmnożeniowego w postaci nasion rozpoczął Leśny Bank Genów (LBG) w Kostrzycy. W banku tym, obok tradycyjnego przechowywania nasion (w temp. -20°C), wykorzystuje się także ultraniską temperaturę ciekłego azotu. W kriogenicznych warunkach zdeponowano dotychczas plumule dębu szypułkowego i bezszypułkowego (14455 obiektów), osie zarodkowe buka zwyczajnego (2200 obiektów) oraz nasiona czereśni ptasiej, lipy drobnolistnej i 23 wybranych gatunków roślin zielnych (Brzuchnalski, Kozioł, 2012). Protokoły krioprezerwacji plumuli, osi zarodkowych oraz nasion typu „non-orthodox” są opracowywane we współpracy z Instytutem Dendrologii PAN w Kórniku (Chmielarz, 2005, 2010; Chmielarz, Walters, 2007; Chmielarz i in., 2011). W latach 2009–2012 LBG realizował projekt „Ochrona *ex situ* zagrożonych i chronionych roślin, dziko rosnących w zachodniej części Polski – FlorNaturLBG”, który objął ochroną 58 gatunków roślin ze 129 stanowisk zachodniej Polski, z obszarów Natura 2000. Duplikaty swoich zbiorów LBG gromadzi w bankach na wyspie Svalbard (ponad 747 tys. osobników), w Fort Collins, USA (ok. 506 tys. osobników), w Millennium Seed Bank (ok. 31 tys. próbek nasion) i w banku Grand Canaria, Hiszpania (ok. 2 tys. osobników).

Trzecim bankiem w Polsce jest powołany 1 kwietnia 2011 r., w Pracowni Zasobów Genowych Roślin Warzywnych Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach, Międzynarodowy Kriobank Genów. Został on utworzony na potrzeby zabezpieczania zasobów genowych czosnków, gromadzonych w kolekcji polowej Instytutu od 1986 r. Kolekcja polowa liczy obecnie 435 obiektów czosnków tworzących i nie tworzących pędów kwiatostanowych (Olas-Sochacka, 2012). W ramach polsko-niemiecko-czeskiego programu EURALLIVEG, realizowanego w latach 2007–2011, do ciekłego azotu wprowadzono 66 obiektów czosnku pospolitego. Duplikaty 31 obiektów czosnków polskich umieszczono w ciekłym azocie w IPK (Gatersleben, Niemcy) i 27 obiektów w CRI (Praga, Czechy). W kriobanku w Skierniewicach zdeponowano zaś duplikaty w sumie 85 obiektów czosnków pochodzących z kolekcji w IPK i CRI.

Ciekły azot wykorzystuje się w Polsce także do gromadzenia diploidalnych i tetraploidalnych genotypów ziemniaka. Prowadzone od 40 lat prace w Oddziale Młochów IHAR-PIB doprowadziły do otrzymania wielu klonów o różnej, ulepszonej wartości użytkowej (m.in. konsumpcyjnej, przydatności do przetwórstwa na chipsy, podwyższonej zawartości skrobi, odporności na *Phytophthora infestans* czy wirusy) (Wasilewicz-Flis i in., 2012). Klony kolekcyjne są obecnie utrzymywane w formie rozmnożeń polowych (287 genotypów) i szklarniowych (22 genotypy), kultur *in vitro* (155 genotypów) oraz merystemów wierzchołkowych (59 genotypów) i pyłku (115 genotypów) zamrożonych w LN (Smyda, 2011; Wasilewicz-Flis i in., 2012; Zimnoch-Guzowska, 2012 informacja ustna).

Zgromadzony materiał jest dystrybuowany do różnych instytucji krajowych i zagranicznych. Ponadto z obszernej kolekcji 1087 izolatów *Phytophthora infestans*, w ciekłym azocie zgromadzono ich 639 (Zimnoch-Guzowska, 2012 informacja ustna).

PODSUMOWANIE

Współczesne zobowiązania większości państw całego świata wobec działania na rzecz ochrony zasobów genowych nie mogą być w pełni realizowane bez sięgania po narzędzia, jakimi są kultury *in vitro* i krioprezerwacja. Liczba roślin ważnych gospodarczo, które do długoterminowego gromadzenia ich zasobów genowych bezwzględnie wymagają nowoczesnych metod, jest znacząca. Wdrażanie nowych metod ochrony *ex situ* jest więc nieuchronne. Jednakże śledząc ich dotychczasowe wykorzystanie na przestrzeni ostatnich lat, można przewidywać większe zaangażowanie w przyszłości banków tkanek ciekłego azotu w porównaniu z gromadzeniem materiału roślinnego w warunkach spowolnionego wzrostu kultury *in vitro*.

Wieloletnie badania nad mikrorozmnażaniem materiału roślinnego oraz jego krioprezerwacją doprowadziły do wypracowania bardzo ogólnych standardów postępowania przy tworzeniu banków tkanek *in vitro* i LN. W praktyce, każdy gatunek/odmiana wymaga indywidualnego podejścia na każdym etapie stosowanych procedur. To sprawia, że ogólne koszty wdrażania krioprezerwacji początkowo wielokrotnie przewyższają koszty metod tradycyjnych. Warto jednak pamiętać, że ostatecznie koszty te maleją wraz z wydłużaniem czasu przechowywania w ciekłym azocie. Znacznie dłuższy jest również czas potrzebny na wprowadzanie poszczególnych roślin do banków tkanek. Mając świadomość, że uzupełnianie banków tkanek o nowe obiekty jest żmudnym i rozłożonym w czasie procesem, warto ustalić gatunki priorytetowe, których zasoby genowe należy zabezpieczyć w pierwszej kolejności.

Praca jest dedykowana pamięci Profesora Akira Sakai (1920–2012), w hołdzie Jego zasług dla kriobiologii i krioprezerwacji.

LITERATURA

- Ahuja S., Mandal B.B., Dixit S., Srivastava P.S., 2002. Molecular, phenotypic and biosynthetic stability in *Dioscorea floribunda* plants derived from cryopreserved shoot tips. *Plant Sci.*, 163: 971-977.
- Altman A., Loberant B., 1997. Micropropagation: clonal plant propagation *in vitro*. ss. 19-42. W: *Agricultural Biotechnology*; ed.: A. Altman. New York, Basel, CRC Press.
- Angel F., Barney V.E., Tohme J., Roca W.M., 1996. Stability of cassava plants at the DNA level after retrieval from 10 years of *in vitro* storage. *Euphytica*, 90: 307-313.
- Ashmore S.E., 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. IPGRI, Rome.

- Barnicoat H., Cripps R., Kendon J., Sarasan V., 2011.** Conservation *in vitro* of rare and threatened ferns – case studies of biodiversity hotspot and island species. In *Vitro Cell. Dev. – Plant*, 47: 37-45.
- Benson E.E., 2004.** Cryoconserving Algal and Plant Diversity: Historical Perspectives and Future Challenges. ss. 299-328. W: *Life in the Frozen State*; eds: B.J. Fuller, N. Lane, E.E. Benson, Boca Raton London New York Washington, D.C.
- Benson E.E., 2008.** Cryopreservation Theory. ss. 15-32. W: *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*; ed.: B.M. Reed, Springer.
- Benson E.E., Harding K., Debouck D., Dumet D., Escobar R., Mafra G., Panis B., Panta A., Tay D., van den Houwe I., Roux N., 2011a.** Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops - Global Public Goods Phase 2: Part I. Project landscape and general status of clonal crop *in vitro* conservation technologies. ss. 1-82. W: *System-wide Genetic Resources Programme*, Rome, Italy.
- Benson E.E., Harding K., Debouck D., Dumet D., Escobar R., Mafra G., Panis B., Panta A., Tay D., van den Houwe I., Roux N., 2011b.** Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops - Global Public Goods Phase 2: Part II. Status of *in vitro* conservation technologies for: Andean root and tuber crops, cassava, *Musa*, potato, sweetpotato and yam. ss. 1-106. W: *System-wide Genetic Resources Programme*, Rome, Italy.
- Berjak P., Bartels P., Benson E.E., Harding K., Mycock D.J., Pammenter N.W., Serphen V.B., Wesley-Smith J., 2011.** Cryoconservation of South African plant genetic diversity. In *Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*, 47: 65-81.
- Brzuchnalski K., Koziol C., 2012.** Gromadzenie kolekcji leśnych gatunków drzewiastych i dziko rosnących roślin zielnych w Leśnym Banku Genów Kostrzyca. ss. 21-22. W: *Program i streszczenia prezentacji V Ogólnopolskiej Konferencji Zasobów Genowych Roślin pt. „Roślinne zasoby genowe biologiczną podstawą rozwoju rolnictwa”*, 11-14.09.2012, Rogów.
- Castillo N.R.F., Bassil N.V., Wada S., Reed B.M., 2010.** Genetic stability of cryopreserved shoot tips of *Rubus* germplasm. In *Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*, 46: 246-256.
- Chmielarz P., 2005.** Zachowanie zasobów genowych zagrożonych i ginących gatunków metodami kriogenicznymi w leśnym banku genów. Projekt badawczy zlecony przez Dyрекcję Generalną Lasów Państwowych, realizowany w latach 2005-2010.
- Chmielarz P., 2010.** Cryopreservation of the non-dormant orthodox seeds of *Ulmus glabra*. *Acta Biol. Hungar.*, 61: 224-233.
- Chmielarz P., Michalak M., Palucka M., Wasileńczyk U., 2011.** Successful cryopreservation of *Quercus robur* plumes. *Plant Cell Rep.*, 30: 1405-1414.
- Chmielarz P., Walters C., 2007.** Desiccation sensitivity of white and black oak embryonic axes. *S. Afr. J. Bot.*, 73(3): 498.
- CIAT, Kolumbia 2012.** <http://isa.ciat.cgiar.org/urg/cassavacollection.do> 8.10.2012.
- CIP, Lima, Peru 2012.** <http://www.cipotato.org/> 8.10.2012.
- Crop Genebank Knowledge Base - CGIAR 2012.** <http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/> 12.10.2012.
- Cyr D.R., 1999.** Cryopreservation of embryogenic cultures of conifers and its application to clonal forestry. ss. 239-261. W: *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Vol. 4; eds: S.M. Jain, P.K. Gupta, R.J. Newton, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Boston, London, The Netherlands.
- DeVerno L.L., Park Y.S., Bonga J.M., Barrett J.D., 1999.** Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clones of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss.]. *Plant Cell Rep.*, 18: 948-953.
- Dixit S., Mandal B.B., Ahuja S., Srivastava P.S., 2003.** Genetic stability assessment of plants regenerated from cryopreserved embryogenic tissues of *Dioscorea bulbifera* L. using RAPD, biochemical and morphological analysis. *CryoLetters*, 24: 77-84.
- Engelmann F., 2011.** Cryopreservation of embryos: an overview. ss. 155-184. W: *Plant embryo culture: methods and protocols*. Methods in molecular biology. vol. 710; eds: T.A. Thorpe, E.C. Yeung, Springer Science+Business Media, LLC.
- Engelmann F., Engels J.M.M., 2002.** Technologies and strategies for *ex situ* conservation managing plant genetic diversity. ss. 89-103. W: *Managing Plant Genetic Diversity*; eds: J.M.M. Engels, V. Ramanatha Rao, A.H.D. Brown, M.T. Jackson. CAB International and IPGRI, Wallingford and Rome.
- Engels J.M.M., Visser L., 2003.** Genebank management procedures. ss. 60-79. W: *A guide to effective management of germplasm collections*. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 6; eds: J.M.M. Engels, L. Visser, IPGRI, Rome, Italy.
- Fabre J., Dereuddre J., 1990.** Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *CryoLetters*, 11: 413-126.
- Faltus M., Vagner M., 2011.** Country report: Czech Republic. Proceedings of the final meeting „Cryopreservation of crop species in Europe”. COST Action 871. ss. 180-183; eds: A. Grapin, E.R.J. Keller, P.T. Lynch, B. Panis, A.R. Bahillo, F. Engelmann. Agrocampus Ouest INHP, Angers, France, 8-11.02.2011.
- FAO, 2010.** The state of *ex situ* conservation. ss. 55-90. W: *The second 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, <http://www.fao.org/docrep/013/i1500e/i1500e.pdf>
- FAOstat, 2010.** Food and Agriculture Organization of the United Nations: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> 1.10.2012.
- Fernandes P., Rodriguez E., Pinto G., Roldán-Ruiz I., De Louse M., Santos C., 2008.** Cryopreservation of *Quercus suber* somatic embryos by encapsulation-dehydration and evaluation of genetic stability. *Tree Physiol.*, 28: 1841-1850.
- Fort Collins, Colorado, 2012.** http://www.ars.usda.gov/main/site_main.htm?modecode=54-02-05-00 8.10.2012.
- Frozen Ark Project, 2012.** <http://www.frozenark.org/> 12.10.2012.
- Fuller B.J., 2004.** Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters*, 25: 375-388.
- Garming H., Roux N., Van den houwe I., 2010.** The impact of the *Musa* International Transit Centre. W: *Impact assessment brief number 4*. Biodiversity International. Rome, Italy. http://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/biodiversity/publications/pdfs/1439_The%20impact%20of%20the%20Musa%20International%20Transit%20Centre.pdf?cache=1349632121 19.10.2012.
- Gonzalez-Arnao M.T., Panta A., Roca W.M., Escobar R.H., Engelmann F., 2008.** Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 92: 1-13.

- González-Benito M.E., Martín C., 2011.** *In vitro* preservation of Spanish biodiversity. In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant, 47: 46-54.
- Harvengt L., Meier-Dinkel A., Dumas E., Collin E., 2004.** Establishment of a cryopreserved gene bank of European elms. Can. J. For. Res., 34: 43-55.
- Hummer K.E., Reed B.M., 2000.** Establishment and operation of a temperate clonal field genebank. ss. 29-31. W: Management of field and *in vitro* germplasm collections. Proceedings of a consultation meeting, 15–20.01.1996, CIAT, Cali, Colombia; ed.: F. Engelmann, IPGRI, Rome.
- IPK, Gatersleben, 2012.** <http://www.ipk-gatersleben.de/en/dept-genebank/> 8.10.2012.
- Kaczmarczyk A., Turner S.R., Bunn E., Mancera R.L., Dixon K.W., 2011.** Cryopreservation of threatened native Australian species – what have we learned and where to from here? In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant, 47: 17-25.
- Kaity A., Ashmore S.E., Drew R.A., 2009.** Field performance evaluation and genetic integrity assessment of cryopreserved papaya clones, Plant Cell Rep., 28: 1421-1430.
- Kaity A., Ashmore S.E., Drew R.A., Dulloo M.E., 2008.** Assessment of genetic and epigenetic changes following cryopreservation in papaya, Plant Cell Rep., 27: 1529-1539.
- Keller E.R.J., Kaczmarczyk A., Senula A., 2008.** Cryopreservation for plant genebanks: a matter between high expectations and cautious reservation. CryoLetters, 29: 53-62.
- Keller E.R.J., Senula A., Dreiling M., 2005.** Genebanking of vegetatively propagated medicinal plants - two cases: *Allium* and *Mentha*. ISHS Acta Horticult., 676: 103-109.
- Keller E.R.J., Senula A., Leunufna S., Grube M., 2006.** Slow growth storage and cryopreservation-tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops and living plant collections. Int. J. Refrig., 29: 411-417.
- Keller E.R.J., Senula A., Zanke C., Grube M., Kaczmarczyk A., Nukari A., Teyssedre D., Morales C.K., Edesi J., Pelc M., Olas-Sochacka M., 2011.** Ways of collaboration – COST short-term scientific missions on three crops and their outcomes – potato, garlic and mint. ss. 110-115. W: Proceedings of the final meeting. Cryopreservation of crop species in Europe. Agrocampus oust INHP, Angers – France, February 08.11.2011.
- Krishnan P.N., Decruse S.W., Radha R.K., 2011.** Conservation of medicinal plants of Western Ghats, India and its sustainable utilization through *in vitro* technology. In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant, 47: 110-122.
- KU Leuven, Belgia 2012.** http://www.biw.kuleuven.be/DTP/TRO/_data/plantphysiology.htm#cryopreservationofmeristemcultures 8.10.2012.
- Li D.Z., Pritchard H.W., 2009.** The science and economics of *ex situ* plant conservation. Trends Plant Sci., 14: 614-621.
- Lovelock J.E., Bishop M.W.H., 1959.** Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide. Nature, 183: 1394-1395.
- Luyet B.J., Gehenio P.M., 1938.** The survival of moss vitrified in liquid air and its relation to water content. Biodynamica, 2: 1-7.
- Luyet B.J., Gehenio P.M., 1940.** Life and death at low temperatures. Biodynamica. Normandy, Missouri, 341 ss.
- Luyet B.J., Hodapp, E.L., 1938.** Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 39: 433-434.
- Martín C., Cervera M.T., González-Benito M.E., 2011.** Genetic stability analysis of chrysanthemum (*Chrysanthemum × morifolium* Ramat) after different stages of an encapsulation–dehydration cryopreservation protocol. J. Plant Physiol., 168: 158-166.
- Martín C., González-Benito M.E., 2005.** Survival and genetic stability of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev shoot apices after cryopreservation by vitrification and encapsulation–dehydration. Cryobiology, 51: 281-289.
- Mikula A., 2008.** Krioprezerwacja jako metoda zachowania zdolności życiowych komórek i tkanek roślinnych. Biotechnologia, 2(81): 41-57.
- Mikula A., 2010.** Krioprezerwacja w zabezpieczaniu (epi)genetycznej stabilności materiału roślinnego. Biotechnologia, 2(89): 23-37.
- Mikula A., Makowski D., Walters C., Rybczyński J.J., 2011a.** Exploration of cryo-methods to preserve tree and herbaceous fern gametophytes. ss. 173-192. W: Working with ferns: issues and applications; eds: H. Fernández, A. Kumar, M.A. Revilla. Springer.
- Mikula A., Rybczyński J.J., 2006.** Krioprezerwacja narzędziem długoterminowego przechowywania komórek, tkanek i organów pochodzących z kultur *in vitro*. Biotechnologia, 4(75): 145-163.
- Mikula A., Tomiczak K., Rybczyński J.J., 2011b.** Cryopreservation enhances embryogenic capacity of *Gentiana cruciata* (L.) suspension culture and maintains (epi)genetic uniformity of regenerants. Plant Cell Rep., 30: 565-574.
- Moukadiri O., Lopes C.T., Cornejo M.J., 1999.** Physiological and genomic variations in rice cells recovered from direct immersion and storage in liquid nitrogen, Physiol Plant., 105: 442-449.
- Nag K.K., Street H.E., 1973.** Carrot embryogenesis from frozen cultured cells. Nature, 245: 270-272.
- Nash T., 1966.** Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. ss. 179-211. W: Cryobiology; ed.: H.T. Meryman, Academic Press, New York.
- Niino T., 1995.** Cryopreservation of germplasm of mulberry (*Morus* species). ss. 102-113. W: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 32; ed.: Y.P.S. BAJAJ, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Olas-Sochacka M., 2012.** Długoterminowe zabezpieczanie zasobów genowych czosnku pospolitego (*Allium sativum* L.) w kriobanku genów. s. 28. W: Program i streszczenia prezentacji V Ogólnopolskiej Konferencji Zasobów Genowych Roślin pt. „Roślinne zasoby genowe biologiczną podstawą rozwoju rolnictwa”. 11-14.09.2012, Rogów.
- Pawlowska B., 2012.** Krioprezerwacja rodzimych gatunków róż dla zachowania biologicznej różnorodności. Rozpr. habil. 375, Zesz. Nauk. UR Kraków, 498: 1-143.
- Pence V.C., 2000.** Cryopreservation of *in vitro* grown fern gametophytes. Am. Fern J., 90: 16-23.
- Pence V.C., 2011.** Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant, 47: 176-187.
- Pence C., Sandoval J.A., Villalobos V.M., Engelmann F., 2002.** *In vitro* collecting techniques for germplasm conservation. ss. 1-100. Technical bulletin No. 7. IPGRI, Rome, IT.
- Pennisi E., 2010.** Tending the global garden. Science, 329: 1274-1277.

- Polge C., Smith A.N., Parkers A.S., 1949.** Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164: 666-669.
- RDA, Suvon, Republika Korei, 2012.** <http://www.genebank.go.kr/eng/plant/introduction.jsp> 8.10.2012.
- Reed B.M., 2008.** Plant Cryopreservation: a practical guide. New York, NY: Springer, 513 ss.
- Reed B.M., Engelmann F., Dulloo M.E., Engels J.M.M., 2004.** Technical guidelines for the management of field and *in vitro* germplasm collections. 106 ss. Handbooks for Genebanks No. 7. IPGRI, Rome, IT.
- Riviere J.N., Hivert J., Schmitt L., Derroire G., Sarrailh J.M., Baret S., 2008.** Role of tree ferns in flowering plant settlement in the tropical montane rainforests of La Reunion (Mascarene Archipelago, Indian Ocean). *Rev. Ecol.-Terre Vie*, 63: 199-207.
- Rybczyński J., Mikula A., 2011.** Gametophyte culture and its application for vegetative propagation of tree ferns. ss. 135-148. W: Working with ferns: issues and applications; eds: H. Fernández, A. Kumar, M.A. Revilla, Springer.
- Sakai A., 2004.** Plant cryopreservation. ss. 329-345. W: Life in the Frozen State; eds: B. Fuller, N. Lane, E.E. Benson, CRC Press, London, New York.
- Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I., 1990.** Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.*, 9: 30-33.
- Sánchez C., Martínez M.T., Vidal N., San-José M.C., Valladares S., Vieitez A.M., 2008.** Preservation of *Quercus robur* germplasm by cryostorage of embryogenic cultures derived from mature trees and RAPD analysis of genetic stability. *CryoLetters*, 29: 493-504.
- Schäfer-Menuhr A., Schumacher H.M., Mix-Wagner G., 1997.** Cryopreservation of potato cultivars – design of method for routine application in genebanks, *Acta Hort.*, 447: 447-482.
- Smyda P., 2011.** Zastosowanie kriokonserwacji do przechowywania zasobów genowych ziemniaka. *Ziemniak Pol.*, 2: 12-15.
- Son H.S., Chun Y.W., Hall R.B., 1991.** Cold storage of *in vitro* cultures of hybrid poplar shoots (*Populus alba* L. x *P. grandidentata* Michx.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 27: 161-168.
- Stout D., 1982.** Investigations into the freezing of plants [First English Translation of 'Untersuchungen über Das Erfrieren der Pflanzen' Monograph by H. Molisch, 1897]. *CryoLetters*, 3: 331-390.
- Touchell D.H.; Walters C., 2000.** Recovery of embryos of *Zizania palustris* following exposure to liquid nitrogen. *CryoLetters*, 21: 261-270.
- Towill L.E., Ellis D.D., 2008.** Cryopreservation of dormant buds. ss. 421-442. W: Plant cryopreservation: a practical guide; ed.: B.M. Reed, Springer.
- Turner S.R., Senaratna T., Bunn E., Tan B., Dixon K.W., Touchell D.H., 2001.** Cryopreservation of shoot tips from six endangered Australian species using a modified vitrification protocol. *Ann. Bot.*, 87: 371-378.
- Urbanová M., Košuth J., Čellárová E., 2006.** Genetic and biochemical analysis of *Hypericum perforatum* L. plants regenerated after cryopreservation, *Plant Cell Rep.*, 25: 140-147.
- van den Houwe I., Roux N., Escalant J.-V., Markham R., 2004.** Safe exchange of *Musa* germplasm, knowledge of the genome and its application in *Musa* improvement. ss. 217-230. W: Advancing banana and plantain R&D in Asia and the Pacific - Vol 13. Proceedings of the 3rd BAPNET Steering Committee meeting held in Guangzhou, China, 23-26.11.2004; eds: A.B. Molina, L.B. Xu, V.N. Roa, I. Van den Bergh, K.H. Borromeo.
- Walters C., Wheeler L., Stanwood P.C., 2004.** Longevity of cryogenically stored seeds. *Cryobiology*, 48: 229-244.
- Wang Q.C., Panis B., Engelmann F., Lambardi M., Valkonen J.P.T., 2009.** Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation. *Ann. Appl. Biol.*, 154: 351-363.
- Wasilewicz-Flis I., Hara-Skrzypiec A., Smyda P., Strzelczyk-Żyta D., Jakuczun H., 2012.** Wykorzystanie zasobów genowych ziemniaka diploidnego. s. 36. W: Program i streszczenia prezentacji V Ogólnopolskiej Konferencji Zasobów Genowych Roślin pt. „Roślinne zasoby genowe biologiczną podstawą rozwoju rolnictwa”. 11-14.09.2012, Rogów.
- Wildt D.E., 1992.** Genetic Resource Banks for conserving wildlife species. justification, examples and becoming organized on a global basis. *Anim. Reprod. Sci.*, 28: 247-257.
- Wilkinson T., Wetten A., Prychid C., Fay M.F., 2003.** Suitability of cryopreservation for the long-term storage of rare and endangered plant species: a case history for *Cosmos atrosanguineus*. *Ann. Bot.*, 91: 65-74.
- Withers L.A., 1979.** Freeze preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Daucus carota*). *Plant Physiol.*, 63: 460-467.
- Withers L.A., King P.J., 1980.** A simple freezing unit and routine cryopreservation method for plant cell cultures. *CryoLetters*, 1: 213-220.

A. Mikula, D. Makowski, K. Tomiczak, J.J. Rybczyński

IN VITRO CULTURE AND CRYOPRESERVATION FOR BIODIVERSITY CONSERVATION – GENE BANK STANDARDS

Summary

This paper presents new *ex situ* conservation methods of plant genetic resources. The first of them consists in maintenance of plant material under slow growth conditions of *in vitro* culture, and the second one consists in preservation of plant tissue (i.e. zygotic and somatic embryos or its axes, buds, shoot apices and meristems) in liquid nitrogen temperature (-196°C). Both methods improve the traditional conservation tools of plant biodiversity that cannot be stored in the form of seeds.

The paper highlights research advances which have been achieved during past century and exploitation of attained knowledge to preservation of plant biodiversity (especially for crop plants). The acceleration of exploitation happened simultaneously with the beginning of the new millennium. A review of available references and of gathered plant resources in world genebanks shows that *in vitro* and liquid nitrogen tissue banks are still a relatively new practice. Its course requires a specialist knowledge, equipment and staff, and comparatively high expenditure and long time for preparation of micropropagation and

cryopreservation procedures. The genebank standards for *in vitro* culture and cryopreservation that have been developed to date facilitate an implementation of the new methods in different countries over the world. It seems that high safety, longevity and low cost of plant material

maintenance in liquid nitrogen for many years in combination with modern requirements of genetic resources protection will lead to escalation of cryopreservation supported by *in vitro* culture.

key words: liquid nitrogen, cryobanks, cryopreservation, *ex situ* preservation