

BEATA P. PLITTA, MARCIN MICHALAK, SZYNOM KOTLARSKI, PAWEŁ CHMIELARZ

Kriogeniczne przechowywanie nasion*

Cryogenic storage of seeds

ABSTRACT

Plitta B. P., Michalak M., Kotlarski Sz., Chmielarz P. 2013. Kriogeniczne przechowywanie nasion. Sylwan 157 (10): 723-729.

Cryopreservation is a method of storage of biological material at the temperature of liquid nitrogen (-196°C , LN). The main advantage of this method is the possibility to store viable cells for a long time. Desiccation and freezing sensitivity of seeds, their fragments or other plant organs, which are useful as genetic resources, should be investigated before cryopreservation.

KEY WORDS

liquid nitrogen, cryopreservation, orthodox, suborthodox, recalcitrant seeds

ADDRESSES

Beata P. Plitta – e-mail: beata-plitta@wp.pl

Marcin Michalak, Szynom Kotlarski, Paweł Chmielarz

Pracownia Biologii Nasion; Instytut Dendrologii Polskiej Akademii Nauk; ul. Parkowa 5; 62-035 Kórnik

Wstęp

Kriokonserwacja jest metodą przechowywania materiału biologicznego, w tym nasion, w temperaturze ciekłego azotu (LN, -196°C). Polega ona na umieszczeniu komórek, tkanek czy organów roślin (często po odpowiednim przysposobieniu z wykorzystaniem krioprotektantów) w ciekłym azocie lub w jego parach.

Walters i in. [2004] opisali wpływ kriokonserwacji na kiełkowanie nasion oraz ekstrapolowali potencjalny czas ich bezpiecznego przechowywania liczony w setkach lat. Wykazali, że w temperaturze poniżej -130°C (temperatura par LN) procesy metaboliczne oraz podziały komórkowe ulegają spowolnieniu, co wynika z bardzo słabego ruchu kinetycznego cząsteczek. Dzięki temu zahamowane zostają procesy starzenia się, co teoretycznie stwarza możliwość prawie nieograniczonego życia komórek. Analiza stabilności biofizycznej podsuszonych nasion wykazała, że pomimo tak niskiej temperatury nadal obserwowana była, chociaż już w ograniczonym zakresie, mobilność cząsteczek prowadząca do zmian w nasionach. Oznacza to, że temperatura LN nie była na tyle niska, aby całkowicie zatrzymać procesy biologiczne zachodzące w nasionach. Jednak badania wykazały także, że im niższa jest temperatura przechowywania nasion, tym dłużej zachowują one żywotność, a przewidywana za pomocą ekstrapolacji długość ich życia w parach LN może wynosić 500, a w samym LN około 3400 lat. Nasiona przechowywane metodami tradycyjnymi w temperaturze -18°C utrzymują wysoką żywotność przez co najwyżej 46-70 lat, podczas gdy przechowywane kriogenicznie są żywotne ponad 70-krotnie dłużej [Walters 2004; Walters i in. 2004; Pritchard 2007]. Dodatkowo niewielki koszt oraz małe wymagania dotyczące

* Artykuł został przygotowany w ramach tematu badawczego finansowanego przez Dyрекcję Generalną Lasów Państwowych w Warszawie (OR-2717-2/12).

sprzętu i powierzchni laboratoryjnej, a także brak możliwości zanieczyszczenia przechowywanego materiału przez bakterie i grzyby podczas kriokonserwacji [Kaczmarczyk i in. 2012], powodują, że metoda ta jest coraz powszechniej wykorzystywana w celu przechowywania pąków spoczynkowych [Reed i in. 1998], zarodków somatycznych [Hazubska-Przybył i in. 2010, 2013], a także nasion drzew z kategorii *orthodox* (tolerujących odwodnienie) [Chmielarz 2009a, b, 2010a-c], jako dodatkowe zabezpieczenie zasobów genowych deponowanych w bankach genów. Dla gatunków produkujących nasiona *recalcitrant* (wrażliwe na odwodnienie) kriokonserwacja jest potencjalnie jedyną metodą przechowywania ich zasobów genowych [Chmielarz i in. 2005; 2011].

Kriokonserwacja nasion z kategorii *orthodox*

Roberts [1973] podzielił gatunki roślin, pod względem nasion, jakie produkują, na dwie kategorie: *orthodox* i *recalcitrant*. Do pierwszej zaliczył te gatunki, których nasiona znoszą odwodnienie poniżej 5% wilgotności. Do kategorii *recalcitrant* zakwalifikował gatunki wytwarzające nasiona, które zazwyczaj giną w wyniku podsuszenia poniżej krytycznego, zwykle dość wysokiego poziomu uwodnienia (od około 20 do 50%). Ellis i in. [1990] wprowadzili trzecią kategorię nasion pośrednich, nazywaną *suborthodox* (*intermediate*).

W ostatnim czasie odnotowuje się wzrost liczby badań nad kriokonserwacją nasion z kategorii *orthodox*, w tym nasion gatunków drzewiastych (około 40), ogrodniczych (9) i rolniczych (13) [Pritchard 2007]. Kluczowym problemem w podejściu do kriogenicznego przechowywania nasion kategorii *orthodox* jest określenie ich optymalnej (bezpiecznej) wilgotności. Wang i in. [1993] sugerują, że bezpieczny zakres wilgotności (BZW) nasion przechowywanych w LN umożliwiający utrzymanie ich maksymalnej żywotności wynosi 3,8-11%, natomiast Stushnoff i Juntilla [1978] wskazali na zakres 5-13%. Ze względu na obserwowane różnice w tolerancji na podsuszenie powiązane z utrzymywaniem stabilności fizjologicznej błon komórkowych, wartości BZW powinny być wyznaczane dla nasion każdego gatunku. Ponadto, ponieważ temperatura LN jest czynnikiem wywołującym stres, reakcja nasion na przechowywanie w LN może być różna dla różnych gatunków. Jeśli dane nasiona cechuje elastyczna struktura okrywy nasiennej lub owocowej, tolerują one procesy podsuszenia i mrożenia w LN, które w przypadku takich nasion nie powodują uszkodzeń fizycznych [Stanwood 1985].

Nasiona takich gatunków drzew leśnych jak jesion wyniosły, czereśnia ptasia, grab pospolity, brzoza brodawkowata, lipa drobnolistna, olsza czarna, wiąz górski, pochodzących z polskich proveniencji, odwodnione do wartości z zakresu BZW, tolerowały zamrożenie w LN (tab.). Oznacza to, że ultraniska temperatura LN nie obniżyła wschodów uzyskiwanych z przemrożonych nasion, a ochrona *ex situ* zasobów genowych tych gatunków może być realizowana metodą

Tabela.

Bezpieczne zakresy wilgotności [%] nasion gatunków drzewiastych zamrażanych w ciekłym azocie
Safe ranges of moisture content [%] for seeds of tree species from Polish proveniences

	Gatunek	Zakres
Gatunki o nasionach spoczynkowych	Grab pospolity (<i>Carpinus betulus</i>)	3,2-16,5
	Jesion wyniosły (<i>Fraxinus excelsior</i>)	7,2-19,5
	Czereśnia ptasia (<i>Prunus avium</i>)	9,0-16,9
	Lipa drobnolistna (<i>Tilia cordata</i>)	5,2-20,1
Gatunki o nasionach niespoczynkowych	Olsza czarna (<i>Alnus glutinosa</i>)	2,7-19,2
	Brzoza brodawkowa (<i>Betula pendula</i>)	2,0-23,2
	Wiąz górski (<i>Ulmus glabra</i>)	3,3-17,7

kriokonserwacji. Jedynie w przypadku czereśni ptasiej wschody uzyskane z nasion przemrożonych w ciekłym azocie były nieznacznie niższe w porównaniu ze wschodami kontrolnymi (nasiona niemrożone) [Chmielarz 2009a, b, 2010 a-d].

Kriokonserwacja nasion z kategorii *suborthodox* (intermediate)

Szczególne właściwości nasion należących do kategorii *suborthodox*, polegające na braku tolerancji na bardzo silne podsuszenie (w większości przypadków <8-20%) lub oddziaływanie niskiej temperatury, odnotowano u ponad 60 gatunków roślin należących do 40 rodzajów. Długoterminowe przechowywanie tych nasion jest utrudnione, co może stanowić zagrożenie dla ochrony różnorodności genetycznej *ex situ* gatunków je produkujących.

Nasiona *suborthodox* charakteryzują się wysoką zawartością tłuszczów lub też zawierają tłuszcze bogate w nienasycone kwasy tłuszczowe [Crane i in. 2003]. Wykazano, że nasiona kilku badanych gatunków kawy (*Coffea* sp.) tolerowały temperaturę ciekłego azotu, jeśli przed zamrożeniem podsuszono je do wilgotności 13-20% [Dussert i in. 2001]. W przypadku nasion cytryn (*Citrus* sp.) optymalną wilgotność nasion poddanych kriokonserwacji ustalono w stosunku do wilgotności otoczenia (wilgotność względna 75-80%) [Hor i in. 2005]. Nasiona podsuszone do optymalnego poziomu wilgotności różnie reagowały na temperaturę ciekłego azotu w zależności od gatunku, co oznacza, że nasiona należące do kategorii *suborthodox* mogą cechować się zróżnicowaną odpornością na desykcję oraz kriogeniczne przechowywanie nawet w obrębie tego samego rodzaju [Dussert i in. 2001; Hor i in. 2005]. Zauważono także silną korelację pomiędzy ilością nienasyconych kwasów tłuszczowych a liczbą siewek uzyskanych po rozmrożeniu z LN. Uszkodzenia nasion po mrożeniu w LN związane były z przejściami fazowymi lipidów oraz oddziaływaniem niezwiązanej wody pozostającej w nasionach na ich strukturę krystaliczną [Crane i in. 2003].

Do gatunków rodzimych produkujących nasiona z kategorii *suborthodox* zaliczyć można czereśnię ptasią (*Prunus avium*). Nasiona tego gatunku tolerują silną desykcję (nawet do 1,6%) [Chmielarz 2009b], charakteryzują się jednak wrażliwością na temperaturę LN i wyższe (-40°C) [Stanwood 1985; Chmielarz 2009b]. Nasiona czereśni ptasiej tolerowały przechowywanie w LN, aczkolwiek w zakresie „optymalnej wilgotności” (9,0-16,9%) zaobserwowano niższe wschody (o około 10%) w porównaniu do wschodów uzyskanych z nasion o tej samej wilgotności, niemrożonych w LN [Chmielarz 2009b]. Tak jak w przypadku nasion gatunków cytryn i kawy było to związane z dużą zawartością tłuszczów zapasowych (45%) oraz z przejściem fazowym błon ze stanu ciekłokrystalicznego w stan krystaliczny [Stanwood 1985; Chmielarz 2009b].

Wymienione przykłady wskazują, że nie zawsze warunkiem pomyślnej kriokonserwacji nasion jest bezpieczne ich podsuszenie. W celu poznania ich reakcji na temperaturę ciekłego azotu powinny być one przedmiotem osobnych badań kriogenicznych. Ich tolerancja na temperaturę LN związana jest bowiem z charakterystyczną dla nasion poszczególnych gatunków zawartością tłuszczów i kwasów tłuszczowych [Chmielarz 2009b].

Kriokonserwacja nasion z kategorii *recalcitrant*

Nasiona *recalcitrant* nie posiadają dobrze wykształconych i skutecznych mechanizmów obronnych zabezpieczających je przed skutkami odwodnienia [Walters i in. 2008], a stopień wrażliwości nasion na desykcję jest podstawowym czynnikiem wpływającym na wybór odpowiedniej metody kriokonserwacji. Większość technik polega na unikaniu krystalizacji wewnątrzkomórkowego lodu i mechanicznych uszkodzeń błon podczas deplazmolizy. W tym celu stosuje się różne tempo podsuszania i schładzania tkanki nasion. Bardzo szybkie podsuszenie tkanki wraz-

liwej (do kilku godzin) umożliwia osiągnięcie maksymalnej odporności tkanek na desykcję w porównaniu z podsuszeniem powolnym (przez kilka dni). W ten sposób ograniczony zostaje czas, w którym komórki narażone są na przejściowy niedobór wody. Faza dojrzałości nasion *recalcitrant* oraz tempo podsuszenia izolowanych z nich elementów (np. osi zarodkowych) wpływają na mniejszą lub większą kumulację uszkodzeń związanych z przyspieszonym metabolizmem odwadnianej tkanki. Dla większości przebadanych gatunków preferowane jest szybkie podsuszenie tkanki, tzw. flash drying [Berjak i in. 1989; Walters i in. 2001]. Stres desykacyjny, odpowiadający potencjałowi wody w komórce poniżej -5MPa , wywołuje zwiększony wzajemny nacisk i ściskanie powierzchni struktur komórkowych oraz makrocząsteczek tkanki wegetatywnej. Dochodzi wtedy do utraty objętości komórek oraz zrywania błon komórkowych. Jeśli redukcja objętości komórki przekracza 50%, prowadzi to do jej nieodwracalnych uszkodzeń [Walters i in. 2002]. W wyniku silnego odwodnienia komórek czy tkanek nasion z kategorii *recalcitrant* obserwuje się słabe zbalansowanie metabolizmu komórkowego, w efekcie czego powstają wolne rodniki [Walters i in. 2002]. W celu ochrony przed stresem silnego odwodnienia, w nasionach wytwarzane są antyoksydanty nieenzymatyczne (glutation, kwas askorbinowy, α -tokoferol), enzymatyczne (dysmutazy nadadtlenkowe, katalazy, peroksydazy oraz enzymy cyklu askorbinowo-glutationowego), związki dobrze rozpuszczalne w wodzie, takie jak oligosacharydy czy białka LEA i HSP [Pukacka, Ratajczak 2006, 2007; Kalemba, Pukacka 2008; Pukacka i in. 2009]. Antyoksydanty, cukry oraz specyficzne białka wytwarzane są podczas późnej embriogenezy we wszystkich kategoriach nasion (w tym również w nasionach typu *recalcitrant*), jednakże prawdopodobnie najwięcej takich związków produkują nasiona z kategorii *orthodox*, a najmniej nasiona z kategorii *recalcitrant* [Walters i in. 2008].

Kriokonserwacja nasion z kategorii *recalcitrant* polega na wyizolowaniu z takich nasion niewielkich fragmentów tkanek czy organów, takich jak zarodki, osie zarodkowe czy plumule (merystem wierzchołkowy osi zarodkowej), które przed zamrożeniem w LN poddaje się krioprotekcji. Po rozmrożeniu regenerację kompletnych roślin uzyskuje się z wykorzystaniem sterylnych kultur *in vitro*. Manipulowanie niewielkimi fragmentami tkanek czy organów nasion *recalcitrant* pozwala na podwyższenie skuteczności zabiegów krioprotekcji (szybsza desykcja oraz przenikanie krioprotektantów) czy samej kriokonserwacji (szybsze zamrażanie i rozmrażanie tkanki) [Nadarajan i in. 2007; Ngobese i in. 2010]. Przy odpowiednim poziomie wilgotności i niewielkich rozmiarach zamrażanych eksplantatów czy nasion ($<1\text{ mg}$ suchej masy), możliwe jest ich bezpieczne zamrożenie z prędkością około 1000°C/s . Nasiona i eksplantaty o suchej masie nieprzekraczającej 6 mg mogą być schładzane z prędkością $100^\circ\text{-}500^\circ\text{C/s}$ [Walters i in. 2008].

W przypadku dębu szypułkowego (nasiona z kategorii *recalcitrant*) wykazano, że niewielkie plumule izolowane z osi zarodkowych są skutecznym eksplantatem w kriokonserwacji zasobów genowych tego gatunku. Mniejsze rozmiary plumuli ($0,1\text{-}0,5\text{ mm}$) oraz jednorodność tkanki w porównaniu z osią zarodkową ($4\text{-}7\text{ mm}$) pozwoliły na uzyskanie powtarzalnych rezultatów ich przeżywalności po rozmrożeniu z LN, a następnie wyprowadzenie rosnących siewek [Chmielarz i in. 2011]. Metoda ta stosowana jest obecnie w Leśnym Banku Genów Kostrzyca.

Osie zarodkowe izolowane z nasion nie w pełni dojrzałych lub z wrażliwych na odwodnienie nasion *recalcitrant*, pomimo częściowego podsuszenia oraz zastosowania wystarczająco szybkiego tempa schładzania, nie tolerują temperatury ciekłego azotu. Ich skuteczną kriokonserwację może umożliwić traktowanie egzogennymi krioprotektantami [Walters i in. 2002]. Są to dobrze rozpuszczalne substancje chemiczne przenikające przez błony komórkowe do wnętrza komórki (glicerol, DMSO – dimetylosulfotlenek, propanodiol, prolina) lub niewnikające do

wnętrza komórki, a powodujące odwodnienie komórki na drodze osmozy (sacharoza). Zastosowanie krioprotektantów zwiększa lepkość soku komórkowego, zmniejsza potencjał wodny komórek oraz podwyższa temperaturę wtrzyfikacji (zeszklenia cytoplazmy). Wtrzyfikacja zabezpiecza błony komórkowe przed skutkami tworzenia się wewnątrzkomórkowego lodu i nadmiernym odwodnieniem komórki.

Poza wspomnianymi związkami możliwe jest zastosowanie w procedurze kriokonserwacji jonów magnezu (Mg^{2+}) i wapnia (Ca^{2+}) [Mycock 1999], co wpływa na zachowanie prawidłowego wzrostu eksplantatu po rozmrożeniu. Obecność antyoksydantów podczas rozmrażania tkanki wpływa na redukcję stresu oksydacyjnego w komórce podczas krioprotekcji [Walters i in. 2008]. Wyższą przeżywalność odmrożonej tkanki podczas wstępnej hodowli *in vitro* uzyskuje się, gdy do pożywki agarowej dodawane są inhibitory wzrostu, takie jak kwas abscysynowy (ABA) [Breadmore, Whittle 2005].

Skuteczność metody kriokonserwacji nasion z kategorii *recalcitrant* zależy w dużej mierze od rodzaju tkanki izolowanej z nasion oraz od odpowiednio dobranej pożywki agarowej (makro-, mikroelementy, regulatory wzrostu), która umożliwi regenerację *in vitro* całych roślin [Berjak i in. 1989; Goveia i in. 2004]. Istotne jest także określenie optymalnego tempa podsuszenia i schłodzenia tkanki [Wesley-Smith i in. 2001], dobór odpowiednich krioprotektantów [Nadarajan i in. 2007; Chmielarz i in. 2011] oraz odpowiedniej procedury rozmrażania i ponownego uwodnienia tkanek podczas rehydratacji [Berjak, Mycock 2004; Chmielarz i in. 2011].

Podsumowanie

Kriokonserwacja to metoda przechowywania żywych komórek, tkanek, organów lub całych organizmów w ultraniskiej temperaturze ciekłego azotu ($-196^{\circ}C$, LN). Teoretycznie w takich warunkach materiał biologiczny może być przechowywany nieskończenie długo bez wpływu na jego żywotność. Jednakże Walters i in. [2004] zaobserwowali nieznaczny spadek żywotności kriogenicznie przechowywanych przez 10-20 lat nasion sałaty (*Lactuca sativa*). Niemniej jednak kriokonserwacja jest metodą, która w porównaniu z metodami tradycyjnego przechowania pozwala na ponad 70-krotne wydłużenie czasu przechowywania nasion. W przypadku nasion należących do kategorii *recalcitrant* kriokonserwacja jest jedyną metodą pozwalającą na zabezpieczenie zasobów genowych gatunków w postaci ekplantantów uzyskiwanych z nasion.

Podstawowym zadaniem w czasie przysposabiania materiału do długoterminowej ochrony *ex situ* metodą kriokonserwacji jest ocena wpływu podsuszenia oraz niskiej temperatury na przechowywany materiał. Możliwość zastosowania temperatury kriogenicznej może być ograniczona różną wrażliwością nasion lub ich fragmentów na podsuszanie. Wtedy przeżywalność tkanki po kriokonserwacji można podwyższyć poprzez zastosowanie odpowiedniej krioprotekcji.

Nasiona kategorii *orthodox* charakteryzują się szerokim bezpiecznym zakresem wilgotności, w którym mogą być przechowywane w temperaturze LN bez utraty żywotności. Do tej grupy można zaliczyć nasiona kilku gatunków drzew polskich proveniencji (jesion wyniosły, czereśnia ptasia, grab pospolity, brzoza brodawkowata, lipa drobnolistna, olsza czarna, wiąz górski). Kriogeniczne przechowywanie nasion z kategorii *suborthodox* i *recalcitrant* wymaga dokładnego rozpoznania wrażliwości tkanki na podsuszanie i/lub niską temperaturę. W przypadku nasion z tych kategorii izolowane fragmenty nasion poddaje się ochronie z zastosowaniem krioprotektantów.

Literatura

Beardmore T., Whittler C. A. 2005. Induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in silver maple (*Acer saccharinum*) embryonic axes. *Tree Physiology* 25 (8): 965-972.

- Berjak P., Farrant J. M., Pammenter N. W. 1989. The basis of recalcitrant seed behavior. W: Taylors R. B. [red.]. Recent Advances in the Development and Germination of Seeds. Plenum Press, New York. 89-108.
- Berjak P., Mycock D. J. 2004. Calcium, with magnesium, is essential for normal seedling development from partially-dehydrated recalcitrant axes: a study on *Trichilia dregeana* Sond. Seed Science Research 14 (2): 217-231.
- Chmielarz P. 2009a. Cryopreservation of dormant European ash (*Fraxinus excelsior*) orthodox seeds. Tree Physiol. 29 (10): 1279-1285.
- Chmielarz P. 2009b. Cryopreservation of dormant orthodox seeds of forest trees: mazzard cherry (*Prunus avium* L.). Annals of Forest Science 66 (4): 405.
- Chmielarz P. 2010a. Cryopreservation of orthodox seeds of *Alnus glutinosa*. CryoLetters 31 (2): 139-146.
- Chmielarz P. 2010b. Cryopreservation of conditionally dormant orthodox seeds of *Betula pendula*. Acta Physiologiae Plantarum 32 (3): 591-596.
- Chmielarz P. 2010c. Cryopreservation of the non-dormant orthodox seeds of *Ulmus glabra*. Acta Biologica Hungarica 61 (2): 224-233.
- Chmielarz P. 2010d. Cryopreservation of dormant orthodox seeds of European hornbeam (*Carpinus betulus*). Seed Science and Technology 38 (1): 146-157.
- Chmielarz P., Grenier-de March G., de Boucaud M. T. 2005. Cryopreservation of *Quercus robur* L. embryogenic calli. CryoLetters 26 (6): 349-356.
- Chmielarz P., Michalak M., Pałucka M., Wasileńczyk U. 2011. Successful cryopreservation of *Quercus robur* plumules. Plant Cell Reports 30 (8): 1405-1414.
- Crane J., Miller A. L., Roekel J. W., Walters C. 2003. Triacylglycerols determine the unusual storage physiology of *Cuphea* seed. Planta 217 (5): 699-708.
- Dussert S., Chabrilangr N., Rocquelin G., Engelmann F., Lopez M., Hamon S. 2001. Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) seeds to ultra-low temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition, and cooling procedure. Physiologia Plantarum 112 (4): 495-504.
- Ellis R. H., Hong T. D., Roberts E. H. 1990. An Intermediate Category of Seed Storage Behaviour? I. Coffee. Journal of Experimental Botany 41 (9): 1167-1174.
- Goveia M., Kioko J. I., Berjak P. 2004. Developmental status is a critical factor in the selection of excised recalcitrant axes as explants for cryopreservation. Seed Science Research 14 (2): 241-248.
- Hazubaska-Przybył T., Chmielarz P., Michalak M., Bojarczuk K. 2010. Cryopreservation of embryogenic tissues of *Picea omorika* (Serbian spruce). Plant Cell Tissue and Organ Culture 102 (1): 35-44.
- Hazubaska-Przybył T., Chmielarz P., Michalak M., Dering M., Bojarczuk K. 2013. Survival and genetic stability of *Picea abies* embryogenic cultures after cryopreservation using a pregrowth-dehydration method. Plant Cell Tiss. Organ Cult. DOI: 10.1007/s11240-012-0270-2.
- Hor Y. L., Kim Y. J., Ugap A., Chabrilange N., Sinniah U. R., Engelmann F., Dussert S., 2005. Optimal Hydration Status of Intermediate Oil Seeds: *Citrus* as a Case Study. Annals of Botany 95 (7): 1153-1161.
- Kaczmarczyk A., Funnekötter B., Menon A., Phang P. Y., Al-Hanbali A., Bunn E., Mancera R. L. 2012. Current Issues in Plant Cryopreservation. W: Katkov II [red.]. Current Frontiers in Cryobiology. InTech. 417-438.
- Kalemba E. M., Pukačka S. 2008. Changes in late embryogenesis abundant proteins and a small heat shock protein during storage of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. Environmental and Experimental Botany 63 (1-3): 274-280.
- Mycock D. 1999. Addition of calcium and magnesium to a glycerol and sucrose cryoprotectant solution improves the quality of plant embryo recovery from cryostorage. CryoLetters 20 (2): 77-82.
- Nadarajan J., Staines H. J., Benson E. E., Marzalina M., Krishnapillaya B., Harding K. 2007. Optimization of cryopreservation for *Sterculia cordata* zygotic embryos using vitrification techniques. Journal of Tropical Forest Science 19 (2): 79-85.
- Ngobese N. Z., Ser-shen, Pammenter N. W., Berjak P. 2010. Cryopreservation of the embryonic axes of *Phoenix reclinata*, a representative of the intermediate seed category. Seed Science and Technology 38 (3): 704-716.
- Pritchard H. W. 2007. Cryopreservation of desiccation-tolerant seeds. W: Day J. G., Stacey G. N. [red.]. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey. 185-202.
- Pukačka S., Ratajczak E. 2006. Antioxidative response of ascorbate-glutathione pathway enzymes and metabolites to desiccation of recalcitrant *Acer saccharinum* seeds. J. Plant Physiol. 163 (12): 1259-1266.
- Pukačka S., Ratajczak E. 2007. Ascorbate and glutathione metabolism during development and desiccation of orthodox and recalcitrant seeds of the genus *Acer*. Funct. Plant Biol. 34 (7): 601-613.
- Pukačka S., Ratajczak E., Kalemba E. M. 2009. Non-reducing sugar levels in beech (*Fagus sylvatica*) seeds as related to withstanding desiccation and storage. J. Plant Physiol. 166 (13): 1381-1390.
- Reed B. M., Paynter C. L., DeNoma J., Chang Y. 1998. Techniques for medium- and long-term storage of pear (*Pyrus* sp.) genetic resources. IPGRI Plant Genetic Resources Newsletter 15: 1-5.
- Roberts E. H., 1973. Predicting the storage life of seeds. Seed Science and Technology. 499-514.
- Stanwood P. C. 1985. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. W: Kartha K. K. [red.]. Cryopreservation of Plant Cells and Organs. CRC Press Inc. 200-225.

- Stushnoff C., Juntilla O. 1978. Resistance to low temperature injury in hydrated lettuce seed by supercooling. W: Li P. H., Sakai A. [red.]. Plant cold hardiness and freezing stress: mechanisms and crop implications. Academic Press, NY. 241-247.
- Walters C. 2004. Temperature dependency of molecular mobility in preserved seeds. *Biophysical Journal* 86 (2): 1253-1258.
- Walters C., Farrant J. M., Pammenter N. W., Berjak P. 2002. Desiccation Stress and Damage. W: Black M., Pritchard H. W. [red.]. Desiccation and Plant Survival. CABI Publishing, Wallingford UK. 263-291.
- Walters C., Pammenter N. W., Berjak P., Crane J. 2001. Desiccation damage, accelerated aging and respirations in desiccation tolerant and sensitive tissues. *Seed Science Research* 11 (2): 135-148.
- Walters C., Wesley-Smith J., Crane J., Hill L. M., Chmielarz P., Pammenter N., Berjak P. 2008. Cryopreservation of recalcitrant (i.e. Desiccation-Sensitive) Seeds. W: Reed B. M. [red.]. Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer Science Business Media, LLC. 465-484.
- Walters C., Wheeler L., Stanwood P. C. 2004. Longevity of cryogenically stored seeds. *Cryobiology* 48 (3): 229-244.
- Wang B. S. P., Charest P. J., Downie B. 1993. *Ex situ* storage of seeds, pollen and *in vitro* cultures of perennial woody plant species. FAO Forestry Paper 113.
- Wesley-Smith J., Pammenter N. W., Berjak P., Walters C. 2001. The effects of two drying rates on the desiccation tolerance of embryonic axes of recalcitrant jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.) seeds. *Annals of Botany* 88 (4): 653-664.

SUMMARY

Cryogenic storage of seeds

Cryopreservation is the storage of viable cells, tissues, organs or organisms at the ultra-low temperature of liquid nitrogen (-196°C , LN). Despite previous predictions that viability of cryostored material can be maintained indefinitely, slight losses in germination percentage of *Lactuca sativa* seeds were observed after 10-20 years of cryopreservation [Walters et al. 2004]. However, according to theoretical considerations, biological material can be cryostored far longer in LN (more than 70-fold) than when using conventional methods. In case of plants producing recalcitrant seeds, cryopreservation of seed-derived explants is the method of choice for protection of their genetic resources. There are further benefits to this approach, e.g. the low cost of storage, minimal equipment and space requirements, and reduced threat of new contamination with bacteria or fungi [Kaczmarczyk et al. 2012].

An important stage in developing a long-term *ex-situ* conservation strategy for a particular plant species is to determine how cryostored seeds and their fragments react to desiccation and cryogenic temperatures. Such evaluation is important because of their various sensitivity, which influences feasibility of cryopreservation. In each particular example, desiccation vulnerability and the impact of low temperatures on viability of cryopreserved material should be assessed. Orthodox seeds are characterized by a wide range of moisture content in which they can be frozen in LN without loss in viability. Several woody plant species from Polish provenances can be successfully cryopreserved: European ash (*Fraxinus excelsior*), mazzard cherry (*Prunus avium*), common hornbeam (*Carpinus betulus*), silver birch (*Betula pendula*), small-leaved lime (*Tilia cordata*), black alder (*Alnus glutinosa*), and Scots elm (*Ulmus glabra*).