

Konrad Woliński*, Maciej Niedzielski*, Jerzy Puchalski*

**ZASTOSOWANIE METOD KRIOGENICZNYCH DO DŁUGOTRWAŁEGO
PRZECHOWYWANIA MATERIAŁU ROŚLINNEGO**

**APPLICATION OF CRYOGENIC METHODS
FOR LONG-TERM STORAGE OF PLANT MATERIAL**

Słowa kluczowe: metody kriogeniczne, pąki spoczynkowe, jabłoń, *Malus domestica* Borkh., ciekły azot.

Key words: cryogenic methods, dormant buds, apple, *Malus domestica* Borkh., liquid nitrogen.

Popularized in recent decades, the idea of sustainable development and harmonious co-existence of man with the environment is now echoed in large number areas of life. In crop production, one of the features of this approach to environmental management is progressively using of historical varieties and/or local landraces and wild progenitors of cultivated species. Important issue was and still is effective and economically profitable ex-situ protection of plant populations against progressive degradation leading to their loss.

One of the most promising and commonly used methods for plant genetic resources conservation is long-term storage of seed samples in seed bank. Seed low moisture content and low temperature (-20°C) lead to prolonged seed samples longevity up to decades. Significant progress brought cryogenic methods. Their advantages are continuous prolongation of storage time, which resulted in economic efficiency through limitation of the workload associated with establishing and maintaining of plant collections. In the frame of project FLOR-NATUR cryogenic methods of seed storage are used for collecting and protection of endangered vascular plants of the eastern Polish.

Cryostorage methods might be used for long-term storage of biological materials which can not be stored alive in a seed bank. In the case of fruit plants (apple, pear) were devel-

* *Mgr Maciej Niedzielski, mgr inż. Konrad Woliński, prof. dr hab. Jerzy Puchalski – Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej w Powsinie, ul. Prawdziwka 2, 02-973 Warszawa; e-mail: mniedz@obpan.pl, konradfm@gmail.com, ob.sekr@obpan.pl*

oped methods of dormant buds in freezing and storage in ultra-low of vapor liquid nitrogen temperature (-150°C). In the Botanical Garden of the PAS in Warsaw since 2009 a project of cryobank of historic apple varieties establishment. This paper summarizes the results gained in the course of this work.

1. WPROWADZENIE

Przez wiele lat naturalną formą gromadzenia oraz ochrony cennych genotypów roślin wieloletnich, w tym form lokalnych, było prowadzenie kolekcji polowych. Ograniczeniem tej metody jest jednak wysokie ryzyko utraty obiektów w wyniku oddziaływania czynników pogodowych oraz presji patogenów i szkodników. Sprawą niezwykle ważną są także duże koszty pracy związanej z pielęgnacją i ochroną. Należy do tego dodać również nakłady związane z organizacją miejsca uprawy oraz właściwą dla gatunku agrotechniką. W ten sposób kolekcje polowe dzielą te same problemy co tradycyjne uprawy [Dziubiak 2004].

Inną metodą zachowania zasobów genowych roślin może być wykorzystanie techniki *in vitro*, obejmującej hodowle prowadzone w warunkach spowolnionego wzrostu. Dużym atutem w tym wypadku jest miniaturyzacja kolekcji, jej pełne odseparowanie od warunków środowiskowych, wadą zaś – jest niebezpieczeństwo powstawania mutacji somaklonalnych. Uzyskany więc w ten sposób materiał nasadzeniowy bądź mający w założeniu posłużyć do dalszej hodowli, przed każdym etapem, musi być kontrolowany pod względem wierności genetycznej.

Utrzymanie obszernych kolekcji w warunkach *in vitro* wymaga także znacznych wydatków pieniężnych (odczynniki, prowadzenie laboratorium), jak i wiąże się z wysokimi wymaganiami fachowości personelu oraz nakładów pracy.

Rozwijane w ostatnich latach metody zachowania roślinnych zasobów genowych, wykorzystujące techniki kriogeniczne (przechowywanie w ultra niskich temperaturach), pozwalają wykluczyć wady dotychczasowych rodzajów prowadzenia kolekcji.

W stabilnej temperaturze par ciekłego azotu (-150°C) [Bajaj 1979, Benson i in. 2005, Mięka, Rybczyński 2006] dochodzi do całkowitego zatrzymania metabolizmu, co skutkuje zastopowaniem bądź radykalnym opóźnieniem procesów starzenia. Gwarantuje to długoletnie przechowywanie materiałów bez utraty żywotności i zmian genetycznych.

Podobnie jak przy utrzymywaniu kolekcji *in vitro* także tu występuje korzystne „zmniejszenie jej rozmiaru” i ograniczenie wydatków ponoszonych na obsługę oraz utrzymanie. Początkowe wysokie koszty założenia kolekcji, biorąc pod uwagę długoletnią perspektywę przechowywania, są znacznie niższe niż wydatki związane z utrzymaniem kolekcji roślin *in vivo*. Zachowanie kolekcji w warunkach kriogenicznych zapewnia wysoki poziom bezpieczeństwa obiektów dzięki ograniczeniu do minimum oddziaływań środowiskowych.

Celem pracy była optymalizacja metodyki zamrażania pąków spoczynkowych jabłoni uprawianych w warunkach klimatycznych Polski.

W latach 2006–2008 oceniono pod względem tolerancji na przebieg pogody oraz wrażliwości na zabiegi objęte procedurą 10 historycznych odmian jabłoni z kolekcji Ogrodu Botanicznego w Powsinie. Zbadano także możliwość hartowania po zbiorze jednorocznych pędów i wpływu tego zabiegu na żywotność pąków.

2. MATERIAŁY I METODY

Doświadczenie przeprowadzono w latach 2006–2008 na dziesięciu historycznych odmianach jabłoni zróżnicowanych pod względem pochodzenia i tolerancji na niskie temperatury. Zbioru materiału roślinnego (jednorocznych pędów) dokonano w grudniu lub styczniu, w dwóch następujących po sobie sezonach. Fragmenty pędów (ok. 1,5 cm), zawierające jeden pąk, poddano częściowemu odwadnianiu do zawartości wody ok. 30%. Prowadzono je w komorze w stałej temperaturze -4°C , przez okres różny – zależny od specyfiki odmiany. Stopień odwodnienia kontrolowano za pomocą codziennych pomiarów masy wybranych fragmentów.

Po osiągnięciu oczekiwanego poziomu wilgotności, zgodnie z metodyką [Tyler, Stushnoff 1998a, b], przystąpiono do właściwego procesu zamrażania. Pąki zamrażano według następującej procedury: od 0°C do -10°C z szybkością $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, po utrzymaniu tej temperatury przez 15 minut kontynuowano obniżanie temperatury do (-40°C) przy tej samej szybkości schładzania (Minicool LC 40, l'Air Liquide). Próbki wyjęte z maszyny przekładano do chłodziarki -40°C i przechowywano przez 24 godziny. Po upływie tego czasu próbki przenoszono do zbiorników przechowalniczych i utrzymywano w fazie gazowej. Materiał przechowywano przez 3–6 tygodni.

Pąki rozmrażano w łaźni wodnej o temperaturze 37°C przez 5 minut. Po rozmrożeniu fragmenty pędów uwadniają przez umieszczenie w wilgotnym torfie w temperaturze 2°C na 10 dni. Żywotność pąków i sąsiadujących tkanek oceniano wizualnie na podstawie obecności zmian nekrotycznych (zbrązowienia) na przekrojach podłużnych fragmentów pędów jabłoni. Ocenę wykonano dwukrotnie: po odwodnieniu pąków oraz po rozmrożeniu. Zdolności regeneracyjne oceniano przez okulizację pąków na podkładkach wegetatywnych (M-26). Okulanty uprawiano następnie w szklarni.

Materiał do hartowania (indukcji spoczynku) pobierano w grudniu, przed okresem mrozów. Pędy umieszczono w próbkach, zanurzone częściowo w płynnej pożywce MS wzbogaconej 0,8M sacharozy. Pędy przetrzymywano w komorze o temperaturze początkowej 0°C , a następnie co 24 godziny obniżano ją o 1°C do -4°C . Materiał utrzymywano w temperaturze -4°C przez 23 dni. Fragmenty z pąkami odwadniano, zamrażano i rozmrażano według standardowej procedury.

4. WYNIKI I DYSKUSJA

Podstawowym warunkiem pomyślnej krioprezerwacji pąków spoczynkowych jest ich zbiór w najkorzystniejszym fizjologicznie okresie. Celem jest pozyskanie organów w mak-

symalnym stopniu zdrewniałych oraz zahartowanych i przez to w znacznym stopniu już odwodnionych (naturalne zagęszczanie soków) [Benson 2008]. Naturalna adaptacja komórek roślinnych do ujemnych temperatur pozwala zachować funkcje życiowe w warunkach głębokiego stresu dehydratacyjnego w czasie zamrażania [Wolf, Bryant 2001]. Za stymulacje tych przemian odpowiada jesienno-zimowe obniżenie temperatury oraz zmniejszenie intensywności promieniowania słonecznego.

Według literatury [Towill 2008, Stushnoff, Seufferheld 1995, Tyler, Stushnoff 1988a, b] dla jabłoni uprawianych w północnej Europie najkorzystniejszym terminem zbioru zrazów jest styczeń. Konieczne jest co najmniej 72-godzinne nieprzerwane utrzymywanie się temperatury poniżej -5°C . Zrazy pobrane w tym terminie wykazują największe wyrównanie pod względem zawartości wody i maksymalne odwodnienie. Tak więc istotnym czynnikiem warunkującym wysoką żywotność pąków po zamrożeniu oraz ich późniejszą zdolność regeneracji stanowi przebieg pogody w okresie poprzedzającym zbiór.

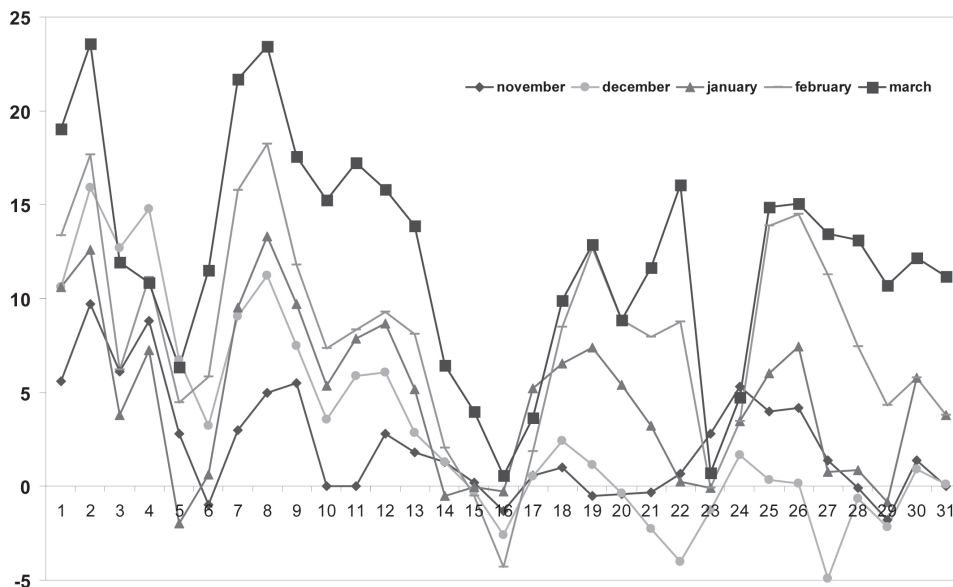
W omawianym eksperymencie porównano żywotność pąków spoczynkowych tych samych odmian jabłoni zbieranych w dwóch kolejnych sezonach różnych istotnie pod względem warunków pogodowych. Dane o żywotności pąków prezentuje tabela 1.

Warunki pogodowe porównywanych okresów przełożyły się wyraźnie na żywotność pąków zarówno odwadnianych, jak i po zamrażaniu, w obrębie tych samych odmian. Chłodna jesień i stabilna niska temperatura powietrza zimą 2007/2008 (rys. 1) skutkowała wyższą jakością oraz mniejszymi uszkodzeniami podczas odwadniania i zamrażania. Pierwsze spadki temperatury poniżej zera obserwowano już w listopadzie i trwały one z niewielkimi przerwami przez całą zimę.

Tabela 1. Żywotność pąków spoczynkowych jabłoni w %

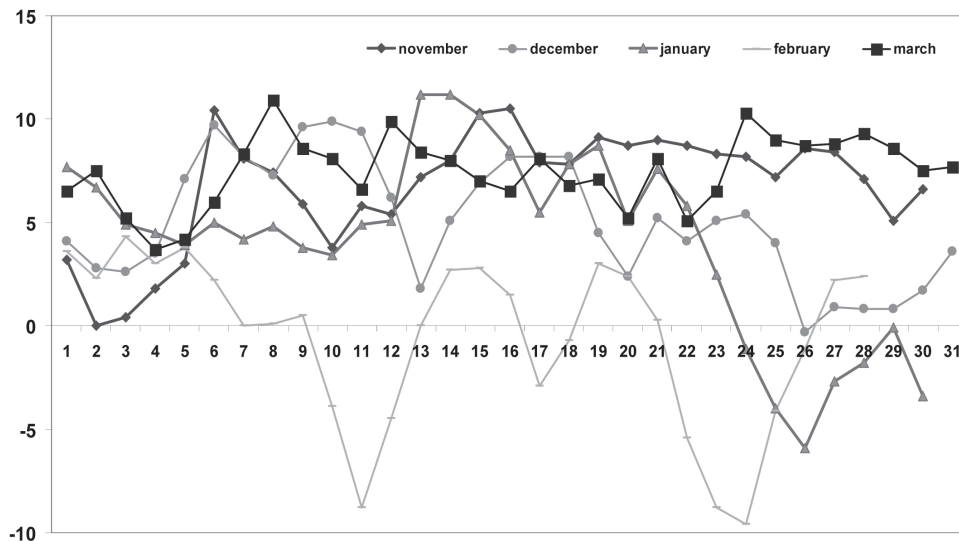
Table 1. Viability of apple dormant buds in %

Odmiana	2007 r.		2008 r.	
	po suszeniu	po mrożeniu	po suszeniu	po mrożeniu
Glogierówka	100	28	100	73
Pepina Linneusza	90	32	96	67
Suislebskie	100	50	97	50
Kandył Sinap	60	45	100	58
Korobówka	70	16	93	91
Reneta Kanadyjska	73	25	100	69
Ben Davis	100	11	100	35
Akero	80	25	80	26
Pepina Ribstona	25	15	67	33
Landsberska	100	25	100	56
Średnia	80	27	93	56



Rys. 1. Przebieg średnich dobowych temperatur w okresie listopad 2007 – marzec 2008 (°C)

Fig. 1. The daily average temperature in the period NOV 2007 – MAR 2008 (°C)



Rys. 2. Przebieg średnich dobowych temperatur w okresie listopad 2006 – marzec 2007 (°C)

Fig. 2. The daily average temperature in the period NOV 2006 – MAR 2007 (°C)

Materiał oceniany rok wcześniej charakteryzowała mniejsza procentowa żywotność w obrębie wszystkich obserwowanych odmian. Zima 2006/2007 (rys. 2) odznaczała się przesunięciem chłódów na okres ostatnich dni stycznia i lutego. Zaskakująco ciepły był grudzień, gdyż ujemne temperatury pojawiły się dopiero w trzeciej jego dekadzie. Tak niekorzystny przebieg pogody uniemożliwił pobranie materiału roślinnego w optymalnych warunkach, pomimo wskazującej na to pory roku. Warto zauważyć, że już od końca stycznia spada poziom fizjologicznego zahartowania pędów roślin drzewiastych naszego klimatu. Niska temperatura panująca zwykle jeszcze w lutym wstrzymuje postępowanie tego procesu [Kopcewicz, Lewak 2005]. Daje to jednak podstawy do przypuszczania, że rośliny w tym okresie są szczególnie wrażliwe na wzrost temperatury i każdy z nich powoduje już, w pewnym stopniu, obniżenie zahartowania.

Na podstawie oceny żywotności odwodnionych pąków można było wyróżnić grupę odmian bardziej podatnych na mróz i wstępne częściowe odwodnienie: 'Pepina Ribstona', 'Kandył Sinap', 'Akeró' – najniższa, średnia żywotność w analogicznych okresach, oraz odznaczających się większą tolerancją 'Landsberska', 'Ben Davis', 'Glogierówka', 'Suislebskie' – stuprocentowa żywotność w obu sezonach. Pozostałe trzy odmiany należy zaliczyć do kategorii pośredniej. Obserwacje te nie mają jednak przełożenia na stan finalny.

Żywotność pąków każdej z badanych odmian wyraźnie obniżyła się po zamrożeniu do temperatury ciekłego azotu – największy spadek wynoszący aż 89% zanotowano dla odmiany 'Ben Davis' w sezonie 2006/2007. Rok później odmiana ta także nie zachowała wyjściowego, wysokiego poziomu żywotności i po rozmrożeniu zaznaczyła spadek o 69%. Najlepsze wyniki żywotności finalnej zanotowano w sezonie 2006/2007 u odmiany 'Kandył Sinap' (spadek o 30%), a w sezonie 2007/2008 u odmiany 'Korobówka' (spadek o 1%).

Ze względu na powtarzające się lata o względnie ciepłych zimach zasadne wydaje się poszukiwanie metod pozwalających zwiększyć naturalną odporność pąków na zamrażanie. W związku z tym podjęto próbę hartowania w warunkach laboratoryjnych pąków spoczynkowych jabłoni.

Pędy pięciu odmian jabłoni zebrano w grudniu, jeszcze przed okresem temperatur ujemnych, a następnie inkubowano je w temperaturze -4°C przez 23 dni. Dla oceny skuteczności hartowania, pobrano i zamrożono według tej samej procedury, pąki tych samych odmian jabłoni w naturalnie indukowanym spoczynku. Wyniki prezentuje tabela 2.

Tabela 2. Żywotność pąków śpiących jabłoni i poddanych hartowaniu w %

Table 2. Viability of apple dormant buds at natural or induced dormancy in %

Odmiana	Pąki w spoczynku naturalnym		Pąki hartowane	
	żywotność	zdolność regeneracyjna	żywotność	zdolność regeneracyjna
Glogierówka	73	25	73	15
Pepina Linneusza	67	55	56	15
Suislebskie	50	0	88	85

cd. tab. 2 na str. 510

Pepina Ribstona	33	0	69	6
Landsberska	56	40	81	43
Średnia	56	24	73	33

Zabieg hartowania zrazów pozwolił uzyskać pąki o żywotności porównywalnej lub przewyższającej wyniki uzyskane dla tych samych materiałów zebranych w stanie spoczynku indukowanego naturalnie. Utrzymana została także zdolność regeneracyjna pąków. Materiał hartowany dwóch odmian: 'Suislebskie' i 'Pepina Ribstona' okazał się wyraźnie lepszy od zebranego w stanie naturalnego spoczynku.

W opisywanych eksperymentach obserwowano wyraźne zróżnicowanie międzyodmianowe. Badane odmiany reagowały różnie – zarówno na warunki środowiskowe, gdy porównano dwa lata zbioru, jak i na hartowanie. Podobne zróżnicowanie w reakcji pąków spoczynkowych jabłoni na warunki środowiskowe danego roku obserwowali Towill i in. [2004].

Prezentowane wyniki badań reakcji pąków spoczynkowych jabłoni na zamrażanie w ciekłym azocie uzyskano po szybkim rozmrożeniu materiału, co jest stosowane w większości stosowanych metodyk. Gwarantowało to szybkie rozpuszczenie kryształków lodu powstałych, zgodnie z założeniami teoretycznymi, w przestrzeniach międzykomórkowych w wyniku wolnego zamrażania. Jednakże, ze względu na złożoną budowę morfologiczną i skład chemiczny pąków, szybkie rozmrażanie może powodować powstawanie naprężeń i wysokich różnic potencjału osmotycznego pomiędzy cytoplazmą komórek a przestrzeniami międzykomórkowymi, co może prowadzić do uszkodzeń. W 2010 r. podjęto zatem próbę oceny wpływu szybkości rozmrażania na żywotność i zdolność regeneracyjną pąków spoczynkowych jabłoni po zamrożeniu w ciekłym azocie. Do doświadczenia wybrano grupę odmian, które nie wykazały lub wykazywały istotne obniżenie żywotności po wstępnym częściowym odwodnieniu, co wskazywałoby na dużą wrażliwość na zmiany stężenia cytoplazmy.

Tabela 3. Żywotność pąków jabłoni po szybkim i wolnym rozmrożeniu w %

Table 3. Viability of apple dormant buds after fast and slow thawing in %

Odmiana	Odwadniane	Rozmrażanie	
		szybkie	wolne
Oliwka Żółta	100	92	58
Polskie Mnichy	100	67	58
Piękna z Rept	95	67	53
Grahama Jubileuszowa	94	100	50
Oliwka Czerwona	88	50	17
Księżna Luiza	77	25	22
Wagera	72	30	17
Peggy's Favorite	72	8	0

Mank's Küchenapfel	70	30	30
Bismarckapfel	62	25	33
Anoke	61	33	11
Rajewskie	50	25	17
Strumiłówka	50	58	38
Truskawkowe Wilknersa	43	3	33
Fameuse	38	18	23
Średnia	71	42	30

Uzyskane wyniki pokazały, iż szybkość rozmrażania pąków ma wpływ na ich żywotność, a wolne rozmrażanie pąków (24 godziny w temperaturze pokojowej) spowodowało dalszy spadek żywotności w porównaniu z takim samym materiałem rozmrażanym szybko. Potwierdza to zatem celowość szybkiego rozmrażania materiału roślinnego.

5. WNIOSKI

1. Warunki pogodowe (temperatura) w istotnym stopniu determinują poziom spoczynku pąków jabłoni i ich odporność na zamrażanie w ciekłym azocie.
2. Możliwe jest indukowanie spoczynku (hartowanie) pąków w warunkach laboratoryjnych, co znacząco poprawia odporność pąków jabłoni na zamrażanie w ciekłym azocie.
3. Krioprezerwacja daje możliwość stworzenia w krótkiej perspektywie czasu banku genów dowolnych taksonów roślin, stanowiących w przyszłości materiał hodowlany.

PIŚMIENICTWO

- BAJAJ Y. P. S. 1979. Technology and Prospects of cryopreservation of germplasm. *Euphytica* 28: 267–285.
- BENSON E. E. 2008. Chapter 2. Cryopreservation Theory. [In:] REED B. M. (editor) *Plant cryopreservation. A practical guide*. Springer Science+Business Media, New York: 24–27.
- 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., Mc Comb J.A. (editors). Proceedings of the Australian Branch of the IAPTC&B, Perth, Western Australia, 21–24 SEPT.
- BENSON E. E. 1995. Chapter 13. Cryopreservation of shoot-tips and meristems.: 121-125 [In:] Day J. G., Mc Lellan M. R. (editors). *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Human Press, Totowa.

- DZIUBIAK M. 2004. Genetic resources of fruit trees and shrubs in the Botanical Garden of the Polish Academy of Sciences in Warsaw. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. vol: 497: 47–51.
- KOPCEWICZ J., LEWAK S., 2005. Fizjologia roślin, PWN, Warszawa.
- MIKUŁA A., RYBCZYŃSKI J. J. 2006. Krioprezerwacja narzędziem długoterminowego przechowywania komórek, tkanek i organów pochodzących z kultur *in vitro*. Biotechnologia 4 (75): 145–163.
- REINHOUD P. J., URAGAMI A, SAKAI A., VAN IREN F. 1995. Chapter 12. Vitrification of plant cell suspensions: In: DAY J. G., McLELLAN M. R. (editors). Cryopreservation and freeze-drying protocols. Human Press, Totowa.
- SAKAI A., HIRAI D., NIINO T. 2008 Chapter 3 Development of PVS-based vitryfication and encapsulation – vitryfication protocols. In: REED B. M. (editor). Plant cryopreservation. A practical guide. Springer Science+Business Media, New York: 34.
- 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. Cryopreservation of *Malus* germplasm using a winter vegetative bud method: results form 1915 accessions. CryoLetters 25, 323–334.
- TOWILL L.E. 2008 Cryopreservation of Apple (*Malus domestica*) Dormant Buds. [In:] Reed B. M. (editor). Plant cryopreservation. A practical guide. Springer Science+Business Media, New York: 427, 428.
- WOLF J., BRYANT G. 2001. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. International Journal of Refrigeration 24: 438–450.