



Krioprezerwacja zawiesin komórkowych wybranych gatunków z rodzaju *Gentiana*

Anna Mikuła, Jan J. Rybczyński

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

Cryopreservation of cell suspensions of selected *Gentiana*

Summary

Cryopreservation is recognised as the most efficient method of plant genome preservation and embryogenic potential of plant *in vitro* cultures with non-changed status. Because of the risk of biological degradation of tissue during freezing treatment and its various sensibility on the chilling stress, the individual treatment with cryoprotectance and parameters of the temperature decreasing is highly required.

In this presentation, following subjects will be discussed: 1) description of suspension cultures of various gentians, 2) cell pretreatments for surviving the stress of low temperature, 3) rearrangement of cell cytoplasm because of high sucrose concentrations, 4) the role of sucrose in the development of freezing tolerance and surviving of gentiana suspensions, 5) the effect of strong plasmolysis induced by 3 M glucose.

Key words:

Gentiana, cryopreservation, sugar, suspension culture, ultrastructure.

Adres do korespondencji

Anna Mikuła,
Ogród Botaniczny –
Centrum Zachowania
Różnorodności
Biologicznej,
Polska Akademia Nauk,
ul. Prawdziwka 2,
02-973 Warszawa;
e-mail:
obpan@ikp.atm.com.pl

1. Wstęp

Powszechnie stosowaną metodą zachowania materiału roślinnego jest przechowywanie nasion lub organów rozmnażania wegetatywnego. Skuteczniejszą metodą, umożliwiającą zachowanie zasobów genowych roślin w niezmienionym stanie przez nieokreślenie długi czas, jest krioprezerwacja (1). Opiera się ona

na odpowiednim odwodnieniu tkanki i doprowadzeniu jej do temperatury ciekłego azotu (-196°C), w której zatrzymane są wszystkie procesy zachodzące w komórce: fizjologiczne, biochemiczne i fizyczne. Z tego względu powszechnie wykorzystywana jest również do przechowywania materiału roślinnego pochodzącego z kultur *in vitro*. Kulturę przez krótki czas można utrzymywać w warunkach spowolnionego wzrostu, np. na zmodyfikowanej, uboższej pożywce, w obniżonej temperaturze, intensywności naświetlenia, stopniu natlenienia czy dostępie CO₂. Nieustanny wpływ zewnętrznych i wewnętrznych czynników, a zwłaszcza obecność roślinnych hormonów wzrostu, indukuje w tkance szereg niekorzystnych zmian. Chociaż hodowle niektórych gatunków można prowadzić przez wiele lat, występująca zmienność somaklonalna prowadzi do stopniowej utraty ich morfogenetycznych właściwości. Krioprezerwacja jest, jak się wydaje, odpowiednim sposobem przechowywania tkanki pochodzącej z kultur *in vitro* przez długi czas, z jednoczesnym utrzymaniem jej stabilności genetycznej, zachowaniem embriogennych właściwości i zdolności regeneracyjnych. Metody stosowane w celu ochrony tkanki wymagają indywidualnego modyfikowania, ze względu na odmienne predyspozycje gatunkowe do przetrzymywania stresu niskiej temperatury.

Celem opracowania jest omówienie problemów związanych z krioprezerwacją zawiesin komórkowych, na podstawie doświadczeń dotyczących kultur goryczek.

2. Kultury zawieszinowe *Gentiana* sp.

Gatunki należące do rodzaju *Gentiana* są powszechnie znanymi roślinami o dekoracyjnych kwiatach, rzadko spotykanej, zazwyczaj intensywnie niebieskiej barwy. Niektóre z nich są źródłem metabolitów wtórnych, wykorzystywanych do sporządzania specyfików ziołowych. Rozprzestrzenione są głównie w górskich regionach świata, najczęściej powyżej 1000 m n.p.m. Życie w ekstremalnych warunkach ogranicza ich okres wegetacji do krótkiego czasu (u niektórych nawet do 30 dni), a ich nasiona nie zawsze uzyskują pełną dojrzałość (2). Występujące zjawisko mikoryzy, duża wrażliwość goryczek na przesuszenie oraz odczyn gleby, bardzo utrudniają ich uprawę poza środowiskiem naturalnym. Wiele gatunków objęto całkowitą ochroną prawną, bądź wpisano na listę roślin zagrożonych, a jedna trzecia ze wszystkich opisanych goryczek to endemity. Utrudnione rozmnażanie tradycyjnymi metodami oraz nierentowne prowadzenie plantacji sprawia, że ubożeją naturalne stanowiska. Kultury *in vitro* otwierają nowe możliwości w rozmnażaniu goryczek oraz pozyskiwaniu metabolitów wtórnych. Umożliwiają także wykorzystanie technik biotechnologicznych do otrzymywania nowych odmian o ulepszonych cechach. Dotychczas regeneranty różnych gatunków goryczek pozyskiwane były w kulturach w większości drogą organogenezy (3). Z jednowęzłowych fragmentów pędów, pąków kątowych czy merystemów wierzchołkowych uzyskiwano średnio od 3 do 18 pędów z jednego eksplantatu. Hosokawa i wsp. (4) wprowadzając eksplantaty mieszańca (*G. scabra*

x *G. triflora*) WSP3 bezpośrednio do pożywki płynnej, otrzymywali średnio 150 sztuk pędów w 100 ml pożywki, bądź przeszło 2000 sztuk w fermentorze w 3 l pożywki. Generalnie jednak regeneracja roślin drogą organogenezy, jest dla większości badanych gatunków mało wydajna i wymaga stałego dostępu do źródła eksplantatów lub prowadzenia kultur aksenicznych (5). W porównaniu z tą metodą, somatyczna embriogeneza umożliwia otrzymanie dużej liczby regenerantów w stosunkowo krótkim czasie, a kultury zawiesinowe pozwalają na utrzymanie tego procesu przez długi okres. Somatyczną embriogenezę *G. cruciata*, *G. pannonica*, *G. tibetica* (6,7) oraz *G. kurroo* (dane nie publikowane) zaindukowano dzięki zastosowaniu ontogenetycznie młodszych tkanek w postaci fragmentów siewek. Stosując zarodki zygotyczne *G. punctata* izolowane z dojrzałych nasion, po raz pierwszy uzyskano somatyczną embriogenezę również u tego gatunku (8). Z embriogennej tkanki kalusowej wymienionych goryczek zaindukowano kultury zawiesinowe, które odznaczały się przez wiele lat dużym potencjałem regeneracyjnym (9-11).

Zawiesiny komórkowe, stanowiące skupisko pojedynczych komórek i różnej wielkości agregatów, w zależności od gatunku oraz składu pożywki mogą być charakteryzowane różnymi parametrami. Należą do nich m.in. wielkość agregatów, intensywność przyrostu tkanki, pH kultury, zużycie sacharozy oraz jonów makroelementów. Określają one dynamikę rozwoju tkanki. Najdogodniejszym układem, zarówno do badań, jak i do zsynchronizowanego pozyskiwania zarodków z zawiesiny, jest rozwój tkanki zgodny z cyklem auksynowym, opisanym w 1979 r. przez Wetherella (12) u marchwi. Funkcjonuje on w kulturach zawiesinowych wielu roślin, ale nie u goryczek. Cechą wspólną wszystkich badanych dotąd zawiesin goryczek jest zdolność do tworzenia globularnych zarodków somatycznych bezpośrednio w środowisku auksynowym kultury płynnej (11,13). Stwierdzono, że w młodszych zawiesinach np. 1-3-letnich *G. kurroo*, w tych warunkach, zarodki osiągają stadium liścieniowe (dane nie publikowane).

Zużycie z pożywki jonów amonowych i azotanowych przebiegało podobnie we wszystkich analizowanych kulturach (10). Zużywanie obu form azotu zachodziło równolegle, przy czym około czternastego dnia kultury, gdy z pożywki zostały całkowicie wykorzystane jony amonowe, zawiesiny wchodziły w fazę wzrostu stacjonarnego. Podobnie jak w kulturach innych roślin, również u goryczek obserwowano wahania pH, wynikające ze zmiennego stosunku obu form azotu (14,15). W przeciwieństwie do kultur innych gatunków, u goryczek obserwowano intensywne wykorzystywanie z pożywki sacharozy. W ciągu 12 h w kulturze *G. pannonica* i 24 h w zawiesinie *G. tibetica* następowało prawie całkowite jej zużycie (10). Tak szybkie pobieranie cukrów nie było dotychczas opisane w literaturze. Chromatograficznie (GC) wykazano niemalże całkowity brak sacharozy, glukozy i fruktozy w pożywce około drugiego dnia kultury, a następnie około 4-6. pojawienie się niewielkich ilości cukrów prostych. Sugerować to może, że sacharoza w kulturze goryczek jest nie tylko źródłem węgla, ale również pośrednio może być wykorzystywana do tworzenia metabolitów wtórnych – gencjopikrozydu, którego obecność w masie pro-

embriogennej (PEM) wykazano przy użyciu HPLC (10,16). Gencjopikrozyd w komórce akumulowany jest zwykle w wakuolach (17). Okresowe pojawianie się w pożywce glukozy można wytłumaczyć faktem, że ten irydoidowy glukozyd jest związkiem nietrwałym i łatwo ulega hydrolizie na glukozę i aglikon (18). Chromatograficznie stwierdzono w pożywce także obecność bliżej nieokreślonych związków o właściwościach zbliżonych do cukrów, co może sugerować wydzielanie przez agregaty komórkowe metabolitów wtórnych do pożywki, bądź pojawianie się tych związków w wyniku degradacji komórek (10).

Kultury zawiesinowe goryczek różnią się procentowym udziałem różnej wielkości agregatów komórkowych. W zawiesinach *G. cruciata*, a zwłaszcza *G. pannonica* formowały się bardzo duże agregaty, wielkości nawet $> 1000 \mu\text{m}$ (tab. 1). Starzejąca się (ośmioletnia) kultura *G. tibetica* oraz kultury *G. kurroo* i *G. punctata* były bardziej wyrównane i składały się głównie z małych agregatów wielkości $< 450 \mu\text{m}$.

Tabela 1

Charakterystyka kultur zawiesinowych goryczek pod względem wielkości agregatów komórkowych w 1 ml pożywki, w piątym dniu po pasażu (wyrażona w %)

Wielkość agregatów (μm)	<i>G. cruciata</i> liścieniowa (3-letnia)	<i>G. pannonica</i> liścieniowa (3-letnia)	<i>G. tibetica</i> (kultura 3-letnia) ¹	<i>G. tibetica</i> (kultura 3,5-letnia) ¹	<i>G. tibetica</i> (kultura 8-letnia)
agregaty < 70	npk ²	npk ²	npk ²	dużo pojedynczych	dużo pojedynczych
70-120	30,26 \pm 0,74	6,65 \pm 0,59	35,95 \pm 0,70	59,86 \pm 0,60	71,12 \pm 0,62
120-260	42,86 \pm 0,55	28,21 \pm 0,55	30,17 \pm 0,67	23,03 \pm 0,51	24,33 \pm 0,42
260-450	15,42 \pm 0,42	22,03 \pm 0,52	14,08 \pm 0,51	8,63 \pm 0,34	3,13 \pm 0,28
450-500	8,48 \pm 0,31	21,19 \pm 0,48	17,05 \pm 0,55	7,64 \pm 0,32	1,15 \pm 0,18
500-1000	2,89 \pm 0,08	14,52 \pm 0,12	2,76 \pm 0,24	0,84 \pm 0,11	0,27 \pm 0,05
> 1000	0,09 \pm 0,03	7,40 \pm 0,06	0	0	0

¹ Szerzej na ten temat por. (10).

² npk – nieliczne pojedyncze komórki.

Mikroskopowa analiza agregatów komórkowych poszczególnych zawiesin, prowadzonych w jednakowych warunkach kultury (10), wykazała różnice w ich strukturze. W agregatach 8-letniej zawiesiny *G. tibetica* komórki miały luźny układ, z łatwością oddzielały się od PEM-u, adaptowały się do samodzielnej egzystencji w pożywce i podejmowały podziały. Taki układ charakterystyczny był zarówno dla małych jak i większych struktur. W przeciwieństwie do kultury *G. tibetica*, komórki zawiesiny *G. pannonica* formowały bardzo zwarte, trudne do rozdzielania struktury, zielonkawożółtej barwy. Ta kultura zdecydowanie odbiegała zarówno wielkością, jak i fakturą agregatów od pozostałych badanych zawiesin. Agregaty *G. tibetica*, *G. cruciata*, *G. kurroo* i *G. punctata* bez względu na osiąganą przez nie wielkość, miały tendencję do rozpadań się na mniejsze.

Wieloletnie obserwacje i badania kultury zawiesinowej *G. tibetica* wykazały, że wraz z upływem czasu zwiększał się procentowy udział mniejszych agregatów (tab. 1). Jednocześnie stwierdzono stopniowe obniżanie się jej morfogenetycznych zdolności (dane nie publikowane). Podczas gdy z PEM-u pochodzącego z 3-letniej zawiesiny otrzymywano prawidłowo wykształcone zarodki somatyczne w stadium liścieniowym, a anomalie rozwojowe występowały sporadycznie (10), to z 7-letniego PEM-u tworzyły się głównie struktury zarodkopodobne, a obok nich powstawały również prawidłowo wykształcone zarodki (dane nie publikowane).

Zachowanie pierwotnego potencjału embriogenicznego oraz zdolności regeneracyjnych tkanki, a także utrzymanie jej stabilności genetycznej możliwe jest dzięki wprowadzeniu masy proembriogenicznej do ciekłego azotu.

3. Przygotowanie komórki do przetrwania stresu niskiej temperatury

Krioprezerwacja niesie ze sobą niebezpieczeństwo uszkodzenia komórek w czasie ich zamrażania bądź rozmrażania. Można ją postrzegać, jako proces poddawania materiału roślinnego specyficznemu wysuszeniu. Komórki roślinne tolerują odwodnienie w granicach 55-75% całej zawartości wody, bez narażenia ich na nieodwracalne uszkodzenia (19). Jednak w czasie zamrażania woda przyjmuje formę kryształów lodu. Tworzące się wewnątrz komórki, bądź w przestworach międzykomórkowych kryształy, powodują ich mechaniczne uszkodzenia, zagęszczanie soku komórkowego oraz rozrywanie błon w czasie głębokiej plazmolizy i deplazmolizy (20). Tym niekorzystnym zmianom można zapobiec stosując substancje kriochronne, niedopuszczające do uszkodzeń powodowanych bardzo niską temperaturą (1). Substancje te redukują ilość formującego się lodu, przyczyniają się do mniejszej utraty wody z komórki, zwiększając lepkość soku komórkowego obniżają temperaturę zamrażania wody (homogenne powstawania zarodków krystalizacji lodu), czyli temperaturę początku plazmolizy (19). Najczęściej wykorzystywane metody kriochrony materiału roślinnego to: stosowanie krioprotektantów, witrifikacja i kapsułkowanie – dehydratacja (1). Mrozowe uszkodzenia redukować można także, indukując naturalne mechanizmy obronne komórek, poprzez inkubację materiału roślinnego w podwyższonym stężeniu cukrów. Tolerancję na mrozowe uszkodzenia, można w tym zakresie osiągnąć doprowadzając komórki do plazmolizy (21,22), bądź alternatywnie, stymulując wewnątrzkomórkową akumulację węglowodanów i przebudowę cytoplazmy, nie dopuszczając do obkurczenia protoplastu (23-27). Możliwe jest także wykorzystanie ochronnej roli krioprotektantów, łącząc działanie poza- i wewnątrzkomórkowych substancji (28). Z jednej strony krioprotektanty nie wnika-jące do komórki (cukry, poliwinylpyrolidon, dekstran), redukując poziom jej uwodnienia doprowadzają do zagęszczenia soku komórkowego, obniżenia temperatury zamrażania roztworu i podwyższenia temperatury witrifikacji. Z drugiej strony substancje wnika-jące do komórki (DMSO, prolina, glicerol, mannitol, sorbitol),

zabezpieczają ją wielopoziomowo (20). Ograniczają zmianę pojemności wodnej komórki, obniżają temperaturę homogennego powstawania zarodków krystalizacji lodu oraz tempo wzrostu kryształów lodu, podwyższają temperaturę tworzenia się cytoplazmatycznego szkła – witrifikacji (19).

W naturze, większość bylin klimatu umiarkowanego wytwarza pewne systemy tolerancji na stres chłodu. Wynikają one z sezonowego oddziaływania na te rośliny niskich późnojesiennych i zimowych temperatur. Ich wzrost tolerancji na chłód jest skorelowany z różnymi modyfikacjami chemicznego składu cytozolu, np. akumulacją węglowodanów (29), zawartością specyficznych białek (30) i lipidów (31), a także z morfologicznymi zmianami w strukturze komórek (32,29). Hodowanie *in vitro* tkanki w pożywce z podwyższonym stężeniem sacharozy, może oddziaływać na komórki podobnie, jak stopniowo obniżająca się temperatura jesienią i zimą, będąca sygnałem do przemian, dzięki którym komórki zimozielonego liścia goryczki mogą przetrwać mrozy.

W pracy tej skupiono się głównie na długoterminowym wpływie podwyższonego stężenia sacharozy na cytoplazmę komórek pochodzących z kultur zawiesinowych goryczek oraz ich przeżywalność po przechowywaniu w ciekłym azocie. Wskazano na istnienie różnic gatunkowych, wyrażonych odmienną przeżywalnością tkanki po mrożeniu.

4. Przebudowa cytoplazmy komórek w podwyższonym stężeniu sacharozy

W zawiesinie *G. tibetica*, w której komórki agregatów charakteryzowały się luźnym układem, podniesienie w pożywce z 3 do 6 i 9% stężenia sacharozy, doprowadziło do zmniejszenia wielkości komórek. W obrębie tego samego agregatu występowały trzy grupy komórek z różną zawartością skrobi i wielkością amyloplastów. Obserwowano skupiska intensywnie dzielących się, małych komórek, prawie pozbawionych skrobi (I), grupy komórek zawierających mniejsze, lecz bardzo liczne (II) lub bardzo duże amyloplasty (III). Na poziomie ultrastruktury stwierdzono silne zagęszczenie cytoplazmy i rozbitcie zazwyczaj jednej, centralnie położonej wakuoli na wiele drobnych. Wielkość organelli komórkowych takich jak: mitochondria, struktury Golgiego i ciała lipidowe w pożywce z 9% sacharozą, ulegała znacznemu zmniejszeniu, podczas gdy rER było bardzo rozbudowane i tworzyło wielowarstwowe cysterny. Aktywnie produkowane przez struktury Golgiego pęcherzyki wakuolarne, przyczyniały się do pogrubiania ścian komórkowych. Podniesione stężenie sacharozy wpłynęło również na silne pofałdowanie plazmalemy.

W zawiesinie *G. pannonica* agregaty komórkowe (bez względu na ich wielkość), formowały zwarte struktury, z wyraźnie ukształtowaną jedno- lub wielowarstwową epidermą. Pod nią małe komórki, ze skrobią lub bez, przechodziły intensywne podziały. Komórki w głębi agregatów były duże, silnie zwakuolizowane, luźno ułożone, z dużymi przestworami międzykomórkowymi. W samym centrum często ule-

gały one lizie. Zastosowanie pożywki z wyższym stężeniem sacharozy spowodowało zwiększenie strefy komórek dzielących się, zmniejszenie ich wielkości i stopnia wakuolizacji oraz zredukowanie przestworów międzykomórkowych wewnątrz agregatu. Obserwowane na poziomie ultrastruktury zmiany były analogiczne jak u *G. tibetica*.

W większości drobnych agregatów komórkowych *G. kurroo* stwierdzono, podobnie jak u *G. pannonica*, obecność strefy komórek intensywnie dzielących się, a wewnątrz postępującą wakuolizację. Na zewnątrz agregatu komórki nie tworzyły jednak zwartej warstwy, jak u *G. pannonica*, lecz strefę komórek o charakterystycznym luźnym układzie, ulegających dyspersji pod wpływem wytrząsania. Podobnie jak u poprzednich gatunków, w pożywce z podwyższonym stężeniem sacharozy, obserwowano ograniczenie wielkości komórek i zredukowanie stopnia wakuolizacji.

Obserwowane w kulturach goryczek zmiany wywołane 4-tygodniowym wpływem podwyższonego ciśnienia osmotycznego, były podobne do zmian opisywanych przez Gnanapragasam i Vasilę (33) w kulturach zawiesinowych *Panicum maximum*. Autorzy ci stwierdzili, że już 3-dniowe traktowanie 6% mannitolem przyczynia się do zastąpienia dużych wakuol licznymi małymi, zajmującymi ostatecznie o przeszło połowę mniejszą powierzchnię komórki w stosunku do kontroli. Wskazują także na silne pofałdowanie błony komórkowej oraz formowanie się licznych wakuol w obrębie cystrn retikulum endoplazmatycznego. Hitmi i wsp. (23) stwierdzili, że już po 10 dniach przedtraktowania tkanki w pożywce z podwyższonym do 9% stężeniem sacharozy, następuje redukcja zawartości wody w komórce o 60%, a w 18% sacharozie o 75%. Dłuższe traktowanie nie zmienia ilości wody, ale wpływa na jej zawartość po rozmrożeniu. Dzięki wydłużonej do 30 dni prekulturze, w rozmrożonych komórkach zawartość wody była wyższa o 25% w stosunku do 10-dniowej kultury z 18% sacharozą, i o 55% wyższa w stosunku do 10-dniowej kultury z 3% sacharozą (23).

Innego typu zmiany w tkance obserwowano podczas radykalnego zadziałania osmoprotektantem. W badaniach Jitsuyama i wsp. (22) wykazano, że szok osmotyczny indukowany wysokim, 0,8 M stężeniem sacharozy, wywołał w komórkach *Asparagus officinalis* drastyczną plazmolizę i powstanie między ścianą, a cytoplazmą komórki dużych przestrzeni peryplazmatycznych. W przestrzeniach tych dochodziło do akumulacji cukrów, dzięki czemu w temperaturze -20°C jeszcze nie następowało tworzenie się kryształów lodu (21). W inkubowanych, przez 10 min 1 M roztworem glukozy, komórkach liścia kapusty, nie stwierdzono żadnych ultrastrukturalnych zmian w membranach plazmatycznych. Gromadzenie się osmofilnych lipidowych ziarnistości wzdłuż membran, obserwowali natomiast Gnanapragasam i Vasilę (33). Pojawiały się one w splazmolizowanych, martwych komórkach, poddanych uprzednio schładzaniu do temperatury -10°C . Świadczy to o utracie materiału budulcowego przez błonę komórkową, wynikającą z redukcji jej objętości podczas plazmolizy (20). W czasie deplazmolizy, niektóre rośliny, np. pszenica ozima (34) czy żyto ozime (35) potrafią odzyskiwać utracone przez błonę lipidy, u innych taka utrata materiału membran prowadzi do pęknięcia błon i uszkodzeń komórki. O zdol-

nościach komórek do naprawy uszkodzeń błon cytoplazmatycznych świadczy przemijający charakter wycieku elektrolitów, najsilniejszy tuż po rozmrożeniu komórek buraka cukrowego (36).

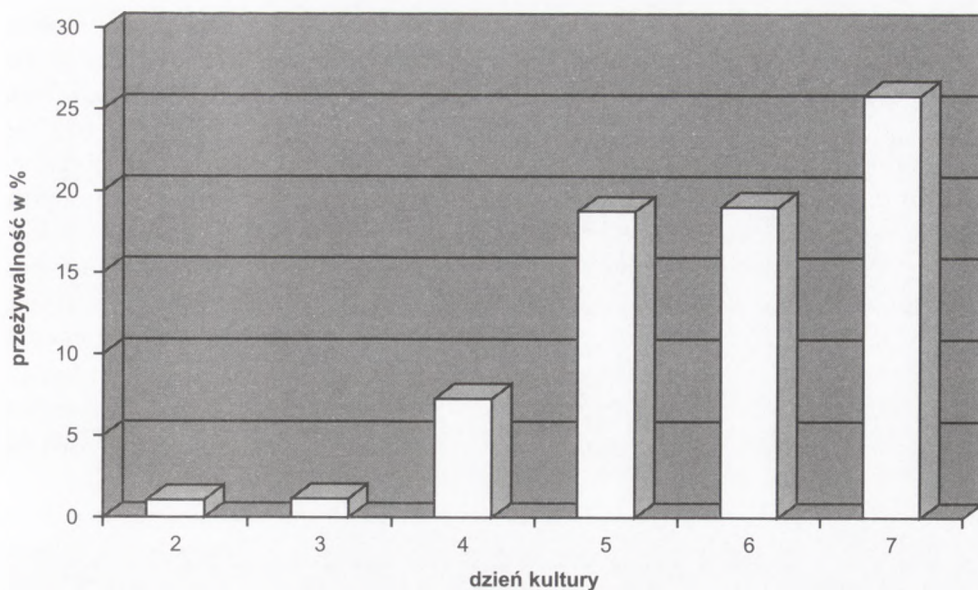
5. Rola sacharozy w tolerancji mrozowej zawiesin komórkowych goryczek

Zdolność danego gatunku do przetrwania niskich temperatur określają jego genetyczne uwarunkowania. Rośliny klimatu tropikalnego wykazują znacznie słabszą wewnętrzną tolerancję na niskie temperatury (25) niż klimatu umiarkowanego, czy rośliny zimozielone. Goryczki należą do tej grupy roślin, które w naturze wykazują pewne cechy przystosowawcze do przetrwania niskich temperatur (37). W zimozielonych liściach tych roślin stwierdzono silne zagęszczenie soku komórkowego i obecność zawiązków pochodzenia cukrowego. Kultury wyprowadzone z gatunków o większej tolerancji na stres niskiej temperatury, wykazują większe zdolności do przetrwania zabiegu krioprezerwacji. Dowiedziono (38), że linie komórkowe wyprowadzone z dwóch różnych odmian *Medicago sativa* L. różniących się odpornością na mróz, zachowywały genetyczne różnice w aklimatyzacji na chłód i mrozowej tolerancji. Badania prowadzone nad mrożeniem zawiesin komórkowych goryczek, jak się wydaje, mogą odzwierciedlać predyspozycje do przetrwania mrozu przez poszczególne gatunki. Jednakże zawiesiny komórkowe stanowią specyficzny materiał badawczy, w którym obok takich czynników jak: gatunek, typ tkanki, zawartość wody w eksplantacie oraz naturalna jego odporność na schładzanie, dodatkowo na przeżywalność po mrożeniu mają wpływ także moment pobrania tkanki po zmianie pożywki na świeżą oraz wielkość agregatów komórkowych.

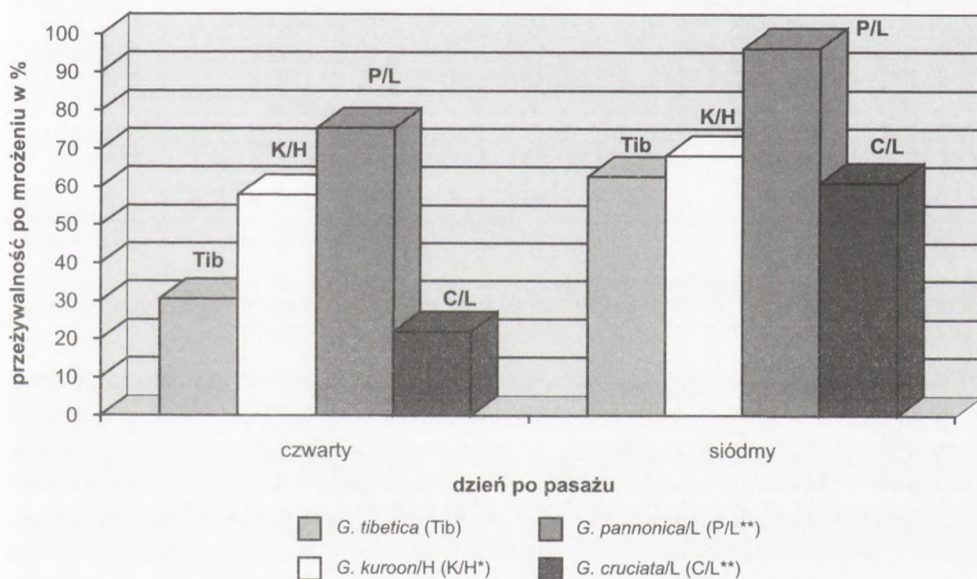
Faza wzrostu zawiesiny odgrywa ważną rolę w jej zdolnościach na przetrwanie mrożenia. W kulturze zawiesinowej *G. tibetica* stwierdzono, że przy zachowaniu 7-dniowych pasaży, najmniejszą przeżywalność (1%) tkanka wykazywała dzień po wymianie pożywki na świeżą, a największą, 25,85% siódmego dnia (rys. 1).

Podobne korelacje wykazano dla czterech badanych zawiesin komórkowych: *G. tibetica*, *G. kurroo*, *G. pannonica* i *G. cruciata*, których tkanki przez 4 tygodnie były inkubowane w pożywce z 9% sacharozą (rys. 2). Przeżywalność komórek osiągnęła w 7 dniu kultury 60% i jedynie w przypadku *G. pannonica* była ona bliska 100%.

Trudno precyzyjnie określić, w jakiej fazie wzrostu znajdują się siódmego dnia badane zawiesiny goryczek w pasażowanej co 7 dni kulturze. Zastosowanie skróconych pasaży okazuje się celowe dla zredukowania wrażliwych na mrożenie faz wzrostu. Dzięki temu w zawiesinie *Acer pseudoplatanus* pozbawiono komórki dużych wakuol (39). Jednoznacznie nie można wskazać najbardziej optymalnej dla przeżywalności tkanki fazy wzrostu zawiesiny, gdyż dla różnych gatunków może być ona różna. Dane literaturowe wskazują, że największą przeżywalność podczas mrożenia wykazuje tkanka będąca w fazie wzrostu logarytmicznego. Jej typowo merystematyczne komórki charakteryzują się wówczas gęstą cytoplazmą i względnie małą za-



Rys. 1. Przeżywalność tkanki *G. tibetica* w zależności od dnia po pasażu (tkanka pochodzi z pożywki z 6% sacharozą). Określona testem TTC bezpośrednio po rozmrożeniu.



Rys. 2. Przeżywalność tkanki (po 4-tygodniowej preinkubacji w pożywce z 9% sacharozą) w czwartym i siódmym dniu po pasażu. Określona testem TTC bezpośrednio po rozmrożeniu.

* H zawiesina pochodzenia hipokotylowego

** L zawiesina pochodzenia liściennego

wartością wody, co predestynuje je do przetrwania stresu niskiej temperatury (27,40,41). Joshi i Teng (42) wykazali 86,5% przeżywalność tkanki *Panax ginseng* w fazie spoczynkowej (5 dzień) oraz 62% w fazie stacjonarnej (19 dzień). Zawiesina *Oryza sativa* jest przykładem kultury, której komórki wykazują większą tolerancję na stres niskiej temperatury w fazie wzrostu wykładniczego i opóźnionego, niż stacjonarnego i fazy spoczynkowej (43). Najczęściej jednak zamrażane w fazie wzrostu opóźnionego i stacjonarnego komórki także wykazują obniżoną żywotność (24,44-46).

Tkanek zawiesinową badanych goryczek wprowadzano do ciekłego azotu bez zastosowania dodatkowych substancji kriochronnych (tab. 2). Wykazywała ona, w zależności od gatunku, różną zdolność do przetrwania stresu niskiej temperatury. Podczas gdy zawiesiny *G. tibetica*, *G. punctata* i *G. kurroo* pochodzące ze standardowej pożywki z 3% sacharozą, przeżywały zaledwie w około 1%, to PEM *G. pannonica* aż w 42,94%. Przeżywalność niczym nie traktowanej tkanki *G. cruciata* wahała się od 11,91 do 21,8% w zależności od pochodzenia organowego tej kultury.

Tabela 2

Przeżywalność PEM-u (w %) różnych gatunków goryczek w zależności od stężenia sacharozy w pożywce i programu schładzania (program od +20°C co 1°C do -20°C lub -40°C)¹

Gatunek	3% sacharoza		6% sacharoza		9% sacharoza
	do -20°C	do -40°C	do -20°C	do -40°C	do -40°C
<i>G. tibetica</i>	0,60 ± 0,05	1,37 ± 0,18	3,15 ± 0,11	25,85 ± 1,69	62,83 ± 0,76
<i>G. punctata</i>	0,78 ± 0,1	1,75 ± 0,05	0,64 ± 0,07	5,36 ± 0,14	30,14 ± 0,91
<i>G. kurroo</i> /H*	0,92 ± 0,1	1,10 ± 0,11	8,40 ± 0,09	39,88 ± 1,22	57,89 ± 0,62
<i>G. pannonica</i> /L**	18,82 ± 2,77	42,94 ± 1,69	18,30 ± 3,02	59,44 ± 4,41	96,31 ± 4,70
				agregaty mniejsze 50,87 ± 5,16	
				agregaty duże 100,00 ± 26,41	
<i>G. cruciata</i> /L**	0,97 ± 0,72	11,91 ± 0,89	1,15 ± 0,58	27,97 ± 0,79	61,05 ± 0,70
<i>G. cruciata</i> /H*	4,83 ± 1,01	21,80 ± 0,94			
<i>G. cruciata</i> /K***	1,83 ± 0,98	12,46 ± 1,34	5,07 ± 0,97	22,89 ± 2,70	

¹ barwienie TTC przeprowadzono bezpośrednio po rozmrożeniu tkanki

zawiesiny pochodzenia *H – hipokotylowego, **L – liściennego, ***K – korzeniowego

Podniesienie stężenia sacharozy w pożywce z 3 do 9%, spowodowało takie przebudowanie struktury agregatów oraz ultrastruktury ich komórek, które przyczyniło się do zwiększenia przeżywalności wszystkich badanych zawiesin. U *G. tibetica*, i *G. kurroo* wzrosła ona z 1 do około 60%, a u *G. pannonica* z 42,94 do niemalże 100% (tab. 2). W badaniach stwierdzono znaczący wpływ temperatury progowej, do poziomu której stosowano powolne schładzanie tkanki. Większą tolerancję na niską temperaturę wykazywały komórki przy schładzaniu ich co 1°C na minutę do temperatury -40°C niż do -20°C. Przeżywalność tkanki po mrożeniu zależała w dużym stopniu od wielkości agregatów komórkowych. Tworzące duże agregaty zawiesiny *G. pannonica* i *G. cruciata* wykazywały stosunkowo wysoką przeżywalność nawet bez

zastosowania ochrony. Agregaty komórkowe *G. pannonica* o ciężarze około 25-30 mg, cechowały się 100% przeżywalnością po mrożeniu, w porównaniu z mniejszymi (tab. 2). Zawiesiny składające się w dużym procencie z drobnych agregatów (tab. 1), wykazywały mniejszą tolerancję na uszkodzenia mrozowe.

Otrzymane wyniki są trudne do wytłumaczenia. Komórki w małych agregatach są bardziej jednorodne, zwykle intensywnie dzielące się. Wewnątrz dużych agregatów znajdują się komórki w znacznym stopniu zwakuolizowane, a merystematyczne występują zwykle na ich obrzeżach (13). Stopień zróżnicowania komórek wewnątrz dużych agregatów powinien być czynnikiem negatywnie wpływającym na przeżywalność tkanki.

6. Wpływ plazmolizy na przeżywalność tkanki po mrożeniu

Podczas inkubacji komórek w podwyższonym stężeniu sacharozy, dochodzi do syntetyzowania przez nie, endogennych substancji podnoszących tolerancję na niskie temperatury. Stres osmotyczny i/lub stres odwodnienia indukuje ekspresję specyficznych genów zwanych COR (*cold regulation genes*) odpowiadających za syntezę białek (47) z grupy dehydryn lub podobnych (22), silnie związanych z odpornością na mróz (22,48). Thomashow sugeruje, że białka te mogą odgrywać rolę w stabilizowaniu biologicznych makromolekuł (48). Są silnie hydrofilne, wiążące wodę w czasie stresu osmotycznego, co tłumaczyć może ich pojawianie się wraz z początkiem dehydratacji i niwelowanie uszkodzeń z nią związanych (22). Przy czym, jak wykazano (22), poziom białek wzrastał drastycznie po około 12 godzinach od zastosowania czynnika stresowego (0,8 M sacharoza), a następnie około dziesiątego dnia obniżał się do poziomu wyjściowego.

W związku z tym w naszych badaniach prawdopodobnie nie czynnik stresowy jest przyczyną wzrostu przeżywalności po mrożeniu. Tkanka po pierwszym stresie zmiany stężenia osmotycznego w pożywce, zaadaptowała się do nowych warunków kultury, przebudowując swoją cytoplazmę. Stale podwyższone wewnątrzkomórkowe ciśnienie osmotyczne, mogło być bodźcem do syntetyzowania niskocząsteczkowych, endogennych substancji, np. aminokwasów: proliny (23), waliny, glicyny oraz węglowodanów: sacharozy, fruktozy, glukozy (22,23) i skrobi (23,38), a także ABA (23). Substancje te działają kriochronnie poprzez obniżanie temperatury zamarzania wody, stabilizację błon, ochronę struktury białek budulcowych i enzymatycznych przed denaturacją. Dodatkowo, zwiększenie stężenia cukrów w pożywce, stymuluje w kulturach zawiesinowych niektórych roślin, produkcję metabolitów wtórnych (49,50), co może odgrywać również ważną rolę w badaniach nad roślinami z rodzaju *Gentiana*. O dużym prawdopodobieństwie pojawiania się w komórkach goryczek, w warunkach stresowych, endogennych substancji świadczyć może fakt zwiększenia przeżywalności mrożonej tkanki, uprzednio poddanej plazmolizie. Potraktowanie komórek *G. tibetica* i *G. kurroo* roztworem 3 M glukozy (przez 10 min)

pozwoiło na podniesienie przeżywalności z okoo 1% do odpowiednio 37,2 i 76,86% (tab. 3).

Tabela 3

Wpływ plazmolizy na przeżywalność komórek *G. tibetica* i *G. kurroo* po przechowywaniu ich w temperaturze -196°C. Przeżywalność badano bezpośrednio po rozmrozeniu tkanki za pomoca testu TTC

Gatunek	Przeżywalność bezpośrednio po rozmrozeniu tkanki (%)	
	bez kriochrony	po plazmolizie 3 M glukoza
<i>G. tibetica</i>	1,37 ± 0,18	37,20 ± 2,95
<i>G. kurroo</i> /H	1,1 ± 0,11	76,86 ± 6,37

7. Podsumowanie

Tolerancja mrozowych uszkodzen, wyrazona odmienna przeżywalnością po mrozeniu, moze wynikać ze zróznicowanej odporności komórek na odwodnienie. Niższa odporność uniemożliwia przygotowanie tkanki do pomyslnego przetrwania zamrazania, bądź wymaga bardziej precyzyjnego dobierania czynników kriochronnych. W pracy przedyskutowano wiele zagadnien związanych z typem mrozonego materiału roslinnego, możliwościami ingerencji w przebudowę cytoplazmy komórki roslinnej oraz czynnikami stosowanymi do podnoszenia mrozowej tolerancji.

Praca finansowana przez KBN grant nr 3P0403723.

Literatura

1. Kartha K. K., (1985), *Cryopreservation of plant cells and organs*, CRC Press Inc., Boca Raton Florida, 1-276.
2. Yuan Y.-M., Küpfer P., Doyle J., (1996), *Am. J. of Bot.*, 83, 641-652.
3. Mięka A., Rybczyński J., (1999), *Biotechnologia*, 4, 1-16.
4. Hosokawa K., Oikawa Y., Yamamura S., (1998), *Plant Cell Rep.*, 17, 747-751.
5. Takahata Y., Jomori H., (1989), *Plant Tiss. Cult. Lett.*, 6, 19-21.
6. Mięka A., Wesołowska M., Kapusta J., Skrzypczak L., Rybczyński J., (1996b), *Acta Soc. Bot. Pol.*, 65, 47-51.
7. Mięka A., Rybczyński J., (2001), *Acta Physiol. Plant.*, 23, 15-25.
8. Mięka A., Tykarska T., Zielińska M., Rybczyński J., Kuraś M., (2000), *IX. Ogólnopolska Konferencja Kultur in vitro i Biotechnologii Roślin „Modyfikowanie Genomu Roślin”*, Gdańsk-Sobieszewo (10-13.09.), 115.
9. Mięka A., Tykarska T., Kuraś M., Iwanowska A., Rybczyński J., (1996a), *Proceedings International Symposium. Breeding research on medicinal and aromatic plants*, (June 30-July 4), Quedlinburg, Germany, 290-295.
10. Mięka A., (1998), *Embriogeniczny charakter kultur in vitro wybranych gatunków z rodzaju Gentiana*, praca doktorska, Biblioteka Ogród Botaniczny CZRB PAN, 1-136.
11. Mięka A., Skierski J., Rybczyński J. J., (2002), *Acta Physiol. Plant.*, 24, 311-322.

12. Halperin W., (1995), in: *In vitro embryogenesis in plants*, Ed. Thorpe T. A., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 1-16.
13. Mikula A., Rybczyński J., Tykarska T., Kuraś M., (2001), *Biol. Bull. of Poznań*, 38, 47-53.
14. McDonald K. A., Jackman A. P., (1989), *Plant Cell Rep.*, 8, 455-458.
15. Martin S. M., Rose D., (1976), *Can. J. Bot.*, 54, 1264-1270.
16. Kamińska D., Wesolowska M., Króliczak P., Mikula A., (1996), *44th Annual Congress on Medicinal Plant Research*. Book of Abstracts, Prague 93-94.
17. Keller F., (1985), *J. Plant Physiol.*, 122, 473-476.
18. Strzelecka H., Kamińska J., Kowalski J., Malinowski J., Walewska E., (1987), *Chemiczne metody badań roślinnych surowców leczniczych*, PZWL, Warszawa, 287-296.
19. Chmielarz P., (1998), *Reakcja roślin na niskie temperatury*, Wyd. Z. Bartkowiak, Instytut Dendrologii PAN, Poznań 1-48.
20. Meryman H. T., Williams R. J., (1985), in: *Cryopreservation of plant cells and organs*, Ed. Kartha K. K., CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 13-48.
21. Jitsuyama Y., Suzuki T., Harada T., Fujikawa S., (1997), *Cryo-Letters*, 18, 33-44.
22. Jitsuyama Y., Suzuki T., Harada T., Fujikawa S., (2002), *Cryo-Letters*, 23, 103-112.
23. Hitmi A., Coudret A., Barthomeuf C., Sallanon, H., (1999), *Cryo-Letters*, 20, 45-54.
24. Panis B., Swennen R., (1995), *Cryopreservation of gerplasm of banana and plantain (Musa species)*. Ed. Bajaj Y. P. S., in: *Biotechnology in agriculture and forestry 32. Cryopreservation of plant germplasm I*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 381-397.
25. Panis B., Strosse H., van der Hende S., Swennen R., (2002), *Cryo-Letters*, 23, 375-384.
26. Travert S., Valerio L., Fouraste I., Boudet A. M., Teulieres C., (1997), *Plant Physiol.*, 111, 313-327.
27. Zhang Y-X., Wang J-H., Bian H-W., Zhu M-Y., (2001), *Cryo-Letters*, 22, 221-228.
28. Martínez-Montero M. E., González-Arno M. T., Borroto-Nordelo C., Puentes-Díaz C., Engelmann F., (1998), *Cryo-Letters*, 19, 171-176.
29. Sauter J. J., Wisniewski M., Witt W., (1996), *J. Plant Physiol.*, 149, 451-461.
30. Arora R., Wisniewski M. E., (1994), *Plant Physiol.*, 105, 95-101.
31. Uemura M., Steponkus P. L., (1994), *Plant Physiol.*, 104, 479-496.
32. Pomeroy M. K., Siminovitich D., (1970), *Can. J. Bot.*, 49, 787-795.
33. Gnanapragasam S., Vasil I. K., (1992), *Plant Cell Rep.*, 11, 169-174.
34. Williams R. J., Hope J. H., (1981), *Cryobiology*, 18, 133.
35. Singh J., (1979), *Protoplasma*, 98, 329-341.
36. Martínez-Montero M. E., Mora N., Quiñones J., González-Arno M. T., Engelman F., Lorenzo J. C., (2002), *Cryo-Letters*, 23, 237-244.
37. Radwańska-Paryska Z., (1953), *Zielony Świat Tatr*, Nasza Księgarnia, Warszawa.
38. Kalengamaliro N. E., Gana J. A., Cunningham S. M., Volenec J. J., (2000), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 61, 143-151.
39. Whitters L. A., Street H. E., (1977), *Physiol. Plant.*, 39, 171-178.
40. Whitters L. A., (1985), in: *Cryopreservation of plant cells and organs*, Ed. Kartha K. K., CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 243-267.
41. Jian L. C., Sun D. L., Sun L. H., (1987), in: *Plant cold hardiness*, Ed. Li P. H., Liss, New York, 323-337.
42. Joshi A., Teng W. L., (2000), *Plant Cell Rep.*, 19, 971-977.
43. Sala F., Cella R., Rollo F., (1979), *Physiol. Plant.*, 45, 170-176.
44. Sugawara Y., Sakai A., (1974), *Plant Physiol.*, 54, 722-724.
45. Whitters L. A., (1990), in: *Plant Cell and Tissue Culture*, Ed. Pollard J. W., Walker J. M., vol. 6, 39-48.
46. Yoshida S., Hattanda Y., Suyama T., (1993), *Plant Cell Physiol.*, 34, 673-679.
47. Xu D., Duan X., Wang B., Ho T-H.D., Wu R., (1996), *Plant Physiol.*, 110, 249-257.
48. Thomashow M. F., (1998), *Plant Physiol.*, 118, 1-7.
49. Hitmi A., Sallanon, H., Barthomeuf C., (1997), *Plant Cell Rep.*, 17, 60-64.
50. Mori T., Sakurai M., (1994), *J. Food Sci.*, 59, 588-593.