

KATARZYNA JUSZCZYK, PAWEŁ M. PUKACKI

Zagrożenia podczas krioprezewacji osi zarodkowych nasion drzew*

Threats during cryopreservation of seed embryonic axes of woody plants

ABSTRACT

Juszczyk K., Pukacki P. M. 2013. Zagrożenia podczas krioprezewacji osi zarodkowych nasion drzew. Sylwan 157 (11): 842-853.

Cryopreservation in liquid nitrogen (-196°C , LN) is the method of long-term conservation of plant tissues, which has been evolving for many of seed of woody plant species. During cryopreservation protocol to LN in plant cells take place the supercooling tissue water or vitrification, which allows the successful storage. Water content was a significant determining factor with survival of cryostored embryonic axes of woody plants. The protocols of cryopreservation include some steps during preparation of plant material, which could be a source of oxidative stress, phase transition of membranes and destruction in cells.

KEY WORDS

cryopreservation, embryo axes, oxidative stress

ADDRESSES

Katarzyna Juszczyk – e-mail: katarzyna_juszczyk@wp.pl

Paweł M. Pukacki – e-mail: ppukacki@man.poznan.pl

Pracownia Fizjologii Stresów Abiotycznych; Instytut Dendrologii PAN; ul. Parkowa 5; 62-035 Kórnik

Wstęp

Intensyfikacja rozwoju cywilizacji ludzkiej ma duży wpływ na zachowanie bioróżnorodności organizmów na świecie. Szacuje się, że obecnie jedna piąta spośród 380 000 gatunków roślin jest zagrożonych lub na skraju wyginięcia, dlatego też coraz większe znaczenie w nauce zyskuje wieloletnie przechowywanie materiału roślinnego. W ochronie roślin wyróżnia się dwie strategie – *in situ* polegającą na ochronie konkretnego stanowiska zagrożonego gatunku oraz *ex situ*, która pozwala na zabezpieczenie materiału roślinnego w bankach genów takich jak Leśny Bank w Kostrzycy, Millennium Seed Bank w Wielkiej Brytanii, ogrodach botanicznych oraz w kolekcjach polowych [Phartyal i in. 2002]. Obecnie najpowszechniejszą techniką przechowywania zasobów genowych roślin jest magazynowanie nasion w warunkach chłodni.

Skuteczną techniką wieloletniego przechowywania nasion jest krioprezewacja w temperaturze poniżej -130°C , a z uwagi na koszty najczęściej jest to temperatura ciekłego azotu: -196°C (LN). Najdłużej przechowywanym materiałem roślinnym w ciekłym azocie były nasiona *Lactuca sativa*, które w stanie zamrożonym w -135°C były przechowywane przez 30 lat w National Center for Genetic Resources Preservation (NCGRP) w Fort Collins w Colorado [Walters i in. 2011]. Metoda ta umożliwia przechowywanie różnych części roślin: nie tylko całych nasion, ale także osi zarodkowych, zawieszin komórkowych, tkanki kalusowej, zarodków somatycznych, stożków wzrostu czy ziaren pyłku [Charne i in. 1988]. Pionierem badań nad krioprezewacją

* Praca wykonana w ramach projektu badawczego nr 3P06L 22 021 24 finansowanego przez MNiSW.

tkanek roślin drzewiastych był prof. Akira Sakai z Uniwersytetu w Sapporo w Japonii, który przed 55 laty skutecznie zamroził w ciekłym azocie tkankę kory morwy *Morus bombycis* [Sakai 1960].

Krioprezerwacja nasion oraz osi zarodkowych w porównaniu do innych metod przechowywania jest w dużym stopniu bezpieczna, z uwagi na to, że stan zamrożenia w -196°C znacznie zahamowuje metabolizm w komórkach. Zagrożenia dla życia komórek na poszczególnych etapach krioprezerwacji występują podczas: dehydratacji osmotycznej lub powietrznej, podczas traktowania tkanek krioprotektantami, w trakcie wstępnego zamrażania (do -40°C), zatapiania w ciekłym azocie, rozmrażania i poddawania imbibicji.

Wrażliwość osi zarodkowych na desykcję oraz ich zdolność do krioprezerwacji

Skuteczność przechowywania osi zarodkowych nasion zależy od ich naturalnej wrażliwości na desykcję, czyli utratę wody strukturalnej (poniżej 23% zawartości wody) [Alpert 2006] oraz na niską temperaturę. Roberts [1973] pierwszy zdefiniował kategorie nasion w zależności od ich wrażliwości na desykcję i możliwość przechowywania: *orthodox* oraz *recalcitrant*, a następnie wydzielono typ pośredni *intermediate* [Ellis i in. 1990]. Nasiona z kategorii *orthodox* tolerują desykcję do niskich poziomów zawartości wody (1-6%), a następnie mogą być długotrwale przechowywane w warunkach chłodni i w ciekłym azocie. Nasiona *orthodox* w trakcie dojrzewania na drzewie przechodzą naturalną dehydratację i podsuszone opadają z drzew, jak w przypadku *A. platanoides* [Pukacka, Pukacki 1997]. Krioprezerwacji u gatunków *orthodox* oprócz nasion poddaje się również osie zarodkowe, jak u *A. platanoides* [Juszczyk, Pukacki 2011].

Nasiona kategorii *recalcitrant* wykazują się wrażliwością na desykcję poniżej zróżnicowanego krytycznego poziomu zawartości wody oraz brakiem tolerancji na niską temperaturę w zakresie między -15°C a -3°C [Hong, Ellis 2003]. Nasiona z kategorii *recalcitrant* nie przechodzą dehydratacji w trakcie dojrzewania, a opadając z drzew, mają nadal bardzo wysoką zawartość wody, jednak u niektórych gatunków, takich jak klon jawor (*Acer pseudoplatanus*), kasztanowiec zwyczajny (*Aesculus hippocastanum*) czy dąb szypułkowy (*Quercus robur*) zaobserwowano spadek uwodnienia nasion podczas ich dojrzewania [Berjak, Pammenter 2008]. Długość życia przechowywanych nasion *recalcitrant* waha się w zależności od gatunku od kilku tygodni do kilku lat, jak w przypadku dębu czerwonego, szypułkowego oraz kasztanowca [Phartyal i in. 2002]. Redukcja poziomu zawartości wody, a także zastosowanie temperatury bliskiej 0°C pozwalają na wydłużenie okresu przechowywania całych nasion *recalcitrant* [Hong, Ellis 2003]. Nasiona *A. pseudoplatanus* oraz *Q. robur* po podsuszeniu (odpowiednio do 24-32% oraz 40-45% zawartości wody) zachowują żywotność w trakcie przechowywania w temperaturze od 1 do -3°C przez 3 lata [Suszka, Tylkowski 1981; Tylkowski 1989]. Dlatego dla nasion z kategorii *recalcitrant* zalecaną metodą długotrwałego przechowywania jest krioprezerwacja [Normah, Makeen 2008]. Jednak ze względu na to, że część gatunków posiada nasiona o dużych rozmiarach i wysokiej wrażliwości na desykcję, bardziej polecanym materiałem do krioprezerwacji są osie zarodkowe, które wykazują znacznie większą tolerancję na odwodnienie w porównaniu do całych nasion [LePrince 1995]. Krioprezerwacja osi zarodkowych z nasion *recalcitrant* jest możliwa dzięki zastosowaniu szybkiej dehydratacji lub krioprotektantów. Okazała się ona skuteczną metodą przechowywania dla jawora [Juszczyk, Pukacki 2011] oraz klonu srebrzystego (*A. saccharinum*) [Beardmore, Whittle 2005], *Quercus suber* i *Q. ilex* [Gonzalez-Benito i in. 2002].

Nasiona z kategorii *intermediate* stanowią typ pośredni pomiędzy wcześniej wyróżnionymi kategoriami. Są one tolerancyjne na desykcję do poziomu 10%, tak jak nasiona *orthodox*, natomiast

wykazują się dużą wrażliwością na niską temperaturę w zakresie od 0°C do -20°C [Hong, Ellis 2003]. Nasiona *intermediate* opadają z drzew silnie uwodnione, ponieważ nie przechodzą naturalnej dehydratacji [Berjak, Pammenter 2008]. Ich krioprezerwacja jest znacznie bardziej skuteczna, gdy zamrożeniu podawane są osie zarodkowe. W literaturze można znaleźć doniesienia o sukcesie zamrożenia osi zarodkowych w LN takich gatunków jak: *Quercus robur* [Chmielarz i in. 2011], leszczyna pospolita [González-Benito, Pérez 1994] czy buk pospolity (*Fagus sylvatica*) [Pukacki i in. 2009].

Zagrożenia wynikające ze stresu oksydacyjnego podczas krioprezerwacji

Stres dehydratacji oraz niskiej temperatury zakłóca procesy transportu elektronów podczas oddychania, co skutkuje zwiększoną akumulacją wolnych rodników, w tym reaktywnych form tlenu (RFT) [Kranner, Birtic 2005]. Z uzyskanych w Pracowni FSA ID PAN wyników można wyciągnąć wniosek, że poszczególne etapy krioprezerwacji osi zarodkowych indukują akumulację wolnych rodników.

Obecnie znanych jest wiele typów wolnych rodników, jednak główną grupę stanowią rodniki tlenowe. Natomiast pojęcie reaktywne formy tlenu (RFT) obejmuje nie tylko cząsteczki będące wolnymi rodnikami, takie jak: anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$), rodnik hydroksylowy ($\bullet OH$), ale także tlen singletowy (1O_2) przez nadtlenek wodoru (H_2O_2) oraz ozon (O_3) nieposiadające niesparowanego elektronu [Gill, Tuteja 2010].

Anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$) jest mniej reaktywny i ma krótki okres połowicznego rozpadu (2-4 μs), a jego stężenie w cytoplazmie jest niskie ($<10^{-11} M$). Natomiast rodnik wodoronadtlenkowy (HO_2^{\bullet}) wykazuje się wyższą reaktywnością w porównaniu do $O_2^{\bullet-}$, jest zaangażowany w autooksydację lipidów, jednak jego stężenie w cytoplazmie jest niższe [Bhattacharjee 2005].

Nadtlenek wodoru (H_2O_2), który powstaje w wyniku dwuelektronowej redukcji 3O_2 , ma dłuższy czas połowicznego rozpadu (1 ms) w porównaniu do $O_2^{\bullet-}$. H_2O_2 potrafi dyfundować przez błony cytoplazmatyczne, dzięki czemu przenosi informacje pomiędzy komórkami o działającym stresie. Głównym źródłem H_2O_2 jest dysmutacja $O_2^{\bullet-}$ [Kranner, Birtic 2005]. Istnieją przykłady, kiedy wyższy poziom rodnika H_2O_2 podnosił żywotność nasion [Krasuska i in. 2011].

Najbardziej reaktywną cząsteczką jest rodnik hydroksylowy ($\bullet OH$), który powstaje w reakcji Haber-Weissa lub Fentona [Bailly 2004]. $\bullet OH$ jest krótkotrwałą cząsteczką, której czas połowicznego rozpadu wynosi 1 ns. Ze względu na wysoką reaktywność rodnik $\bullet OH$ odpowiada za uszkodzenia kwasów nukleinowych, lipidów oraz białek [Kranner, Birtic 2005].

Źródła reaktywnych form tlenu w nasionach zmieniają się w zależności od fazy rozwojowej nasion. Wynika to z różnic poziomu mobilności cząsteczek w tkance, lepkości cytoplazmy oraz poziomu aktywności metabolicznej. W nasionach podsuszonych wzrost produkcji RFT wiąże się ze wzrostem intensywności nieenzymatycznych reakcji, takich jak peroksydacja lipidów oraz reakcje Amadori i Maillarda. Natomiast w nasionach poddanych imbibicji RFT generowane są w trakcie normalnej aktywności poszczególnych organelli komórkowych: w glioksysomach w trakcie katabolizmu lipidów, w peroksysomach z puryn, w mitochondriach w wyniku oddychania oraz działania enzymów znajdujących się w apoplazmie i ścianie komórkowej [Bailly i in. 2008].

USZKODZENIA DNA I BIAŁEK. Za uszkodzenia DNA odpowiada $\bullet OH$ oraz 1O_2 . Rezultatem ich działania są delecje, tworzenie się dimerów pirymidyny i wiązań poprzecznych, rozerwanie łańcucha DNA, a także takie modyfikacje jak alkilacja oraz oksydacja. Konsekwencją uszkodzenia DNA jest mutageneza oraz utrata stabilności genetycznej komórek [Gill, Tuteja 2010].

Uszkodzenia białek mogą powstać w wyniku działania RFT oraz końcowych produktów stresu oksydacyjnego, powstających między innymi w trakcie peroksydacji lipidów. Jednym z głównych efektów stresu oksydacyjnego jest karbonylacja białek przez $\bullet\text{OH}$ oraz $^1\text{O}_2$, co skutkuje inaktywacją enzymów lub obniżeniem ich aktywności, a także zwiększa ich podatność na działanie czynników proteolitycznych [Gill, Tuteja 2010]. Natomiast H_2O_2 odpowiada za uszkodzenia białek, poprzez tworzenie mostków siarczkowych oraz niekontrolowaną oksydację grup tiolowych do kwasu sulfonowego. Do niekorzystnych skutków stresu oksydacyjnego należą również: uszkodzenie transportu białek, receptorów, kanałów błonowych [Bhattacharjee 2005].

PEROKSYDACJA LIPIDÓW. W zainicjowanie peroksydacji lipidów zaangażowane są jony metali przejściowych (Fe i Cu), które są odpowiedzialne za wytworzenie w reakcji Fentona cząsteczki $\bullet\text{OH}$ [Kranner, Birtic 2005]. W wyniku peroksydacji z tworzących się hydroksynadtlenków lipidów (ROOH) powstają dimery kwasów tłuszczowych, dimery nadtlenu [Bhattacharjee 2005] oraz elektrofilowe oksylipidy takie jak dialdehyd malonowy (MDA) i 4-hydroksy-2-nonenal (4-HNE) [Moller i in. 2007]. Szczególnie podatnymi na peroksydację kwasami tłuszczowymi są kwasy linolowy (18:2) oraz linolenowy (18:3). Do skutków peroksydacji należy zmniejszenie płynności błony, wzrost niekontrolowanej przepuszczalności przez błony wielu substancji, uszkodzenia białek kanałów błonowych, inaktywacja enzymów oraz receptorów błonowych [Gill, Tuteja 2010].

SYSTEM OCHRONNY PRZED STRESEM OKSYDACYJNYM. W toku ewolucji organizmy żywe w celu obrony przed niekorzystnym działaniem reaktywnych form tlenu wykształciły system antyoksydacyjny, który obejmuje zarówno antyoksydanty enzymatyczne, jak i nieenzymatyczne. Antyoksydanty regulują poziom H_2O_2 i $\text{O}_2^{\bullet-}$, dzięki czemu ograniczają wytwarzanie $\bullet\text{OH}$ [Gill, Tuteja 2010].

Oprócz głównych antyoksydantów nieenzymatycznych – askorbinian oraz forma zredukowana glutationu (GSH) – rolę ochronną przed RFT odgrywają: tokoferole, flawonoidy, alkaloidy, karotenoidy, cukry, poliole, prolina i poliaminy [Kamińska-Rożek, Pukacki 2005]. Askorbinian i glutation są niskocząsteczkowymi antyoksydantami rozpuszczalnymi w wodzie i rozmieszczone są w całej komórce, podczas gdy tokoferole rozpuszczają się w tłuszczach i dlatego występują w błonach cytoplazmatycznych [Kranner, Birtic 2005]. Głównymi enzymami antyoksydacyjnymi zaangażowanymi w usuwanie RFT są dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalazy (CAT), peroksydaza glutationowa (GPX), S-transferaza glutationu (GST) oraz enzymy cyklu askorbinowo-glutationowego: peroksydaza askorbinianu (APX, APOD), reduktaza glutationowa (GR), reduktaza monodehydroaskorbinianu (MDHAR), reduktaza dehydroaskorbinianu (DHAR) [Krasuska i in. 2011].

1. Askorbinian (AsA). Wykazuje się największym działaniem obronnym przed RFT, ponieważ jest donorem elektronów w większości reakcji enzymatycznych i nieenzymatycznych. Najważniejszą rolę askorbinian odgrywa w cyklu askorbinowo-glutationowym (cykl Halliwell-Asada), zaangażowanym w usuwanie H_2O_2 . Ochronne działanie askorbinianu polega na bezpośredniej obronie błon cytoplazmatycznych przed $\text{O}_2^{\bullet-}$ i $\bullet\text{OH}$, regeneracji α -tokoferolu z rodnika tokoferylowego [Gill, Tuteja 2010].
2. Glutation (α -Glu-Cys-Gly). Glutation, drugi element cyklu askorbinowo-glutationowego, jest tripeptydem powszechnie występującym w organizmach żywych. Występuje on głównie w formie zredukowanej (GSH), a także w formie utlenionej (GSSG). Jego główną funkcją jest ochrona grup tiolowych białek oraz regeneracja askorbinianu [Gill, Tuteja 2010]. W cyklu askorbinowo-glutationowym zredukowany glutation (GSH)

jest niezbędny do regeneracji askorbinianu poprzez redukcję dehydroaskorbinianu (DHA). DHA powstaje w wyniku reakcji askorbinianu z RFT, którą katalizuje peroksydaza askorbinianu. Etapem przejściowym od askorbinianu do DHA jest monodehydroaskorbinian (MDHA), który w reakcji katalizowanej przez reduktazę monodehydroaskorbinianu (MDHAR) przechodzi w DHA. Redukcję DHA w AsA katalizuje reduktaza dehydroaskorbinianu (DHAR), w wyniku czego powstaje utleniony glutation (GSSG), który jest następnie regenerowany przez reduktazę glutationu do formy zredukowanej (GSH) [Kraner, Birtic 2005].

3. Tokoferole (witamina E). Dzieli się je na typy: α , β , γ , σ i ich działanie polega na bezpośrednim oddziaływaniu z RFT oraz na neutralizacji nadtlenników lipidów. Z uwagi na ich obecność w błonach oraz możliwości bezpośredniej ochrony wielonienasyconych kwasów tłuszczowych przed działaniem RFT mogą one stanowić bardzo ważną grupę ochronną przed stresem oksydacyjnym [Krasuska i in. 2011].
4. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD). Jest metaloenzymem katalizującym dysmutację $O_2^{\bullet-}$ do H_2O_2 . Wyróżnia się kilka izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej ze względu na metal będący jej kofaktorem: dysmutaza magnezowa (MnSOD), żelazowa (FeSOD), miedziowo-cynkowa (Cu/ZnSOD), a u *Streptomyces* wykryto również niklową (NiSOD) [Halliwell 2006].
5. Katalazy. Wytworzony w wyniku dysmutacji H_2O_2 ulega dalszemu rozkładowi do H_2O i O_2 w reakcji katalizowanej przez katalazy. Katalazy są zaangażowane w usuwanie H_2O_2 powstającego w peroksysomach i glioksysomach, natomiast brak ich w mitochondriach lub występują tam w niskich ilościach [Halliwell 2006].
6. Peroksydazy (POX). Peroksydazy w tkankach roślinnych są zlokalizowane w wakuolach, ścianie komórkowej oraz w cytozolu. W usuwanie H_2O_2 u roślin jest zaangażowanych kilka rodzajów peroksydaz [Halliwell 2006]. Peroksydazy glutationowe redukują H_2O_2 przy udziale zredukowanego glutationu. Peroksydazy glutationowe u roślin w swoim centrum aktywnym mają cysteinę, co znacznie obniża aktywność enzymatyczną roślinnych peroksydaz [Carvalho 2008]. Peroksydaza askorbinianu (APX, APOD) katalizuje detoksyfikację H_2O_2 poprzez utlenienie cząsteczki AsA do MDHA. APX w przeciwieństwie do CAT posiada wyższe powinowactwo do H_2O_2 oraz występuje we wszystkich kompartmentach komórkowych [Carvalho 2008].

Powstawanie RFT i reakcje antyoksydacyjne podczas krioprezerwacji osi zarodkowych

Przygotowanie tkanek do zamrożenia w temperaturze -196°C oraz ich zamrożenie i rozmrożenie do temperatury 0°C jest czynnikiem stresowym wpływającym na metabolizm komórek poddawanych tym procedurom, a w dalszej konsekwencji może powodować zmiany w produkcji RFT oraz w działaniu antyoksydantów.

Izolacja osi zarodkowych z nasion jest pierwszym czynnikiem stresowym w trakcie krioprezerwacji. W osiach zarodkowych nasion z kategorii *recalcitrant Castanea sativa* zaobserwowano wzrost produkcji $O_2^{\bullet-}$ w ciągu pierwszych 5 minut od ich izolacji [Roach i in. 2008]. Uszkodzenie ścian komórkowych w trakcie izolacji osi powoduje uwolnienie enzymów odpowiedzialnych za wytwarzanie RFT w apoplacie NADPH-zależnej oksydazy, pH-zależnej peroksydazy, oksydazy szczawianowej oraz oksydazy aminowej. Podobną reakcję obserwuje się podczas ataku patogena grzybowego lub bakteryjnego [Roach i in. 2008].

Podczas dehydratacji nasion lub osi zarodkowych można obserwować dalszy wzrost akumulacji RFT, które poza swoim negatywnym działaniem są zaangażowane w szereg innych procesów.

Powstające w trakcie dehydratacji rodniki $O_2^{\bullet-}$ oraz $\bullet OH$ są zaangażowane w inicjację kiełkowania nasion, z tego powodu ich produkcja w początkowych etapach dehydratacji jest najwyższa, co wiąże się z wysokim wigorem nasion. Natomiast spadek produkcji RFT w wyniku dalszej dehydratacji może być spowodowany obniżeniem się intensywności oddychania oraz spadkiem przeżywalności nasion [Varghese i in. 2011]. Reakcją tkanek na dehydratację może być wzrost produkcji $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 , co stwierdzono w osiach zarodkowych drzewa upas (*Antiaris toxicaria*) [Cheng, Song 2008] oraz w osiach zarodkowych *Q. robur* poddanych powolnej dehydratacji [Pukacka i in. 2011].

Skutkiem dehydratacji jest bardzo często spadek poziomu antyoksydantów drobnocząsteczkowych oraz obniżenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych, co powoduje nadmierną akumulację cząsteczek RFT. W osiach zarodkowych *Q. robur*, dla których główną linią obrony przed RFT są antyoksydanty drobnocząsteczkowe takie jak tokoferole i askorbinian, odwodnienie spowodowało znaczące zmiany ich zawartości [Hendry i in. 1992]. Spadek zawartości glutationu oraz AsA w osiach zarodkowych i liściach nasion stwierdzono podczas dehydratacji nasion. U *T. dregeana* wykazano, że dehydratacja powoduje spadek poziomu zredukowanego glutationu, co powoduje zaburzenia w cyklu askorbinowo-glutationowym [Varghese i in. 2011]. Osie zarodkowe *T. dregeana* reagują na stres dehydratacji również poprzez obniżenie aktywności wielu enzymów antyoksydacyjnych: SOD, CAT, GPX, GPOX, APX, GR, DHAR [Song i in. 2004; Varghese i in. 2011]. Obniżenie aktywności enzymów cyklu askorbinowo-glutationowego: DHAR, APX, i GR oraz SOD, CAT i POX stwierdzono w osiach zarodkowych wielu gatunków podczas dehydratacji, takich jak *Theobroma cacao* [Li, Sun 1999], *Antiaris toxicaria* [Cheng, Song 2008] oraz u *Q. robur* [Pukacka i in. 2011]. Spadek aktywności antyoksydantów w osiach zarodkowych poddanych dehydratacji może świadczyć o ich wrażliwości na desykcję, ze względu na to, że konsekwencją jest obniżenie się przeżywalności [Li, Sun 1999]. W tkankach optymalnie uwodnionych enzymy antyoksydacyjne pełnią główną rolę ochronną przed cząsteczkami RFT, natomiast po stresie dehydratacji główną rolę obronną przed RFT pełnią antyoksydanty drobnocząsteczkowe [Francini i in. 2006].

Przechowywanie w ciekłym azocie ($-196^{\circ}C$) i rozmrażanie jest przedostatnim etapem krioprezerwacji. Jeżeli po wyjęciu z ciekłego azotu zostanie odpowiednio szybko wykonane rozmrażanie i uniknie się rekrytalizacji, a imbibicja tkanek będzie miała powolny przebieg, to zagrożenia spowodowane przez RFT, jakie w tym procesie występują, są znacznie mniejsze niż podczas poprzednich etapów. W osiach zarodkowych *Azadirachta indica* już po 10 godzinach przechowywania w $-196^{\circ}C$ zaobserwowano nieznaczny wzrost poziomu $O_2^{\bullet-}$ oraz H_2O_2 i im dłużej trwał przechowywanie, tym produkcja RFT u tego gatunku była większa, czemu towarzyszyło obniżenie się przeżywalności osi zarodkowych po rozmrożeniu. Akumulacji RFT po dłuższym okresie przechowywania w LN (3 miesiące) towarzyszy spadek aktywności CAT, SOD, APX oraz obniżenie przeżywalności zamrożonych tkanek [Varghese, Naithani 2008].

Rola błon cytoplazmatycznych

Stres dehydratacji, wstępne zamrożenie do $-40^{\circ}C$, umieszczenie tkanki w LN, rozmrażanie, a następnie imbibicja osmotyczna w roztworach lub na pożywece mają w pierwszej kolejności wpływ na błony cytoplazmatyczne komórek. Działające czynniki stresowe mogą powodować wzrost temperatury przejścia fazowego (T_m) błon [Pukacki i in. 1991]. W błonach dochodzi głównie do przejścia z fazy półpłynnej w żelową oraz przekształcenia się struktury dwuwarstwowej w odwróconą strukturę heksagonalną (H_{II}), [Wolfe, Bryant 2001]. W odwróconej strukturze heksagonalnej tworzą się cylindryczne struktury, których wnętrza stanowią części polarne fosfolipidów,

natomiast na zewnątrz wystają łańcuchy kwasów tłuszczowych [Gordon-Kamm, Steponkus 1984]. Produktami degradacji fosfolipidów w błonach cytoplazmatycznych są wolne kwasy tłuszczowe (FFA). Za tworzenie się tej struktury w błonie odpowiadają również cząsteczki RFT oraz enzym fosfolipaza D, powodująca wzrost zawartości kwasu fosfatydowego, który w obecności jonów Ca^+ łatwo przyjmuje konformację heksagonalnych cylindrów [Kamińska-Rożek, Pukacki 2005]. W wyniku wykształcenia się struktury heksagonalnej błona traci swoje właściwości selektywnego transportu jonów.

W ochronę błon jest zaangażowanych szereg substancji: prolina, mannitol, sorbitol, glutaminian, betaina, karnityna, polirole, trehaloza, sacharoza, oligosacharydy, sterole i tokoferole oraz wielonienasycone kwasy tłuszczowe, jednak przy spadku zawartości wody poniżej 23% rolę ochronną pełnią głównie cukry. Cukry wchodzą pomiędzy cząsteczki kwasów tłuszczowych i zapobiegają ich zbliżaniu się do siebie [Hoekstra i in. 2001]. Do zwiększenia ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych, które stabilizują strukturę błon, dochodzi w trakcie nabywania tolerancji na desykcję podczas dojrzewania nasion z kategorii *orthodox*, co zaobserwowano u *A. platanooides*. W nasionach gatunku wrażliwego na desykcję – *A. pseudoplatanus* – nie dochodziło do ich akumulacji [Pukacka 1999].

Techniki krioprezerwacji tkanek roślinnych

W tkankach roślinnych występują naturalne substancje kriochronne, takie jak cukry nieredukujące, wysoce hydrofilowe białka LEA (low-embryogenesis abundant) oraz białka AFP (antifreeze proteins) typu chitynaz, glukanz i taumatyn [Griffith i in. 2005; Jarząbek i in. 2009; Pukacki 2011]. Akumulacja cukrów w trakcie dojrzewania nasion pozwala im na nabycie tolerancji na desykcję oraz umożliwia zajście wityfikacji (zeszkleńnięcia cytoplazmy), co ma miejsce zarówno *in vivo* w temperaturze powyżej 0°C [Pukacka i in. 2003], jak i w trakcie krioprezerwacji. W nasionach *A. platanooides* podczas nabywania tolerancji na desykcję dochodzi do magazynowania rafinozy, sacharozy i stachiozy, natomiast u *A. pseudoplatanus* o wrażliwości na utratę wody może świadczyć niższy poziom tych cukrów [Pukacka, Pukacki 1997]. Ostatnio wykryto w tkankach roślin drzewiastych obecność białek o cechach AFP obniżających temperaturę zamarzania (T_f) roztworów wodnych w mechanizmie niekoligatywnym i wykazujących również działanie kriochronne [Jarząbek i in. 2009; Pukacki 2011]. W badaniach biotechnologicznych uzyskano transgeniczne rośliny zawierające geny odpowiedzialne za syntezę AFP, co powodowało produkcję białka o cechach histerezy temperaturowej [Jarząbek i in. 2009]. W osiach zarodkowych nasion klonów *A. platanooides*, *A. pseudoplatanus* oraz buka *F. sylvatica* stwierdzono aktywne frakcje białek o cechach kriochronnych, AFP i dehydryn [Pukacki i in. 2009].

Kolejnym istotnym warunkiem powodzenia krioprezerwacji jest uzyskanie zeszklenia cytoplazmy (wityfikacji). Gdy cytoplazma znajdującej się w stanie wityfikacji tkanki zostanie zamrożona, a po przechowaniu w LN zostaną w odpowiednim tempie rozmrożone, mogą w 90% przeżyć zamrożenie. W zabiegach krioprezerwacji o powodzeniu decydują: sposób prowadzenia prekultury, aklimatyzacji (zahartowania), tempo i czas dehydratacji, rodzaj zastosowanych desykantów osmotycznych, związków kriochronnych, ponadto warunki „zatapiania” w ciekłym azocie i rozmrażania po zakończeniu krioprezerwacji. Tkanki są poddawane wolnemu zamrażaniu (0,25°C/min) do temperatury –30° lub –40°C, a następnie są gwałtownie zatapiane w LN z szybkością około 600°C/min [Pukacki, Juszczuk 2014].

Z uwagi na duże zróżnicowanie w tolerancji na odwodnienie pomiędzy gatunkami, organami oraz tkankami, jakie są poddawane zamrożeniu w LN, istnieje wiele metod przygotowania próbek. Obecnie w krioprezerwacji wyróżnia się dwie główne drogi przygotowania tkanek do zamrożenia w ciekłym azocie:

- [1] oparta na powietrznym odwodnieniu eksplantatów: dehydratacja powietrzna, dehydratacja po zastosowaniu prekultury, dehydratacja w kapsułkach alginianu;
- [2] oparta na zastosowaniu roztworów witrifikacyjnych: (i) witrifikacja w roztworze z udziałem krioprotektantów, (ii) witrifikacja w kapsułkach alginianu, (iii) witrifikacja przez zamrażanie w kropli krioprotektanta.

Techniki przygotowania tkanek do zamrożenia w LN oparte na powietrznym odwodnieniu tkanek

Dehydratacja powietrzna tkanek jest stosunkowo prostą metodą przygotowania tkanki do krioprezerwacji całych nasion, osi zarodkowych oraz ziaren pyłku. Powolną dehydratację powietrzną, symulującą naturalną utratę wody w trakcie rozwoju nasion, uzyskuje się w wyniku suszenia całych nasion w temperaturze zbliżonej do pokojowej lub niższej [Varghese i in. 2011]. Metodą, która pozwala na efektywniejsze suszenie, a także na kontrolowanie warunków temperaturowych, jest dehydratacja z wymuszonym przepływem powietrza nad żelem krzemionkowym [Engelmann 2011a]. Nasiona względnie osie zarodkowe przy zastosowaniu szybkiego suszenia zachowują wyższą żywotność w porównaniu do powolnej dehydratacji.

Dehydratacja po prekulturze polega na zastosowaniu dehydratacji powietrznej lub osmotycznej za pomocą sacharozy i glicerolu po wcześniejszej prekulturze eksplantatów na pożywkę zawierającej cukry o właściwościach kriochronnych. Wykorzystuje się ją w krioprezerwacji fragmentów łądyg, zarodków somatycznych i zygotycznych, kultur poliembryogenicznych, natomiast brak doniesień o jej zastosowaniu dla osi zarodkowych.

Podczas dehydratacji w kapsułkach alginianu eksplantaty roślinne są umieszczane w zestalonych kapsułkach z alginianu sodu lub wapnia, a następnie przenoszone na pożywkę wzbogaconą w sacharozę (0,5-1,7 M) na okres 1-7 dni. W kolejnym etapie kapsułki są poddawane odwodnieniu do 20% zawartości wody, a następnie szybkiemu zamrażaniu w ciekłym azocie [Kaviani 2011]. Technika dehydratacji w kapsułkach jest stosowana w krioprezerwacji stożków wzrostu pędów, zawiesin komórkowych, spor [Mikuła i in. 2008, 2009], zarodków somatycznych oraz osi zarodkowych [Kaviani 2011].

Techniki przygotowania tkanek do zamrożenia w temperaturze LN oparte o zastosowanie roztworów kriochronnych

ROZTWORY KRIOCHRONNE I WITRYFIKACYJNE. Witrifikację jako technikę przygotowania tkanek biologicznych do zamrożenia w LN, dla uniknięcia wewnątrzkomórkowego zamarzania, zaproponował przed 76 laty Luyet [1937]. W latach 60. ubiegłego wieku w doświadczeniach nad kriokonserwacją zaczęto wykorzystywać roztwory kriochronne zawierające związki penetrujące ściany komórkowe i błony cytoplazmatyczne, głównie glicerol oraz dwumetylosulfonotlenek (DMSO) [Sakai 1960]. Ograniczają one tworzenie się lodu wewnątrz komórek, poprzez umożliwienie odwodnienia cytoplazmy, a jednocześnie minimalizują uszkodzenia spowodowane przez wysokie stężenie jonów soli w komórkach. Witrifikacja w tej metodzie to dwustopniowy proces obejmujący traktowanie eksplantatów roztworami krioprotektantów, takimi jak na przykład sacharoza i glicerol, a następnie odwodnienie za pomocą wysoce stężonych roztworów witrifikacyjnych – Plant Vitrification Solution (PVS1, PVS2, PVS3, PVS4) – oraz poddanie szybkiemu zamrażaniu w LN [Kaviani 2011]. Roztwory witrifikacyjne stosuje się w krioprezerwacji zarodków zygotycznych i somatycznych, osi zarodkowych, wierzchołków pędów [Engelmann 2011].

METODA PREKULTURY. Eksplantaty umieszcza się na pożywkach o wzrastających stężeniach (od 0,1 do 1 M) cukrów o właściwościach osmotycznych/kriochronnych (sacharoza lub glukoza),

co powoduje odwodnienie tkanek. Następnie przenosi się je do probówek krio, które są szybko zamrażane w temperaturze -196°C . Technika ta jest wykorzystywana w krioprezerwacji stożków pędów, osi zarodkowych, zarodków zygotycznych oraz somatycznych [Kaviani 2011].

WITRYFIKACJA W KAPSUŁKACH. Eksplantaty, umieszczone wcześniej w alginianowych kapsułkach, poddawane są odwodnieniu przy pomocy roztworów witrifikacyjnych i zamrażane w -196°C [Engelmann 2011]. Witrifikacja w kapsułkach jest stosowana w krioprezerwacji zawiązków pędów oraz zarodków somatycznych [Sakai, Engelmann 2007].

METODA ZAMRAŻANIA W KROPLI. Eksplantaty poddane wcześniejszej prekulturze na pożywce z krioprotektantami, a następnie odwodnione, zostają umieszczone w kropli roztworu witrifikacyjnego na 5-mm paskach folii aluminiowej i zamrażane w ciekłym azocie (-196°C) [Kaviani 2011]. Technika zamrażania w kropli stosowana jest głównie w przechowywaniu zawiązków pędów [Mikuła, Rybczyński 2006].

WITRYFIKACJA PRZED ZAMROŻENIEM W KROPLI KRIOPROTEKTANTA. Materiał roślinny po prekulturze poddawany jest inkubacji w roztworze witrifikacyjnym, a następnie umieszczony na folii aluminiowej w kropli tego roztworu w ilości zakrywającej eksplantaty i przenoszony bezpośrednio do ciekłego azotu (krótkie przechowywanie) lub do probówek krio wypełnionych ciekłym azotem, które następnie umieszcza się w naczyniu Dewara w LN. Po przechowywaniu w LN eksplantaty rozmraża się w temperaturze pokojowej w półpłynnej pożywce [Panis i in. 2005]. Technika ta znalazła zastosowanie w krioprezerwacji zawiązków pędów, pąków spoczynkowych oraz zarodków somatycznych [Sakai, Engelmann 2007].

Ocenę przeżywalności tkanek poddanych krioprezerwacji przeprowadza się głównie przy wykorzystaniu kultur *in vitro*, poprzez ocenę stopnia uszkodzenia błon cytoplazmatycznych metodą określenia dyfuzji jonów oraz barwnym testem określającym procent redukcji chlorku 2,3,5-trójfenylo-tetrazoliowego do formazanu [Normah, Makeen 2008]. Obecnie najczęściej stosowanymi pożywkami w kulturach *in vitro* tkanek są pożywki opracowane przez Murashigego i Skooga (MS) oraz Linsmaiera i Skooga (LS), a dla roślin drzewiastych pożywka WPM (Woody Plant Medium) [McCown, Lloyd 1981].

Literatura

- Alpert P. 2006. Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? *Journal of Experimental Biology* 209: 1575-1584.
- Bailly C., El-Maarouf-Bouteau H., Corbineau F. 2008. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies* 331: 806-814.
- Beardmore T., Whittle C. A. 2005. Induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in silver maple *Acer saccharinum*. embryonic axes. *Tree Physiology* 25: 965-972.
- Berjak P., Pammenter N. W. 2008. From Avicennia to Zizania: Seed Recalcitrance in Perspective. *Annals of Botany* 101: 213-228.
- Bhattacharjee S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science* 89: 1113-1121.
- de Carvalho M. H. 2008. Drought stress and reactive oxygen species. Production, scavenging and signaling. *Plant Signaling & Behavior* 3: 156-165.
- Charne D. G., Pukacki P. M., Kot L. S., Beversdorf W. D. 1988. Embryogenesis following cryopreservation in isolated microspores of rapeseed *Brassica napus* L. *Plant Cell Reports* 7: 407-409.
- Cheng H. Y., Song S. Q. 2008. Possible involvement of reactive oxygen species scavenging enzymes in desiccation sensitivity of *Antiaris toxicaria* seeds and axes. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 1549-1556.
- Chmielarz P., Michalak M., Pałucka M., Wasileńczyk U. 2011. Successful cryopreservation of *Quercus robur* plumules. *Plant Cell Reports* 30 (8): 1405-1414.
- Ellis R. H., Hong T., Roberts E. H. 1990. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. *Journal of Experimental Botany* 41: 1167-1174.

- Engelmann F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 47: 5-16.
- Francini A., Gallechi L., Saviozzi F., Pinzino C., Izzo R., Sgherri C., Navari-Izzo F. 2006. Enzymatic and non-enzymatic protective mechanisms in *recalcitrant* seeds of *Araucaria bidwillii* subjected to desiccation. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 556-563.
- Gill S. S., Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Gonzalez-Benito M. E., Perez C. 1994. Cryopreservation of embryonic axes of two cultivars of hazelnut *Corylus avellana* L. *CryoLetters* 15: 41-46.
- Gonzalez-Benito M. E., Prieto R. M., Herradon E., Martin C. 2002. Cryopreservation of *Quercus suber* and *Quercus ilex* embryonic axes: *in vitro* culture, desiccation and cooling factors. *CryoLetters* 23: 283-290.
- Gordon-Kamm W. J., Steponkus P. L. 1984. Lamellar-to-hexagonal, phase transitions in the plasma membrane of isolated protoplasts after freeze-induced dehydration. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 6373-6377.
- Griffith M., Lumb C., Wiseman S. B., Wisniewski M., Johnson R. W., Marangoni A. G. 2005. Antifreeze proteins modify the freezing process in plants. *Plant Physiology* 138: 330-340.
- Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-322.
- Hendry G. A., Finch-Savage W. E., Thorpe P. C., Atherton N. M., Buckland S. M., Nilsson K. A., Seel W. E. 1992. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the *recalcitrant* species *Quercus robur* L. *New Phytologist* 122: 273-279.
- Hoekstra F. A., Golovina E. A., Buitink J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 431-438.
- Hong T. K., Ellis R. H. 2003. Storage. W: Vozzo J. A. [red.]. *Tropical Tree Seed Manual*. United States Department of Agriculture. 125-136.
- Jarząbek M., Pukacki P. M., Nuc K. 2009. Cold-regulated proteins with potent antifreeze and cryoprotective activities in spruces *Picea* sp. *Cryobiology* 58: 268-274.
- Juszczyk K., Pukacki P. M. 2011. Effects of desiccation and cryopreservation on viability *in vitro* of embryonic axes of the suborthodox *Fagus sylvatica*, orthodox *Acer platanoides* and *recalcitrant* *A. pseudoplatanus* seeds. W: Pukacki P. M. [red.]. 17th Cold Hardiness Seminar, Kórnik, 2011. 53-67.
- Kamińska-Rożek E., Pukacki P. M. 2005. Effect of freezing desiccation on cold hardiness, ROS, membrane lipid levels and antioxidant status in spruce seedlings. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 74: 219-228.
- Kaviani B. 2011. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *Australian Journal of Crop Science* 5: 778-800.
- Kranmer I., Birtic S. 2005. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integrative and Comparative Biology* 45: 734-740.
- Krasuska U., Gniazdowska A., Bogatek R. 2011. Rola ROS w fizjologii nasion. *Kosmos* 60: 113-128.
- Leprince O., Vertucci C. W., Hendry G., Atherton N. M. 1995. The expression of desiccation-induced damage in *orthodox* seeds is a function of oxygen and temperature. *Physiologia Plantarum* 94: 233-240.
- Li C., Sun W. Q. 1999. Desiccation sensitivity and activities of free radical scavenging enzymes in *recalcitrant* *Theobroma cacao* seeds. *Seed Science Research* 9: 209-217.
- Luyet B. J. 1937. Vitrification of organic colloids and protoplasm. *Biodynamica* 29: 1-15.
- McCown B. H., Lloyd G. 1981. Woody Plant Medium WPM. -a mineral nutrient formulation for microculture for woody plant species. *Hort Science* 16: 453.
- Mikuła A., Jata K., Rybczyński J. J. 2009. Cryopreservation strategies for *Cyanthea australis* R. BR. *Domin. CryoLetters* 30: 429-439.
- Mikuła A., Olas M., Śliwińska M., Rybczyński J. J. 2008. Cryopreservation by encapsulation of *Gentiana* sp. Cell suspensions maintains re-growth, embryogenic competence and DNA content. *CryoLetters* 29: 409-418.
- Mikuła A., Rybczyński J. J. 2006. Krioprezewacja narzędziem długoterminowego przechowywania komórek, tkanek i organów pochodzących z kultur *in vitro*. *Biotechnologia* 75: 145-163.
- Moller I. M., Jensen P. E., Hansson A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58: 459-481.
- Normah M. N., Makeen A. M. 2008. Cryopreservation of excised embryos and embryonic axes. W: Reed B. M. [red.]. *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. 211-241.
- Panis B., Piette B., Swennen R. 2005. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. *Plant Science* 168: 45-55.
- Phartaly S. S., Thapliyal R. C., Koedam N., Godefroid S. 2002. *Ex-situ* conservation of rare & valuable forest tree species through seed-gene bank. *Current Science* 83: 101-107.
- Pukacka S. 1999. Membrane phospholipid composition during maturation of seeds of *Acer platanoides* and *Acer pseudoplatanus* in relation to desiccation tolerance. *Acta Physiologia Plantarum* 21: 109-115.

- Pukacka S., Hoffman S. K., Goslar J., Pukacki P. M., Wójkiewicz E. 2003. Water relations in beech *F. sylvatica* L. seeds and its effect on storage behaviour. *Biochimica et Biophysica Acta* 1621: 48-56.
- Pukacka S., Malec M., Ratajezak E. 2011. ROS production and antioxidative system activity in embryonic axes of *Quercus robur* seeds under different desiccation rate conditions. *Acta Physiologia Plantarum* 33: 2219-2227.
- Pukacka S., Pukacki P. M. 1997. Changes in soluble sugars in relation to desiccation tolerance and effects of dehydration on freezing characteristics of *Acer platanoides* and *Acer pseudoplatanus* seeds. *Acta Physiologia Plantarum* 19: 147-154.
- Pukacki P. M. 2009. Funkcja przeciwzamrożeniowa oraz kriochronna białek AFP – występowanie i znaczenie. W: Pukacki P. M. [red.]. Reakcje roślin na stres niskich temperatur. Bogucki Wydawnictwo Naukowe. 75-86.
- Pukacki P. M. 2011. Fizjologiczne i molekularne aspekty tolerancji roślin drzewiastych na stres niskich temperatur. W: Jankiewicz L. [red.]. Fizjologia roślin sadowniczych strefy umiarkowanej, t. 2. PWN, Warszawa. 241-273.
- Pukacki P. M., Jarzabek M., Pukacka S. 2009. Characterization of cryoprotective activity of proteins in *Acer*, *Fagus* and *Quercus* embryonic axes. First International Symposium 'Cryopreservation in Horticultural Species', Leuven, Belgium, 5-8 April 2009. 117-117.
- Pukacki P. M., Juszczak K. 2014. Desiccation sensitivity and cryopreservation of embryonic axes of two *Acer* species seeds. *CryoLetters*.
- Pukacki P. M., Kendall E. J., McKersie B. D. 1991. Membrane injury during freezing stress to winter wheat *Triticum aestivum* L. crowns *Journal of Plant Physiology* 138: 516-21.
- Roach T., Ivanova M., Beckett R., Minibayeva F., Green I., Pritchard H., Kranmer I. 2008. An oxidative burst of superoxide in embryos of *recalcitrant* sweet chestnut seeds as induced by excision and desiccation. *Physiologia Plantarum* 133: 131-139.
- Roberts E. H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* 1: 499-514.
- Sakai A. 1960. Survival of the twigs of woody plants at -196°C . *Nature* 185: 393-394.
- Sakai A., Engelmann F. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters* 28: 151-172.
- Song S. Q., Berjak P., Pammenter N. 2004. Desiccation sensitivity of *Trichilia dregeana* axes and antioxidant role of ascorbic acid. *Acta Botanica Sinica* 46: 803-810.
- Suszka B., Tylkowski T. 1981. Storage of acorns of the English oak *Quercus robur* L. over 1-5 winters. *Arboretum Kórnickie* 25: 199-229.
- Tylkowski T. 1989. Short-term storage of after ripened seeds of *Acer platanoides* L. and *A. pseudoplatanus* L. *Arboretum Kórnickie*. 34: 135-141.
- Varghese B., Naithani S. B. 2008. Oxidative metabolism-related changes in cryogenically stored neem *Asadirachta indica* A. Juss. seeds. *Journal of Plant Physiology* 165: 755-765.
- Varghese B., Sershen, Berjak P., Varghese D., Pammenter N. W. 2011. Differential drying rates of *recalcitrant* *Trichilia dregeana* embryonic axes: a study of survival and oxidative stress metabolism. *Physiologia Plantarum* 142: 326-338.
- Walters C., Volk P., Stanwood P. C., Towill L. E., Forsline P. L., Koster K. L. 2011. Long-term survival of cryopreserved gmplasm: Contributing factor and assessments from thirty year old experiments. W: Panis B., Lynch P. [red.]. Proc. First IS on Cryopreservation in Hort. Species, *Acta Hort.* 980, ISHS. 113-120.
- Wolfe J., Bryant G. 2001. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *International Journal of Refrigeration* 24: 438-450.

SUMMARY

Threats during cryopreservation of seed embryonic axes of woody plants

Cryopreservation is an intensively studied method for long-term storage of plant material. It involves freezing of tissues at an ultra-low temperature, usually in liquid nitrogen (LN) at -196°C . An early pioneer and eminent specialist in this field of research on tissues of woody plants was Prof. Akira Sakai, who died last year.

For successful cryopreservation of plant tissues it is crucial to avoid intracellular ice nucleation. This is possible by supercooling of cellular water and vitrification (glass formation) of tissues during cryopreservation protocol. Supercooling of cellular water is a natural phenomenon, observed in winter in tissues of woody perennials and during very slow cooling of tissues to cryogenic conditions. Depending on seeds type i.e. desiccation and low temperature tolerance

(*orthodox* or *recalcitrant* species), it is important to prepare tissues properly before cryostorage by aerial dehydration or the use of cryoprotectants.

During cryopreservation, tissues are subject to abiotic stress factors, such as dehydration or low temperature so tissues may be damaged then in various ways. Firstly, cryopreservation can damage plasma membranes, leading to their degradation (loss of their selective permeability to electrolytes). At its various stages, cryopreservation can cause oxidative stress, i.e. an excess of the reactive oxygen species (ROS), such as superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radical ($\bullet OH$), which is the major reason of cell damage. Oxidative stress is also associated with changes in activity of the antioxidant system, which includes low-molecular-weight antioxidants and antioxidant enzymes.