

Maciej Niedzielski*, Konrad Woliński*

**OCENA MOŻLIWOŚCI HARTOWANIA PĄKÓW SPOCZYNKOWYCH
GRUSZ DLA WZROSTU ODPORNOŚCI NA ZAMRAŻANIE W CIEKŁYM
AZOCIE**

**ASSESSMENT OF PUTATIVE EFFECT OF PEAR DORMANT BUD
HARDENING ON INCREASE OF RESISTANCE TO LIQUID NITROGEN
FREEZING**

Słowa kluczowe: metody kriogeniczne, paki spoczynkowe, hartowanie, grusze,
Pyrus communis L.

Key words: cryogenic methods, dormant buds, hardening, pears, *Pyrus communis* L.

Assessment of putative effect of pear dormant bud hardening on increase of resistance to liquid nitrogen freezing.

Freezing in liquid nitrogen method let for the long-term storage alive of different biological materials. Concerning of plants it make possible to conserve with minimal costs and maintaining genetic stability different materials , which are difficult to preservation in forms different than living plants. It is especially important for ex-situ conservation of many plant species. Viability maintenance after liquid nitrogen freezing is a result of different cryoprotective treatment application and their optimization. The cryo-storage method might be used for dormant bud storage of many plant species. It might be a effective method for genetic resources conservation of orchard plants like pears. Apart of optimization of freezing procedure, plant material hardening (at -2°C) might be used for resistance to liquid nitrogen freezing increase. Preliminary results presented showed significant positive effect of plants hardening on freezing resistance.

* *Mgr Maciej Niedzielski, mgr inż. Konrad Woliński – Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej w Powsinie, ul. Prawdziwka 2, 02-973 Warszawa; tel.: 22 754 26 07; e-mail: mniedz@obpan.pl, konradfm@gmail.com*

1. WPROWADZENIE

Zachowanie różnorodności genetycznej roślin uprawnych ma istotne znaczenie dla kontynuacji programów hodowlanych. Szczególne przydatne mogą być znajdujące się w kolekcjach stare rodzime odmiany, dobrze przystosowane do warunków klimatyczno-glebowych Polski. Obecnie kolekcje gatunków sadowniczych propagowanych wegetatywnie utrzymywane są jako kolekcje polowe. Kolekcje roślin narażone są na różne zagrożenia, zarówno biotyczne, jak i abiotyczne. Może to spowodować bezpowrotną utratę cennych genotypów, gdyż ze względów praktycznych (ekonomicznych) utrzymuje się zwykle dwa lub trzy drzewa danej odmiany.

Utrzymanie kolekcji polowych wymaga wysokich nakładów finansowych związanych z uprawą i ochroną sadów. Te ograniczenia powodują konieczność poszukiwań alternatywnych metod zachowania zasobów genowych jabłoni.

Bezpieczną i efektywną metodą jest kriokonserwacja, tj. przechowywanie materiału roślinnego w temperaturze ciekłego azotu [Bajaj 1979; Benson i in. 2005; Keller i in. 2008]. Warunki kriogeniczne pozwalają istotnie obniżyć koszty przechowywania, gwarantują wysokie bezpieczeństwo kolekcji, jak i minimalizują ryzyko zmian genetycznych.

W odniesieniu do grusz podobnie jak do jabłoni możliwe jest, co potwierdziły już prowadzone badania, przechowywanie zamrożonych pąków spoczynkowych [Towill i in. 2004; Volk i in. 2008]. Dzięki dużej wydajności i względnej prostocie metoda ta umożliwia zgromadzenie w banku genów znacznej ilości obiektów w relatywnie krótkim czasie. Jednakże o możliwości zamrożenia i przechowywania pąków spoczynkowych jabłoni w ciekłym azocie w istotnym stopniu decydują zarówno różne parametry przygotowania materiału i jego zamrażania, jak i poziom spoczynku pąków.

Kilka ostatnich sezonów charakteryzował nietypowy układ temperatur w okresie zimowym. Brak wystarczająco długich okresów temperatur ujemnych wyraźnie obniżał zdolność materiału (pąków) do zamrażania.

Celem prowadzonych badań była ocena wpływu stopnia odwodnienia, terminu zbioru materiału, a także możliwości indukowania odporności na zamrażanie (hartowanie) zrazów gruszy, co pozwoliłoby na częściowe uniezależnienie się od przebiegów temperatur w okresie pozyskiwania materiału do zamrażania i przechowywania w ciekłym azocie.

2. MATERIAŁ I METODY

Założeniem doświadczeń była ocena wpływu stopnia odwodnienia pąków spoczynkowych grusz na ich wrażliwość na zamrażanie w ciekłym azocie, a także ocena możliwości hartowania spoczynkowych pąków grusz na podniesienie ich odporność na zamrażanie do temperatury ciekłego azotu. Do doświadczeń wybrano dwie odmiany gruszy o różnej mrozoodporności: odmianę tolerancyjną 'Paten' i odmianę wrażliwą 'Dobra Ludwika'. Zbierano jed-

noroczne pędy z drzew rosnących w sadzie kolekcyjnym PAN OB-CZRB w Warszawie. Materiał do zamrożenia i hartowania pobierano w trzech terminach: 12.11.2009 przed okresem mrozów, jako materiał nie w pełni zahartowany w warunkach naturalnych, 14.12.2009 po okresie temperatur ujemnych, jako materiał pobrany w terminie optymalnym i 06.01.2010 r.

W celu zamrożenia w ciekłym azocie pędy dzielono na fragmenty o długości 1,5–2 cm zawierające jeden pąk. Tak przygotowany materiał, umieszczony na ażurowych tackach, odwadniano w komorze o wymuszonym obiegu powietrza w stałej temperaturze -2°C . Stopień odwodnienia fragmentów pędów oceniano na podstawie spadku masy fragmentów kontrolnych po uprzednim określeniu wyjściowej zawartości wody w pędach metodą suszarkową, susząc próbki w temperaturze 78°C przez 48 godzin. Badane materiały odwadniano do zawartości wody 30 lub 20% (mś). Po uzyskaniu żądanej wilgotności zamrażano fragmenty pędów zamknięte w polipropylenowych kriofiolkach metodą wolnego zamrażania w urządzeniu do kontrolowanego zamrażania – Minicool LC 40 (l’Air Liquide). Obniżano temperaturę od 0°C do -10°C z szybkością $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, utrzymywano materiał w tej temperaturze przez 20 min, kontynuowano zamrażanie do -40°C z szybkością $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, następnie utrzymywano pąki w temperaturze -40°C przez 24 godziny i przenoszono do zbiornika przechowalniczego (-150°C – temperatura par ciekłego azotu). Materiał po zamrożeniu przechowywano od 3 do 6 tygodni.

Hartowanie pąków prowadzono bezpośrednio po zbiorze. Zebrane pędy dla powstrzymania wysuszenia umieszczono w probówkach, zanurzone częściowo w płynnej pożywce MS wzbogaconej 0,8M sacharozą. Pędy umieszczono w komorze o temperaturze 0°C i co 24 godziny obniżano temperaturę o 1°C do -2°C . Utrzymywano materiał w temperaturze -4°C przez 29 dni. Po zakończeniu hartowania pocięte na 1,5–2-centrymetrowe fragmenty pędu z pąkiem odwadniano i zamrażano według standardowej procedury.

Po rozmrożeniu fragmentów pędów w łaźni wodnej w temperaturze 35°C przez 5 minut i uwodnieniu w wilgotnym torfie w temperaturze pokojowej przez 5 dni oceniano wizualnie na podstawie barwy tkanki (stopnia zbrunatnienia) żywotność pąków i sąsiednich tkanek.

Zdolności regeneracyjne oceniano przez szczepienie (okulizację) pąków na podkładki wegetatywne Pigwa S₁. Fragmenty pędów do okulizacji po rozmrożeniu uwadniano w torfie, w temperaturze 2°C przez 10 dni. Zaokulizowane podkładki uprawiano w szklarni.

3. WYNIKI I DYSKUSJA

O możliwości zamrożenia i przechowywania w ciekłym azocie spoczynkowych pąków gatunków roślin drzewiastych strefy umiarkowanej decyduje ich stopień spoczynku, czyli adaptacji do niskich temperatur. Podstawowymi czynnikami warunkującymi głębokość spoczynku są – obok właściwości gatunku czy odmiany – czynniki zewnętrzne, w tym głównie warunki klimatyczne w okresie jesienno-zimowym. Najszerzej badano to w odniesieniu do jabłoni – stopień zimowej aklimatyzacji pąków jabłoni jest kluczowym czynnikiem warunku-

jącym ich żywotność i zdolności regeneracyjne po zamrożeniu w ciekłym azocie [Stushnoff, Seufferheld 1995; Tyler, Stushnoff 1988a; Towill i in. 2004]. Według danych Stushnoff, Seufferheld [1995] i Tyler, Stushnoff [1988a, b] optymalny termin pozyskania pąków spoczynkowych jabłoni do zamrażania w ciekłym azocie poprzedzony być musi kilkunastodniowym okresem ujemnych temperatur.

Na żywotność zamrażanych pąków spoczynkowych mają także wpływ traktowanie wstępne materiału i tryb zamrażania. Podstawowym czynnikiem jest wilgotność (stopień odwodnienia) zamrażanych pąków [Tyler, Stushnoff 1988a, b]. Prezentowane badania w odniesieniu do pąków spoczynkowych grusz obejmowały ocenę zarówno wpływu na żywotność i zdolności regeneracyjne: terminu zbioru pędów, stopnia odwodnienia pąków przed zamrożeniem, jak i możliwość zastosowania hartowania pąków dla podwyższenia ich odporności na zmrzanie.

Uzyskane wyniki oceny żywotności pąków w teście laboratoryjnym potwierdziły wpływ niskiej mrozoodporności odmiany 'Dobra Ludwika' (tab. 2) na obniżenie żywotności zamrażanych w ciekłym azocie pąków spoczynkowych. Wyraźnie negatywny wpływ na żywotność pąków miał też stopień wstępnego odwodnienia. Obniżenie wilgotności pąków obu badanych odmian grusz do 20%, co pokazują tabele 1 i 2, powodowało znaczne obniżenie żywotności pąków w porównaniu z tymi samymi pąkami odwadnianymi do zawartości wody 30%.

Tabela 1. Żywotność pąków gruszy odmiany 'Paten', %

Table 1. Buds viability of pear cv. 'Paten', %

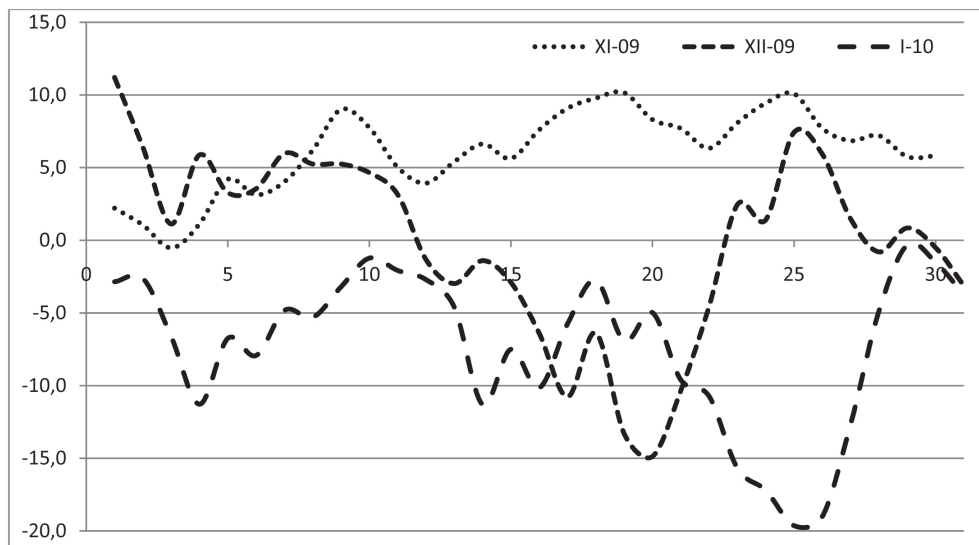
Pąki gruszy	Wilgotność, %	Niehartowane			Hartowane		
		Termin zbioru			Termin zbioru		
		20.11	14.12	06.01	20.11	14.12	06.01
Odwodnione	30	100	100	100	100	100	-
	20	40	x	0	67	31	-
Mrożone	30	45	59	40	78	71	-
	20	50	x	-	33	42	-

Tabela 2. Żywotność pąków gruszy odmiany 'Dobra Ludwika', %

Table 2. Buds viability of pear cv. 'Dobra Ludwika', %

Pąki gruszy	Wilgotność, %	Niehartowane			Hartowane		
		Termin zbioru			Termin zbioru		
		20.11	14.12	06.01	20.11	14.12	06.01
Odwodnione	30	100	100	40	100	100	-
	20	60	x	0	33	36	-
Mrożone	30	17	26	-	42	5	-
	20	0	x	-	-	25	-

Także termin zbioru pędów powodował zróżnicowanie żywotności pąków grusz. Pąki niehartowane zebrane w dość późnym terminie, tj. pierwszej dekadzie stycznia, mimo korzystnego przebiegu pogody tj. okresu temperatur ujemnych (rys.) traciły całkowicie żywotność po odwodnieniu do zawartości wody 20%. Spadek żywotności pąków odmiany Dobra Ludwika, zebranych w pierwszej dekadzie stycznia, obserwowany był już po odwodnieniu pąków do zawartości wody 30% – wskazywać to może na zanikanie spoczynku pąków, co skutkuje obniżeniem odporności na stres dehydracyjny.



Rys. Przebieg średnich dobowych temperatur w okresie listopad 2009 – styczeń 2010

Fig. Mean day temperature during period NOV 2009 – JAN 2010

Dane te potwierdzają znaczenie właściwego terminu zbioru materiału dla jego jakości. W ostatnich latach obserwowane były nietypowe przebiegi pogody w okresie pozyskiwania materiału do zamrożenia w ciekłym azocie. Względnie wysokie temperatury i brak wystarczająco długiego okresu temperatur ujemnych mają istotny wpływ na jakość materiału i żywotność zamrażanych pąków spoczynkowych [Tyler, Stushnoff 1988a, b; Niedzielski i in. 2007]. Z tego względu wartościami może być opracowanie metody podwyższającej odporność pąków spoczynkowych na zamrażanie w ciekłym azocie. Istotne wydaje się poszukiwanie metod pozwalających na uniknięcie lub zniwelowanie istotnego wpływu środowiska na właściwości gromadzonych materiałów. Korzystny wpływ wstępnego chłodzenia (hartowania) w odniesieniu do hodowanych *in vitro* i zamrażanych pąków szczytowych jabłoni obserwowany był przez Kuo, Lineberger [1985] i Kushnarenko i in. [2009]. Brison i in. [1995] podobne rezultaty uzyskali dla pąków szczytowych gruszy, a Gupta, Reed [2006] – dla porzeczki i agrestu.

Zastosowanie zabiegu hartowania pędów grusz, polegającego na poddaniu zebranych pędów oddziaływaniu temperatury -2°C przez 29 dni, pozwoliło na wyraźne podwyższenie żywotności zamrażanych pąków odmiany 'Paten' (tab. 1). Efekt hartowania pędów odmiany 'Dobra Ludwika', odmiany o niższej mrozoodporności, był mniej widoczny.

O skuteczności zarówno zabiegów wstępnego traktowania materiału (odwodnienia), jak i samego zamrażania decyduje w znacznej mierze stopień wyrównania materiału. W odniesieniu do pąków spoczynkowych duże znaczenie ma wyrównana średnica pędu, co ma wpływ na szybkość i poziom odwodnienia materiału, a to w dużym stopniu determinuje zachowanie materiału w czasie odwadniania i zamrażania. Ze względu na młody wiek drzewek odmiany 'Dobra Ludwika' trudne było pozyskanie wystarczającej liczby wyrównanych fragmentów pędów. Miało to zapewne wpływ na uzyskane wyniki. W tym eksperymencie także ze względu na ograniczoną liczbę podkładek do okulizacji wykorzystano wybrane warianty pąków, co pokazuje tabela 3. Dla każdego wariantu okulizowano 6 pąków, stąd w tabeli 3 podano ilość regenerujących okulantów w stosunku do liczby zaokulizowanych pąków.

Tabela 3. Zdolność regeneracyjna zamrożonych pąków spoczynkowych grusz

Table 3. Regeneration ability frozen pear dormant buds.

Pąki spoczynkowe grusz	Wilgotność, %	'Paten'			'Dobra Ludwika'		
		Termin zbioru			Termin zbioru		
		20.11	14.12	06.01	20.11	14.12	06.01
Niehartowane	30	1/6	4/6	x	x	3/6	2/6
	20	2/6	x	x	x	x	x
Hartowane	30	0/6	1/6	x	x	x	x
	20	x	x	x	x	5/6	x

Uzyskana zdolność regeneracyjna pąków grusz wahała się od 1/6 do nawet 5/6. Użytkowano wzrost okulizowanych pąków we wszystkich przypadkach z wyjątkiem pąków odmiany 'Paten' hartowanych i odwodnionych do zawartości wody 30%, co trudno jednoznacznie wyjaśnić, gdyż żywotność tych pąków w ocenie laboratoryjnej była wysoka. Zaskakująco wysoka była też zdolność regeneracyjna pąków odmiany 'Dobra Ludwika' odwodnionych do 20% po hartowaniu. Możliwe, iż w tym wypadku, co uwidoczniła ocena żywotności pąków, hartowane pąki tej odmiany wymagały dalszego odwodnienia w porównaniu z pąkami odmiany 'Paten'. Wskazuje to na potrzebę dalszych badań w tym zakresie.

4. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Metody zamrażania i przechowywania w ciekłym azocie pąków spoczynkowych grusz mogą być istotnym uzupełnieniem systemu zachowania i ochrony zasobów genowych tego

gatunku. Jednakże potrzebne jest kontynuowanie badań dla oceny zakresu zróżnicowania reakcji poszczególnych odmian za stosowane techniki traktowania wstępnego i zamrażania materiału. Wydaje się także, iż zastosowanie hartowania zebranych pędów grusz pozwala na zwiększenie odporności pąków spoczynkowych na zamrażanie w ciekłym azocie.

Wyniki badań pozwolą na optymalizację metod kriokonserwacji pąków spoczynkowych grusz i mogą być podstawą do rozszerzenia zakresu stosowania takich metod w odniesieniu do innych gatunków.

PIŚMIENICTWO

- BAJAJ Y.P.S. 1979. Technology and Prospects of cryopreservation of germplasm. *Euphytica* 28: 267–285.
- BENSON E.A., HARDING K., JOHSTON J., DAY J.G. 2005. From ecosystem to cryobanks the role of cryo-conservation in the preservation and sustainable utilization of global phyto-diversity. [In:] *Contributing to a Sustainable Future*.
- BENNETT I.J., CLARKE H., MCCOMB J.A. (red.). *Proceedings of the Australian Branch of the IAPTC&B, Perth, Western Australia, 21–24 SEPT.*
- BRISON M., BOUCAUD de M-T., DOSBA F. 1995. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of two interspecific *Prunus* rootstocks. *Plant Science* 105: 235–242.
- GUPTA S., REED B. M. 2006. Cryopreservation of shoot tips of blackberry and raspberry by encapsulation-dehydration and vitrification. *CryoLetters* 27(1): 29–42.
- KELLER J.E.R., KACZMARCZYK A., SENULA A. 2008. Cryopreservation for plant genebanks – a matter between high expectation and cautious reservation. *CryoLetters* 29(1): 53–62.
- KUO C.C., LINEBERGER B.D. 1985. Survival of *in vitro* culture tissue of Jonathan apples exposed to -196°C. *HortSci.* 20: 764–767.
- KUSHNARENKO S.V., ROMADANOVA N.V., REED B.M. 2009. Cold acclimation improves regrowth of cryopreserved apple shoot tips. *CryoLetters* 30(1): 47–54.
- NIEDZIELSKI M., BUCZYŃSKA B., PUCHALSKI J. 2007. Kriokonserwacja zasobów genowych jabłoni. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 517 część I: 159–167.
- STUSHNOFF C., SEUFFERHELD M. 1995. Cryopreservation of apple (*Malus* species) genetic resources. *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.32 Cryopreservation of plant germplasm I* (ed. By Y.P.S. Bajaj), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- TYLER N., STUSHNOFF C. 1988a. The effects of prefreezing and controlled dehydration on cryopreservation of dormant vegetative apple buds. *Can. J. Plant Sci.* 68: 1163–1167.
- TYLER N., STUSHNOFF C. 1988b. Dehydration of dormant apple buds at different stages of cold acclimation to induce cryopreservability in different cultivars. *Can. J. Plant Sci.* 68: 1169–1176.

- TOWILL L.E., FORSLINE P.L., WALTERS C., WADDEL J.W., LAUFMAN J. 2004. Cryo-preservation of *Malus* germplasm using a winter vegetative bud method: results from 1915 accessions. *CryoLetters* 25: 323–334.
- VOLK G.M., WADDELL J., BONNART R., TOWILL L., ELLIS D., LUFFMAN M. 2008. High viability of dormant *Malus* buds after 10 years of storage in liquid nitrogen vapor. *Cryo-Letters* 29(2): 89–94.
- WOLF J., BRYANT G. 2001. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *International Journal of Refrigeration* 24: 438–450.