

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

Czy kriokonserwacja jest bezpieczna? Określenie potencjalnych zmian w tkankach roślinnych poddanych kriogenicznemu przechowywaniu

Cryopreservation – is it safe? Possible changes in cryostored plant genetic resources

ABSTRACT

Michalak M., Plitta B. P., Kotlarski S., Chmielarz P. 2014. Czy kriokonserwacja jest bezpieczna? Określenie potencjalnych zmian w tkankach roślinnych poddanych kriogenicznemu przechowywaniu. Sylwan 158 (10): 795-800.

Cryopreservation (storage in liquid nitrogen, -196°C) is a technique that ensures safe, long-term conservation of plant species with recalcitrant seeds, vegetatively propagated species and biotechnology products such as somatic embryos, cell lines and genetically transformed material. The aim of cryostorage is to keep plant tissue in a safe way, which does not cause changes during storage at neither phenotypic, cytological and histological, biochemical, genetic nor epigenetic level. Therefore, before cryostorage will be applied for long-term preservation it should be thoroughly assess if it does not cause any injuries in plant material.

KEY WORDS

cryopreservation, liquid nitrogen, epigenetics, preservation of genetic resources

ADDRESSES

Marcin Michalak – e-mail: michalak_marcin81@wp.pl

Beata P. Plitta, Szymon Kotlarski, Paweł Chmielarz

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

Wstęp

Materiał biologiczny powinien być przechowywany w warunkach zapewniających stabilność fizjologiczną, biochemiczną, genetyczną (sekwencja DNA) oraz epigenetyczną (metylacja cytozyny, modyfikacje histonów). Skuteczne metody kriokonserwacji, czyli przechowywania materiału biologicznego w temperaturze poniżej -160°C (temperatura par ciekłego azotu), opracowano dotychczas dla około 200 gatunków roślin, w tym licznych gatunków drzew i krzewów polskich proveniencji, jak np. dąb szypułkowy (*Quercus robur* L.) [Chmielarz i in. 2011], leszczyna pospolita (*Corylus avellana* L.) [Michalak i in. 2013b] czy świerk pospolity (*Picea bies* (L.) Karst) [Hazubaska-Przybył i in. 2013]. Metoda ta wykorzystywana jest w przypadku gatunków wytwarzających nasiona, ze szczególnym uwzględnieniem nasion typu recalcitrant [Plitta i in. 2013], roślin rozmnażanych wegetatywnie, zarodków somatycznych, linii komórkowych lub też materiału modyfikowanego genetycznie. Metodę przechowywania kriogenicznego uznaje się za skuteczną, jeśli możliwa jest regeneracja z rozmrożonego materiału kompletnej rośliny (z wykształconym pędem i korzeniem), charakteryzującej się prawidłowym wzrostem. Jednakże procedury stosowane w czasie kriokonserwacji, takie jak desykcja, krioprotekcja, przechowywanie kriogeniczne i regeneracja roślin *in vitro*, narażają tkanki na działanie stresu, mogącego powodować ukryte zmiany w mate-

riale genetycznym [Harding 2004]. Zwłaszcza stosowanie długoterminowej hodowli na pożywkach agarowych wpływa na zwiększenie liczby mutacji [Yang i in. 2010]. U roślin hodowanych w kulturach *in vitro* może to być spowodowane wpływem czynników chemicznych zawartych w pożywce bądź też brakiem selektywnego oddziaływania środowiska zewnętrznego na rośliny.

Ze względu na coraz powszechniejsze wykorzystywanie technik kriokonserwacji w celu zachowania zasobów genowych roślin, niezwykle ważne jest określenie, do jakich uszkodzeń może dochodzić w wyniku mrożenia tkanki w ciekłym azocie (ang. liquid nitrogen, LN). Takie zmiany określa się na poziomie fenotypowym (morfologicznym, biometrycznym), cytologicznym i histologicznym, biochemicznym (analiza metabolitów i białek, w tym enzymów), a także molekularnym, polegającym na analizie struktury genomu z zastosowaniem hybrydyzacji DNA-DNA oraz markerów genetycznych (takich jak RFLP, RAPD, SSR, AFLP), czy też epigenetycznym – związanym z modyfikacjami chromatyny (histonów i DNA) [Harding 2004]. Poniżej omówiono potencjalne zmiany, jakie mogą zachodzić w tkankach roślin podczas kriokonserwacji.

Zmienność fenotypowa

Pierwsze obserwacje morfologiczne roślin otrzymanych z materiału rozmrożonego z ciekłego azotu zostały przeprowadzone przez Bajaja [1977]. Jak do tej pory tylko w nielicznych pracach obserwowano zmiany morfologiczne u roślin poddanych kriokonserwacji. U chryzantem *Dendranthema grandiflorum* otrzymanych ze stożków wzrostu przemrożonych w LN zaobserwowano inny kolor kwiatostanu w porównaniu z roślinami niemrożonymi [Fukai i in. 1994]. Jednakże zmiany te mogły być spowodowane chimeryczną naturą tych roślin, a nie kriokonserwacją *per se*. Ponad połowa odmian tego gatunku to chimery peryklinalne ze zmienioną zewnętrzną warstwą tkanek. Podczas ich hodowli *in vitro*, w zależności od rodzaju pobieranego eksplantatu, możliwa była zmiana barwy kwiatostanu [Rumińska-Lema 2005]. W większości przypadków nie obserwowano różnic w morfologicznym rozwoju roślin uzyskanych z tkanek przemrożonych w porównaniu z kontrolą. Nie odnotowano takich różnic u kiwi [Wu i in. 2001] i kawy [Dussert i in. 1997], a także wielu innych gatunków. Zaobserwowano natomiast pojawienie się zmian biometrycznych u trzciny cukrowej [Gonzalez-Arnao i in. 1999] i bananowca [Cote i in. 2000] otrzymanych odpowiednio z merystemów i embriogennej zawiesziny poddanych kriokonserwacji.

Zmienność cytologiczna i histologiczna

Badania cytologiczne pozwalają zaobserwować zaburzenia w liczbie chromosomów (ploidalność, aneuploidalność) oraz zniekształcenia wrzeciona podziałowego podczas mitozy, prowadzące do powstawania wrzecion wielobiegunowych. Inne anomalie zachodzące podczas podziałów komórkowych to opóźnienia przy rozchodzeniu się chromosomów, nierównomierny lub fragmentaryczny podział chromatyd, małe i duże delecje, translokacje, utrata sekwencji satelitarnych, przypadkowe łączenie się chromosomów czy tworzenie się mostków chromosomowych [Kovacs 1985].

Nie obserwowano różnic w ploidalności podkładek czereśni (*Prunus* 'Ferlenain') poddanych kriokonserwacji [Helliot i in. 2002]. Podobne wyniki świadczące o braku zmian w ploidalności tkanek poddanych kriokonserwacji uzyskano dla dwunastu genotypów cytryn [Hao i in. 2002]. Brak zmian w liczbie chromosomów obserwowano podczas kriokonserwacji zarodków zygocytynych palmy kokosowej (*Cocos nucifera* L.) [Sisuandar i in. 2010]. Hao i in. [2001] analizowali osiem siostrzanych linii jabłoni (*Malus* sp.), u których po kriokonserwacji stożków wzrostu pędów wykryto komórki inne niż diploidalne. Zmiany te nie były istotne statystycznie, a wyniki wskazywały na względnie stabilne zachowanie poliploidalności [Hao i in. 2001]. Zatem badania

cytologiczne tkanek poddanych kriokonserwacji wskazują, że ich stabilność cytologiczna została zachowana, jednak sama hodowla materiału w kulturach *in vitro* związana z procedurą kriokonserwacji może być przyczyną zmian w układzie chromosomów. Według niektórych autorów hodowla na pożywkach agarowych może wywoływać zmiany genetyczne [Larkin, Scowcroft 1981] czy anomalie chromosomowe [Bayliss 1980].

Zmienność biochemiczna

W przypadku gdy hodowlę *in vitro* stosuje się do produkcji korzystnych metabolitów wtórnych, wykorzystywanych na przykład w medycynie, istotna jest informacja, czy kriokonserwacja nie zaburza syntezy takich związków. Produkcja saponin (diosgeniny) przez pnącze z rodzaju pochrzynów (*Dioscorea floribunda*), posiadających szerokie spektrum właściwości biologicznych, w tym antygrzybiczych, antybakteryjnych i antynowotworowych [Myszka i in. 2003], nie uległa zmianom u roślin regenerowanych z przemrożonych w LN stożków wzrostu pędów [Ahuja i in. 2002]. Również ilość chlorofilu i naturalnego insektycydu (pyretryny) u chryzantemy (*Chrysanthemum* sp.) pozostawały na tym samym poziomie po kriokonserwacji [Hitmi i in. 1999]. Powyższe obserwacje wskazują, iż przechowanie w LN nie wpływało na zmianę produkcji metabolitów wtórnych.

Analiza elektroforetyczna izoenzymów peptydazy aminoleucynowej i amylazy w tkankach merystemów trzciny cukrowej nie wykazała różnic po rozmrożeniu w LN w porównaniu z kontrolą [Paulet i in. 1993]. Obserwowano natomiast różnice w profilu izoenzymów w roślinach otrzymanych z przemrożonego w LN kalusa trzciny cukrowej [Eksomtramage i in. 1992].

Zmienność genetyczna

W celu określenia stabilności genetycznej tkanek roślin poddanych kriokonserwacji stosowane są techniki molekularne wykorzystujące markery genetyczne, takie jak RAPD, RFLP, AFLP i ISSR.

Badania RAPD wskazywały na stabilność genetyczną embriogennych linii komórkowych dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.) poddanych kriokonserwacji [Sánchez i in. 2008]. Przechowywanie w LN embriogennych zarodków palmy kokosowej (*Cocos nucifera* L.) nie powodowało zmian w obrębie sekwencji ich DNA analizowanej metodą ISSR [Sisunandar i in. 2010]. Nie stwierdzono też zmian na poziomie DNA w przypadku stożków wzrostu pędów chmielu zwyczajnego (*Humulus lupulus* L.) poddanych kriokonserwacji [Pedro i in. 2008]. Również badania stabilności genetycznej zamrożonych w LN zarodków somatycznych świerka pospolitego wykazały, że nie doszło do żadnych zmian w sekwencji DNA analizowanej za pomocą 5 markerów mikrostelitarnych [Hazubska-Przybył i in. 2013].

Za pomocą RAPD i AFLP przeprowadzono szczegółową analizę stabilności genetycznej stożków wzrostu *Chrysanthemum* po kolejnych etapach kriokonserwacji (stres osmotyczny, otoczkowanie alginianem wapnia, desykcja w strumieniu powietrza, chłodzenie). Obserwowano zmianę w 3 markerach (RAPD) w próbie poddanej zamrożeniu w LN oraz zanik jednego markera na etapie przysposobienia tkanki na pożywce agarowej z wysoką zawartością sacharozy (0,3 M) [Martín i in. 2011]. Również badanie metodą AFLP wykazało pojawienie się większej liczby polimorficznych fragmentów DNA na etapie krioprotekcji (wstępna hodowla na pożywce z dodatkiem 0,3 M sacharozy). Kriokonserwacja może zatem indukować zmiany na poziomie sekwencji DNA, a ich przyczyną może być nie tylko sam proces zamrażania w ciekłym azocie, ale również poprzedzające je kolejne etapy krioprotekcji [Martín i in. 2011]. Analiza AFLP stabilności genetycznej u eugleny (*Euglena gracilis*) wskazywała na zmiany na etapie otoczkowania alginianem wapnia [Harding i in. 2011]. Także Fernandes i in. [2008] obserwowali istotne zmiany w sekwencji DNA zarodków somatycznych dębu korkowego (*Quercus suber* L.) podsuszonych

do wilgotności 25%, a następnie przemrożonych w LN, w porównaniu z DNA zarodków niemrożonych (metoda AFLP i ISSR). Jednak podsuszenie eksplantatów do poziomu 35% wilgotności, a następnie schłodzenie ich do temperatury LN nie powodowało takich zmian.

Kriokonserwacja może przyczynić się więc do powstawania zmian w obrębie sekwencji DNA, a ryzyko ich wystąpienia jest tym większe, im większa jest liczba zabiegów przygotowujących tkankę do zamrożenia, włączając w to hodowlę *in vitro* tkanki zarówno przed, jak i po rozmrożeniu.

Zmienność epigenetyczna

Epigenetyka opisuje mechanizmy regulacji ekspresji genów niezwiązane bezpośrednio z sekwencją DNA. Do elementów kontroli epigenetycznej zaliczamy m.in. obecność 5-metylocytozyny (m^5C) w DNA. Rozmieszczenie m^5C w genomie jest nierównomierne, a geny, które ulegają słabej ekspresji, są najczęściej zmetylowane w obrębie promotorów lub też pierwszych egzonów, podczas gdy geny ulegające intensywnej ekspresji są zmetylowane w mniejszym stopniu [Zemach i in. 2010]. Dzięki takiemu rozmieszczeniu specyficzna metylacja cytozyn jest jednym z elementów kontrolujących ich wzrost i rozwój poprzez regulację wszystkich procesów genetycznych, wliczając transkrypcję, replikację, naprawę DNA i różnicowanie komórek [Law, Jacobsen 2009].

Sisunandar i in. [2010], badając zarodki zygocytne palmy kokosowej (*Cocos nucifera*), wykazali, że procedury kriokonserwacji nie powodowały istotnych statystycznie zmian w całkowitej ilości zmetylowanych cytozyn w DNA. Również badania przeprowadzone przez Plittę i in. [2014] wykazały, że zarówno samo mrożenie plumul dębu (*Quercus robur*) w LN, jak i zabiegi przygotowujące do kriokonserwacji nie miały istotnego wpływu na ilość tej modyfikowanej zasady w genomowym DNA. Jednak Hao i in. [2001] udowodnili, że w wyniku kriokonserwacji stożków wzrostu jabłoni (*Malus pumila*) następowało obniżenie poziomu zmetylowania DNA. Podobne zmiany zaobserwowano w przypadku zawiesiny komórkowej pomarańczy chińskiej (*Citrus sinensis* 'Newhall') po rozmrożeniu z LN [Hao i in. 2002]. Również badania siewek otrzymanych z osi zarodkowych mahoniowca wielkolistnego (*Swietenia macrophylla* King) poddanych kriokonserwacji i zregenerowanych za pomocą technik *in vitro* wykazały zmiany w poziomie metylacji DNA w porównaniu z drzewem matecznym [Harding i in. 2000]. Zmiany w całkowitej ilości m^5C wywołane kriogenicznym przechowaniem obserwowano również w pąkach spoczynkowych melonowca (*Carica papaya*) [Kaity i in. 2008]. We wskazanych przypadkach w celu regeneracji roślin po kriokonserwacji wykorzystywano techniki *in vitro*. Należy zatem zwrócić uwagę na fakt, że to właśnie hodowla *in vitro* mogła spowodować zmiany w ilości m^5C [Kaity i in. 2008; Pedro i in. 2008].

Wydaje się również, że powszechnie stosowane przed kriokonserwacją podsuszanie nasion do bardzo niskich poziomów wilgotności (około 3-5% w stosunku do świeżej masy) może mieć wpływ na zmiany w poziomie zmetylowania DNA nie tylko w tych nasionach, ale także w otrzymanych z nich siewkach. Obserwacji takiej dokonano w przypadku nasion gruszy pospolitej (*Pyrus communis* L.) [Michalak i in. 2013a]. Można zatem uznać, że zaobserwowane w epigenomie zmiany związane były ze sposobem przysposobienia lub regeneracji tkanek roślinnych, a nie z samym procesem zamrażania w LN.

Podsumowanie

Nadrzędnym zadaniem skutecznej ochrony materiału biologicznego jest jego długoterminowe przechowywanie bez wprowadzania niepożądanych i niekontrolowanych zmian, a metody służące zabezpieczeniu zasobów genowych powinny cechować się stabilnością przechowywanego

materiału. Większość przytoczonych w artykule badań wskazuje, że mrożenie w LN jest procedurą bezpieczną. Jednakże dodatkowe zabiegi, np. podsuszanie, krioprotekcja czy hodowla *in vitro*, mogą powodować niekorzystne zmiany molekularne i cytologiczne w przechowywanym materiale. W związku z tym, zanim procedura kriokonserwacji zostanie uznana za bezpieczną i odpowiednią do zabezpieczenia zasobów genowych w bankach genów, stabilność poddanych jej tkanek roślinnych powinna być szczegółowo analizowana.

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 Science* 163: 971-977.
- Bajaj Y. P. S. 1977. Initiation of shoots and callus from potato-tuber sprouts and axillary buds frozen at -196°C. *Crop Improvement* 4: 48-53.
- Bayliss M. W. 1980. Chromosomal variation in plant tissues in culture. *International Review of Cytology* 11: 113-143.
- Chmielarz P., Michalak M., Pałucka M., Wasileńczyk U. 2011. Successful cryopreservation of *Quercus robur* plumules. *Plant Cell Reports* 30: 1405-1414.
- Cote F. X., Goue O., Domergue R., Panis B., Jenny C. 2000. In-field behavior of banana plants (*Musa AA* sp.) obtained after regeneration of cryopreserved embryogenic cell suspensions. *CryoLetters* 21: 19-24.
- Dussert S., Chabrilangr N., Engelmann F., Anthony F., Hamon S. 1997. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: Importance of the precooling temperature. *CryoLetters* 18: 269-276.
- Eksomtramage T., Paulet F., Noyer J. L., Feldmann P., Glaszmann J. C. 1992. Utility of isozymes in sugarcane breeding. *Sugarcane* 3: 14-21.
- Fernandes P., Rodriguez E., Pinto G., Roldán-Ruiz I., De Loose M., Santos C. 2008. Cryopreservation of *Quercus suber* somatic embryos by encapsulation-dehydration and evaluation of genetic stability. *Tree Physiology* 28: 1841-1850.
- Fukai S., Goi M., Tanaka M. 1994. The chimeric structure of the apical dome of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam.) is affected by cryopreservation. *Science Horticulturae* 57: 347-351.
- Gonzalez-Arno M. T., Urra C., Engelmann F., Ortiz R., de la Fe C. 1999. Cryopreservation of encapsulated sugarcane apices: effect of storage temperature and storage duration. *CryoLetters* 20: 347-352.
- Hao Y. J., Liu Q. L., Deng X. X. 2001. Effect of cryopreservation on apple genetic resources at morphological, chromosomal, and molecular levels. *Cryobiology* 43: 46-53.
- Hao Y. J., You C. X., Deng X. X. 2002. Effects of cryopreservation on developmental competency, cytological and molecular stability of citrus callus. *CryoLetters* 23: 27-35.
- Harding K. 2004. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. *CryoLetters* 25: 3-22.
- Harding K., Marzalin M., Krishnapillay B., Nashatul Zaimah N. A., Notmah M. N., Benson E. E. 2000. Molecular stability assessments of trees regenerated from cryopreserved mahogany (*Swietenia macrophylla*) seed germplasm using non-radioactive techniques to examine the chromatin structure and DNA methylation status of the ribosomal RNA genes. *Journal of Tropical Forest Science* 12: 149-163.
- Harding K., Müller J., Timmermann H., Lorenz M., Day J. G., Friedl T. 2011. Encapsulation dehydration colligative cryoprotective strategies and amplified fragment length polymorphism markers to verify the identity and genetic stability of euglenoids following cryopreservation. *CryoLetters* 31: 460-472.
- Hazubska-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 Tissue and Organ Culture* 113: 303-313.
- Helliot B., Madur D., Dirlwanger E., de Boucaud M. T. 2002. Evaluation of genetic stability in cryopreserved Prunus. *In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant* 38: 493-500.
- Hitmi A., Barthomeuf C., Sallanon H. 1999. Cryopreservation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* shoot tips. Effects of pretreatment conditions and retention of biosynthetic capacity. *CryoLetters* 20: 109-120.
- Kaity A., Ashmore S. E., Drew R. A., Dulloo M. E. 2008. Assessment of genetic and epigenetic changes following cryopreservation in papaya. *Plant Cell Reports* 27: 1529-1539.
- Kovačs E. I. 1985. Regulation of karyotype stability in tobacco tissue cultures of normal and tumors genotypes. *Theoretical Applied Genetics* 70: 548-554.
- Larkin P. J., Scowcroft W. R. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60: 197-214.
- Law J. A., Jacobsen S. E. 2009. Dynamic DNA Methylation. *Science* 323: 1568-1569.
- 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. *Journal of Plant Physiology* 168: 158-166.

- Michalak M., Barciszewska M. Z., Barciszewski J., Plitta B. P., Chmielarz P. 2013a. Global Changes in DNA Methylation in Seeds and Seedlings of *Pyrus communis* after Seed Desiccation and Storage. PLoS ONE 8: e70693.
- Michalak M., Plitta B. P., Chmielarz P. 2013b. Desiccation sensitivity and successful cryopreservation of oil seeds of European hazelnut (*Corylus avellana*). Annals of Applied Biology 163: 351-358.
- Myszka H., Bednarczyk D., Najder M., Kaca W. 2003. Synthesis and induction of apoptosis in B cell chronic leukemia by diosgenyl 2-amino-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside hydrochloride and its derivatives. Carbohydrate Research 338: 133-141.
- Panis B., Piette B., André E., Van den Houwe I., Swennen R. 2011. Droplet vitrification: The first generic cryopreservation protocol for organized plant tissues? Acta Horticulturae 908: 157-162.
- Paulet F., Engelmann F., Glaszmann J. C. 1993. Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids) using encapsulation/dehydration. Plant Cell Reports 12: 525-529.
- Pedro E. L., Arroyo-García R., Reed B. M., Revilla M. A. 2008. Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.). Cryobiology 57: 234-241.
- Plitta B. P., Michalak M., Kotlarski S., Chmielarz P. 2013. Kriogeniczne przechowywanie nasion. Sylwan 157 (10): 723-729.
- Plitta B. P., Michalak M., Naskręt-Barciszewska M. Z., Barciszewski J., Chmielarz P. 2014. DNA methylation of *Quercus robur* L. plumules following cryo-pretreatment and cryopreservation. Plant Cell Tissue and Organ Culture 117: 31-37.
- Rumińska-Lema L. 2005. Czy chryzantemy są chimerami? Owoce Warzywa Kwiaty 9: 46-47.
- 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.
- Sisunandar, Rival A., Turquay P., Samosir Y., Adkins S.W. 2010. Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos does not induce morphological, cytological or molecular changes in recovered seedlings. Planta 232: 435-447.
- Wu Y., Zhao Y., Engelmann F., Zhou M. 2001. Cryopreservation of kiwi shoot tips. CryoLetters 22: 277-284.
- Yang W. R., Zhang Q. X., Pan H. T., Sun M. 2010. *In vitro* regeneration of *Lilium tsingtauense* Gilg. and analysis of genetic variability in micropropagated plants using RAPD and ISSR techniques. Propagation Ornamental Plants 10: 59-66.
- Zemach A., McDaniel I. E., Silva P., Zilberman D. 2010. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. Science 328: 916-919.

SUMMARY

Cryopreservation – is it safe? Possible changes in cryostored plant genetic resources

Cryopreservation (storage in liquid nitrogen (LN), -196°C) is a technique that ensures safe, long-term conservation of plant species with recalcitrant seeds, vegetatively propagated species and biotechnology products such as somatic embryos, cell lines and genetically transformed material. The aim of cryostorage is to keep plant tissue in a safe way, which does not cause changes during storage at neither phenotypic, cytological and histological, biochemical, genetic nor epigenetic level. Preserved plant material should be characterized by identical features as non-stored. Most of presented examples of storage in LN were described as safe for plant material. However, some procedures like desiccation, cryoprotection and *in vitro* culture may cause injuries to stored genetic resources. Therefore, before cryostorage will be applied for long-term preservation it should be thoroughly assess if it does not cause any injuries in plant material.