

UDK 588.7:582.57(497.11+470.311)
Прегледни рад

АЛЕКСАНДР С. ПОПОВ, ЛЮДМИЛА А. ВОЛКОВА,
ЛЮБИНКА ЧУЛАФИЧ¹

КРИССОХРАНЕНИЕ ГЕНОФОНДА РАСТЕНИЙ И ТКАНЕЙ *IN VITRO* DIOSCOREA BALCANICA И D. CAUCASICA

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской Академии
Наук, Москва, Россия

¹Институт ботаники Биологического факультета, Белград, Югославия

Popov, A.S., Vokova, L.A., Ćulafić, Lj. (1995): *Cryopreservation of in vitro plants and plant tissue genofond.* – Glasnik Instituta za botaniku i botaničke baške Univerziteta u Beogradu, Tom XXIX, 1 - 8.

Cryopreservation of plant tissues (meristem, organogenic and embryogenic calli) provides their storage at -196°C (liquid nitrogen) for indefinitely long time.

At present a cryobank of Timiryazev Institute of Plant Physiology, Moscow (Russia) includes 23 lines of 15 plant species, which stem meristem were successfully *in vitro* cultured upon a long time cryopreservation.

The calli of the endemo-relict species *Dioscorea balcanica* Košanin and *D. caucasica* Lipsky are also maintained in liquid nitrogen in the above cryo-bank. They were introduced into a culture at the Institute for Biological Research, Belgrade (Yugoslavia). Dimethyl sulfoxide (DMSO, 7%) and trehalose were used as cryoprotectors applying freezing programme of EPK (Russia) at the rate of 0,33°C/min to -30°C, 10°C/min to -60°C and after that the ampules containing frozen tissue were rapidly

dipped into the liquid nitrogen. After several months of storage at -196°C , organogenic and embryogenic calli were thawed in a water bath at 40°C and further culture under *in vitro* conditions using the corresponding nutrient media for plant regeneration. No differences in growth between these samples and cultures permanently grown at 25°C were observed.

This method is an indispensable part of a procedure for the preservation of rare and endemic plant species through *in vitro* culture.

Key words: *Dioscorea caucasica* Lipsky, *Dioscorea balcanica* Košanin, cryopreservation, tissue culture, plant regeneration.

Ključne reči: *Dioscorea caucasica* Lipsky, *Dioscorea balcanica* Košanin, kriokonzervacija, kultura tkiva, regeneracija biljaka.

В условиях неограниченного роста потребностей человечества и ухудшения экологической обстановки уже давно понята опасность, угрожающая генетическим ресурсам растений: культурных, лекарственных, исчезающих, эндемичных. Традиционные способы хранения этих ресурсов недостаточны. Культуры апексов побегов *in vitro* сохраняют генотипы, а культуры клеток и тканей могут сохранить полезные части генома, регенерировать растения иногда даже через 2-3 года, но генетически нестабильны. Поддержание таких коллекций неэкономично.

Наиболее надежным по генетической стабильности и неограниченным по длительности способом хранения генофонда является криосохранение. Чтобы избежать губительных перестроек кристаллов льда температуры должны быть ниже -130°C , что удобно обеспечивать с помощью жидкого азота (-196°C).

Проблему криосохранения генофонда растений легче всего решать путем глубокого замораживания семян и пыльцы, то есть достаточно сухих объектов. Криобанки семян уже существуют, в том числе и в Институте физиологии растений РАН в Москве.

Но совсем иная ситуация, если надо полностью сохранить данный генотип, как в случае материнских и гибридных форм и растений, размножаемых только вегетативно или имеющих рекальцитратные семена, которые не могут быть высушены без потери жизнеспособности. Поэтому наиболее универсальный способ криосохранения генофонда - глубокое замораживание апексов побегов и эмбрионов. Кроме того, для научных, промышленных и патентных целей необходимо долговременное хранение клеточных штаммов *in vitro*.

Во всех таких случаях мы имеем дело с паренхимными зрелыми клетками растений, специфика которых, как и клеток *in vitro* - большие размеры, сильная вакуолизация, обилие воды - создает значительные трудности для процедуры криосохранения. Следовательно, исследования криорезистентности клеток растений *in vitro* являются важнейшими для проблемы криосохранения.

МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЙ КЛЕТОК

Ниже приведены некоторые литературные и наши данные о механизмах криорезистентности клеток растений.

Прежде всего надо избежать роста внутри клеток кристаллов льда больших $0.1\ \mu\text{m}$, которые разрушают структуры клетки. То есть нужно значительно уменьшить объем возможного образования льда, значит необ-

ходима серьезная дегидратация. Но, с другой стороны, такая дегидратация вызывает очень сильное сжатие протопласта, которое, если действует достаточно долго, тоже повреждает клетку.

Процедура криосохранения клеток и апексов состоит из ряда этапов, начиная с подготовки (предварительное культивирование в специальных условиях) и кончая рекультивированием после оттаивания и регенерацией растений. Важнейшее значение имеет этап замораживания. На каждом этапе механизмы криорезистентности имеют свою специфику, а успех определяется их интегрированным взаимодействием.

На этапе подготовки мы сначала использовали холодное закаливание, как наиболее естественный процесс повышения морозостойкости зимующих растений умеренного климата. Его мы применили для клеточных суспензионных культур *Panax ginzeng* (Попов *et al.*, 1982), мутантные штаммы которого имеют недостаточную исходную криорезистентность. На клетках штамма Ж-2 было проведено закаливание в течение 3 недель как с добавлением (до 20%), так и без добавления сахарозы в среду (Федоровский *et al.*, 1993). Выживаемость после жидкого азота увеличивалась в процессе закалки почти в 3 раза, но только при добавлении сахарозы. Отношение сухого веса к сырому также увеличивалось, но гораздо меньше - на 60%. Без добавления сахарозы - никакого увеличения не было. Уровень внутриклеточных растворимых сахаров возрастал на 70% при добавлении сахарозы, а без добавления, наоборот, уменьшался: по-видимому сахара усиленно расходовались на поддержание метаболизма и жизне способности клеток при сниженной до 4°C температуре.

Следовательно, 1 - увеличение выживаемости в процессе закаливания требует обязательного добавления сахарозы и связано с ростом сухого вещества и внутриклеточных сахаров. 2 - однако, этот рост существенно меньше, чем увеличение выживаемости и, поэтому, значение закаливания для криорезистентности не исчерпывается увеличением сахаров. По-видимому, существуют и другие механизмы.

Для двух более теплолюбивых женьшеней: *P. quinquefolius* и *P. japonicus* закаливание было неэффективным и для них применили предварительное культивирование с маннитолом, что всегда приводило к возрастанию количества сухого вещества в клетках (то есть к дегидратации), но не всегда - к увеличению сахаров.

Иной способ подготовки был применен для клеток *Dioscorea deltoidea*, чей исходный, „дикий” штамм Д-1 имел совершенно недостаточную криорезистентность и его предварительно культивировали с добавлением низких концентраций некоторых аминокислот (Волкова *et al.*, 1982; 1984). Такая подготовка значительно увеличивала выживаемость после жидкого азота и приводила к накоплению в этих клетках сахаров в соответствии с эффективностью данной аминокислоты. Известно, что сахара, связывая воду, являются одними из важнейших веществ клеток, определяющими их водоудерживающую способность (Самыгин, 1974). Их увеличение, следовательно, уменьшает сжатие протопласта во время необходимой и неизбежной сильной дегидратации. Этот механизм защиты обнаружен давно как один из важных компонентов холодного закаливания (Туманов, 1979) и работает в цитоплазме.

Максимальное накопление сахаров в клетках Д-1 было примерно в 2 раза, а выживаемость возрастала в 5-6 раз: с 5-6 до 30% (при предкультивировании с аспарагином), то есть существенно больше. Что также свидетельствует, как и в случае клеток женьшеня, о действии каких-то других, кроме накопления сахаров, механизмов увеличения криорезистентности.

Для проверки этого предположения мы использовали также другой способ подготовки клеток *Dioscorea deltoidea* и *Medicago sativa* штаммов Д-1 и Л-1, соответственно: инкубацию при 10°C в течение 20-24 часов (Попов *et al.*, 1991). На клетках двух столь разных видов было показано увеличение криорезистентности в результате такой инкубации в 2-3 раза, причем для *D. deltoidea* - на двух очень разных по своей исходной устойчивости штаммах: Д-1 и мутантном ДМ-0,5. Самое интересное - это синергизм двух способов подготовки: оказалось, что инкубация при 10°C усиливала влияние предкультивирования с аспарагином и выживаемость клеток обеих штаммов достигала 50-54% (около 2/3 от контроля: исходная жизне-способность культур клеток *D. deltoidea in vitro* примерно 70-75%).

Следовательно, механизмы действия этих способов подготовки различны, что подтвердили результаты определения сахаров после инкубации суспензий штамма Д-1, так как никакой разницы с контролем не было. Количество растворимых внутриклеточных сахаров было 61.6 и 60.8 µg/ml для контрольной и охлажденной культур соответственно в первом субкультивировании и 54.9 и 54.1 µg/ml - во втором (через несколько месяцев). Значит, инкубация при 10°C в течение суток не является закаливанием в узком смысле, как понимал этот процесс Туманов, а запускает какой-то другой механизм увеличения криорезистентности.

Вероятно этот механизм связан с изменениями клеточной мембраны, которая является главной мишенью при замораживании (Steponkus, 1984; Попов, 1993). Интересно, что культивирование клеток *Rauwolfia serpentina* при 10°C увеличивало насыщенность липидов и текучесть плазмалеммы (Yamada *et al.*, 1980). Фундаментальное изучение процессов холодовой адаптации растений *Secale cereale* cv. Рута на изолированных протопластах позволило Степонкусу и соавторам обосновать существование некоторых механизмов гибели клеток при замораживании вследствие повреждения клеточной мембраны. Первый - это действие внутриклеточного льда. Его можно избежать, если обеспечить достаточную дегидратацию тем или иным способом: замораживанием в режиме „ветрификации” (быстрое осмотическое отнятие воды за счет сверхвысокой концентрации раствора криопротектантов), подсушиванием в потоке стерильного воздуха (оба эти способа сопровождаются быстрым замораживанием) или медленным замораживанием с инициацией кристаллизации раствора (Бутенко, Попов *et al.*, 1983; Кеefe *et al.*, 1984). При использовании последнего способа, криомикроскопа и раствора диметилсульфоксида (ДМСО) мы наблюдали клетки *Dioscorea deltoidea* Д-1 без льда вплоть до -27°C (Волкова *et al.*, 1984), что косвенно подтверждает витрификацию (переход воды в аморфное твердое состояние) цитоплазмы и при медленном замораживании в присутствии ДМСО. Но именно сильная дегидратация приводит к самому важному механизму гибели клеток растений вследствие перехода липидов клеточной мембраны из ламеллярной в гексагональную инвертированную фазу с образованием мицелл вместо бислоя

(Steponkus, 1984). Этот переход происходит постепенно, приводя к деструкции плазмалеммы, и клетка погибает через некоторое время в период наибольшего сжатия.

Однако, выводы Степонкуса были сформулированы в результате опытов только на одном сорте одного вида. Поэтому необходимо было убедиться в их справедливости для клеток растений других видов. Мы разработали новый флуориметрический метод, однозначно определяющий (при наличии соответствующих контролей и строго стандартной постановке), процент клеток с серьезными, деструктивными повреждениями клеточной мембраны (Попов *et al.*, 1992).

С помощью этого метода мы сопоставили действие замораживания по нашей программе с влиянием медленного сжатия протопластов клеток при 2°C в растворах с сильной осмотичностью, соответствующей той, которая возникает при -30, -40°C (Федоровский *et al.*, 1992; 1993). На 5 клеточных штаммах, принадлежащих столь разным видам, как *Panax ginseng* C.A. Mey и *Dioscorea deltoidea* Wall., и отличающихся по своей исходной криорезистентности, была показана очень близкая корреляция между крио- и осморезистентностью. Значит, деструктивные повреждения клеточной мембраны определяются не низкой температурой, а исключительно дегидратацией.

ПРАКТИЧЕСКЕ ДОСТИЖЕНИЯ

В практическом плане в Институте физиологии растений в Москве для культур клеток и апексов *in vitro* были разработаны методы подготовки к криосохранению, способ и автоматическое устройство для инициации кристаллизации раствора криопротектантов при медленном замораживании и рекультивировании; 23 клеточных штамма 15 видов возобновили рост после жидкого азота и сохранили все свои основные свойства; 17 штаммов хранятся постоянно и их восстанавливают в растущем состоянии, когда они необходимы. Меристемы *Solanum tuberosum*, *Digitalis lanata*, *Chamomilla recutita*, 22 сортов *Fragaria x ananasa*, клетки моркови и картофеля регенерировали растения.

КРИОСОХРАНЕНИЕ *Dioscorea balcanica* и *D. caucasica*

Изложенные выше и другие наши исследования послужили исходной базой для разработки криосохранения редких эндемичных видов рода *Dioscorea*: *D. balcanica* Košanin и *D. caucasica* Lipsky, культивирование *in vitro* каллусных тканей которых с последующей регенерацией растений и микроклональное размножение было разработано в Институте биологических исследований С. Станковича в Белграде (Грубишич, Чулафич, Боевич-Цветич, 1991). Грозящее полное исчезновение этих видов является, к сожалению, ярким примером скорейшей необходимости использовать все средства - и традиционные, и нетрадиционные - для спасения и их генофонда, и их самих. Их клеточные штаммы *in vitro* представляют интерес также и для биотехнологии. Первые опыты, показавшие возобновление роста органогенных каллусных тканей данных видов после криосохранения, уже опубликованы (Чулафич *et al.*, 1994). Там же приведены подробности методики, включавшей следующие основные моменты.



Расения регенерированные из органогенного каллуса пересажены в почву в оранжереи.

а. - *Dioscorea balcanica*

б. - *Dioscorea caucasica*

Органогенный каллус брали через 3-4 недели после пересадки, когда он содержал наибольшее число зеленых зачатков почек, измельчали, охлаждали на льду и постепенно добавляли холодный раствор криопротектантов. В предварительных опытах наилучшие результаты были получены со смесью 7% ДМСО и 5% трегалозы, поэтому в настоящей работе использовали именно этот раствор. Эту суспензию встряхивали 5 мин и переносили в ампулы, которые выдерживали 1-1.5 часа при 4-6°C и помещали в камеру программного замораживателя растительных клеток ЗРК-I (СССР), когда температура в ней снижалась до 0-4°. При температуре в ампулах -4.4°C автоматически происходила инициация кристаллизации раствора в ампулах и последующая стабилизация температуры в течение 20 мин. Дальнейшее замораживание шло со скоростью 0.33°C/мин до -30°, - 10.00°C/мин до приблизительно -60°C и ампулы быстро погружали в жидкий азот, где хранили несколько дней или месяцев.

Оттаивали ампулы в водяной бане при 40°C со встряхиванием. Извлеченные из них каллусы помещали на бумажные фильтры, расположенные на поверхности агаризованной среды в чашках Петри. Чашки помещали в темноту при 25°. Через несколько часов фильтры с тканью переносили в новые чашки и оставляли на ночь в тех же условиях. Утром фильтры снова переносили на

новые чашки на среду с агарозой и помещали в обычные условия с освещением. Спустя несколько дней перенос фильтров иногда повторяли, а после достаточного возобновления роста каллусной ткани - пересаживали ее на среду для регенерации.

Растения *Dioscorea balcanica* и *D. caucasica* в культуре *in vitro* с успехом регенерированы после хранения их каллусных тканей в жидком азоте. В повторных независимых опытах каллусы обеих видов также возобновили рост после оттаивания, причем не только органогенные, но и эмбриогенные: прозрачные глобулярные агрегированные структуры, полученные из органогенных тканей на среде с 2,4-Д (1 мг/л). Состояние и рост эмбриогенных каллусов после криосохранения лучше, чем органогенных. В настоящее время эти ткани пересажены на среду для регенерации, проводятся наблюдения за их развитием и исследуются хромосомные наборы в клетках и каллусов, и кончиков корней. Продолжается также хранение в жидком азоте ампул с тканями этих исчезающих эндемичных видов, замороженных в тех же успешных опытах. Преимущество криопротектантной смеси ДМСО с трегалозой по сравнению с сахарозой неувидительно в свете данных о том, что трегалоза, состоящая из двух глюкозных остатков, лучше стабилизирует мембраны, замещая в них воду и образуя мостики между соседними головками фосфолипидов (Stowe *et al.*, 1988). Таким образом, положено начало спасению названных видов с помощью криосохранения их тканей в жидком азоте.

ЛИТЕРАТУРА

- Бутенко, Р. Г., Попов, А. С., Волкова, Л. А., Диттрих, Б., & Лукнер М. (1983): Жизнеспособность клеток растений при разных режимах глубокого замораживания. - Цитология 25(10): 1191-1196.
- Волкова, Л. А., Попов, А. С., Носов, А. М. & Бутенко, Р. Г. (1982): Сохранение биосинтетического потенциала клетками диоскореи (*Dioscorea deltoidea* Wall.) после криогенного хранения. - Доклады Академии Наук СССР 265(2): 504-506.
- Волкова, Л. А., Попов, А. С. & Самыгин, Г. А. (1984): Влияние аминокислот на суспензионную культуру клеток диоскореи дельтовидной и ее возобновление после хранения при -196°C. - Физиология растений 31(4): 632-638.
- Попов, А. С. (1993): Некоторые механизмы криоповреждения клеток *in vitro* и особенности их криосохранения. - Физиология растений 40(3): 485-496.
- Попов, А. С., Волкова, Л. А., Гонзалез, А. М. Т., Диттрих, Б., Донат, П., Донец, Н. Б. & Черняк, Н. Д. (1991): Криосохранение клеточных штаммов и меристем растений: влияние подготовки и криопротекторов. - Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. - Наука, Москва.
- Попов, А. С., & Федоровский, Д. Н. (1992): Повреждения плазмалеммы клеток диоскореи, культивируемых *in vitro*, в процессе их криосохранения. - Физиология растений 39(2): 335-343.
- Попов, А. С., Черняк, Н. Д. & Бутенко, Р. Г. (1982): Возобновление суспензионной культуры клеток женьшеня *Panax ginseng* С. А. Меуер после глубокого замораживания. - Доклады Академии Наук СССР 262(3): 765-768.
- Самыгин, Г. А. (1974): Причины вымерзания растений. - Наука, Москва.
- Туманов, И. И. (1979): Физиология закаливания и морозостойкость растений. - Наука, Москва.
- Федоровский Д. Н. & Попов, А. С. (1992): Повреждения плазмалеммы различных штаммов диоскореи дельтовидной при криосохранении. - Физиология растений 39(3): 592-598.
- Федоровский, Д. Н., Черняк, Н. Д. & Попов, А. С. (1993): Исследование повреждений плазмалеммы клеток женьшеня настоящего при криосохранении. - Физиология растений 40(1): 117-123.
- Грубичич, Д., Чулафич, Л. & Боевич - Цветич, Д. (1991): Регенерация диоскореи кавказской (*Dioscorea caucasica* Lipsky) и диоскореи балканской (*D. balcanica* Košanin) в культуре *in vitro*. - Физиология растений 38(5): 1018-1022.

- Чулафич, Л., Грубишич, Д., Вуичич, Р., Волкова, Л. А. & Попов, А. С. (1994): Соматический эмбриогенез *in vitro* диоскорей кавказской и балканской и криосохранение их органогенных каллусных тканей. - Физиология растений 41(6): 929-934.
- Crowe, J., Crowe, L., Carpenter, J., Rudolph, A., Wistrom C., Spargo, B. & Anchrordoguy, T. (1988): Interactions of Sugars with Membranes. - Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembranes 947(2): 367-386.
- Keefe, P. & Henshaw, G. (1984): A Note on the Multiply Role of Artificial Nucleation of the Suspending Medium During Two-step Cryopreservation Procedures. - Cryo-Letters 5(1): 71-78.
- Steponkus, P. (1984): Role of the Plasma Membrane in Freezing Injury and Cold Acclimation. - Annual Revue of Plant Physiology 35: 543-584.
- Yamada, Y., Hara, Y., Katagi, H. & Senda, M. (1980): Protoplast Fusion. Effect of Low Temperature on the Membrane Fluidity of Cultured Cells. - Plant Physiology 65(6): 1099-1102.

Rezime

ALEKSANDAR S. POPOV, LJUDMILA A. VOLKOVA, LJUBINKA ČULAFIĆ¹

KRIOKONZERVACIJA GENOFONDA BILJAKA I TKIVA *IN VITRO* *DIOSCOREA BALKANICA I D. CAUCASICA*

Institut za fiziologiju biljaka K.A. Timirjazeva RAN, Moskva, Rusija

¹Institut za botaniku, Biološki fakultet, Beograd, Jugoslavija

U uslovima neograničenog rasta potreba čovečanstva i poremećaja ekološke ravnoteže u prirodi, već davno je shvaćena opasnost koja ugrožava genetičke resurse: kulturnih, lekovitih i izčezavajućih, endemičnih biljaka. Tradicionalni načini očuvanja tih resursa su nedovoljni. Tako je shvaćena neophodnost kriokonzervacije genofonda ovih biljaka u tečnom azotu (-196°C). Tako dobijena „kriobanka” ima poseban značaj za vegetativno razmnožavanje izabranih vrsta, roditeljskih hibridnih formi, i biljaka sa rekalcitrantnim semenima. Istraživanja na vrstama *Panax ginseng* i *Dioscorea deltoidea* dala su mogućnost čuvanja ćelijskih linija ovih vrsta u tečnom azotu i pokazala da je glavni problem dehidratacije ćelija. Danas se u kriobanci Instituta za fiziologiju biljaka K.A. Timirjazeva u Moskvi čuvaju 23 linije od 15 biljnih vrsta čiji su meristemi stabla vraćeni sa uspehom u kulturu *in vitro* posle dugotrajne kriokonzervacije.

Kalusi endemo-reliktnih vrsta *Dioscorea balcanica* Košanin i *D. caucasica* Lipsky, koje su uvedene u kulturu *in vitro* u Odeljenju za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” u Beogradu, čuvaju se u tečnom azotu u ovoj kriobanci. Kao krioprotektant korišćen je 7% dimetilsulfoksid (DMSO) sa 5% trehalozom, a zamrzavanje je vršeno po programu 3PK-I (SSSR) brzinom 0.33 C/min do -30°C, zatim 10.00 C/min do 60°C a zatim su ampule brzo spuštane u tečni azot. Posle višemesečnog čuvanja na temperaturi -196°C organogeni i embriogeni kalusi su otapani u vodenom kupatilu na 40°C a zatim gajeni u *in vitro* uslovima na hranljivim podlogama za regeneraciju biljaka. Regeneracija je bila uspešna u istoj meri kao i kod kalusa koji su permanentno rasli na 25°C.

Ova metoda je neophodni sastavni deo postupka za očuvanje retkih i endemičnih biljnih vrsta putem metode kulture *in vitro*.