

DŁUGOTRWAŁE PRZECHOWYWANIE PLAZMY ZARODKOWEJ ROŚLIN UŻYTKOWYCH – METODY I PROBLEMY

Jerzy Puchalski

Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej Polskiej Akademii Nauk Warszawie

Wstęp

Końcowi XX wieku towarzyszą olbrzymie zmiany przebiegające często w sposób dla nas trudny do oceny pod względem skutków dla przyszłych pokoleń. Z jednej strony obserwujemy niezwykle szybki postęp technologiczny, lecz niestety z drugiej – bardzo niepokojące ubożenie zasobów przyrodniczych naszej planety. Na szczęście u schyłku wieku w porę dostrzeżono niebezpieczeństwo zagrożenia Ziemi, a zwłaszcza jej żywych zasobów i takie pojęcie jak ochrona bioróżnorodności (czy też według polskich uczonych przyrodników – ochrona różnorodności biologicznej) weszło do powszechnej świadomości. Z pewnością największe znaczenie w tym zakresie miał Szczyt Państw Świata, który odbył się w 1992 roku w Rio de Janeiro, by wypracować skuteczne sposoby ochrony przyrody na Ziemi w warunkach tzw. zrównoważonego rozwoju. Uchwalona w Rio de Janeiro „Konwencja o Różnorodności Biologicznej” stała się podstawowym dokumentem służącym do opracowywania właściwych metod ochrony różnorodności biologicznej na trzech poziomach organizacji przyrody, czyli ekosystemów, poszczególnych gatunków oraz genotypów lub populacji gatunków, mających znaczenie użytkowe. Dla rolnictwa i leśnictwa podstawowe znaczenie ma ostatni poziom jako tzw. różnorodność genetyczna, czyli całość zmienności genetycznej (w formie puli genowej), jaką reprezentują gatunki lub populacje i która jest konsekwencją ich rozwoju ewolucyjnego [IBPGR 1991]. Właściwa ochrona różnorodności genetycznej i jej praktycz-

ne wykorzystanie w hodowli nowych odmian może być motorem postępu biologicznego rolnictwa, co obserwowaliśmy w formie tzw. zielonych rewolucji. Ocenia się, że wykorzystanie dzikich materiałów w hodowli pszenicy dało dochody w wysokości co najmniej 2 miliardów USD, a w przypadku nowych odmian ryżu – około 1,5 miliarda USD [ZEDAN 1995].

Do ochrony różnorodności genetycznej służy tzw. plazma zarodkowa (ang. germplasm), którą zgodnie z definicją przyjętą przez IBPGR [1991], stanowi materiał genetyczny tworzący fizyczną podstawę dziedziczenia w następnych pokoleniach i mogący być użyty do zachowania różnorodności genetycznej w formie odpowiednich kolekcji przechowywanych w tzw. bankach genów. Plazmę zarodkową żywych organizmów zawierającą cechy o aktualnej lub potencjalnej wartości użytkowej określa się jako zasoby genowe (ang. genetic resources).

U organizmów roślinnych plazmą zarodkową mogą być wszelkie diaspory i utwory przetrwalnikowe służące do rozmnażania, zarówno generatywnego, jak i wegetatywnego. Najczęściej są to nasiona i zarodniki, lecz także pyłek, bulwy, kłącza, cebule czy izolowane tkanki i organy oraz kultury *in vitro*.

Ochrona różnorodności genetycznej roślin polega na zbiorze i długotrwałym przechowywaniu wymienionych powyżej rodzajów plazmy zarodkowej, a zajmują się tym różne wyspecjalizowane instytucje, zwane bankami genów, czy też bankami zasobów genowych, których zadaniem jest zabezpieczenie plazmy zarodkowej przed utratą lub zmianą jej pierwotnej zmienności genetycznej. Na całym świecie istnieje obecnie około 1000 banków zasobów genowych roślin [IPGR 1993]. Należą do nich zarówno wielkie banki regionalne w systemie znanym pod skrótem CGIAR, banki narodowe lub krajowe oraz różne lokalne banki i kolekcje.

Wydaje się, że zagadnieniu właściwego przechowywania plazmy zarodkowej roślin w bankach genów nie poświęcono dotychczas wystarczającej uwagi. W działalności banków dominowała bowiem problematyka zbioru zasobów genowych i ich jak najszybszego zachowania bez podejmowania pogłębionych badań w zakresie opracowywania coraz lepszych metod długiego przechowywania plazmy zarodkowej, zapewniających pełną ochronę różnorodności genetycznej. W niniejszym przeglądzie zostaną omówione różne rodzaje plazmy zarodkowej roślin oraz sposoby ich zachowania dla potrzeb banków genów.

Ochrona różnorodności genetycznej roślin *in situ*

Tak zwana ochrona *in situ*, czyli na naturalnych stanowiskach, jest podstawową metodą konserwatorską dla ochrony całych ekosystemów czy

też poszczególnych gatunków i prowadzona jest poprzez tworzenie parków narodowych czy też rezerwatów przyrody jako całych obszarów chronionych, podlegających szczególnym warunkom zachowania, występujących na nich zasobów przyrodniczych. Na dużo mniejszą skalę podjęto takie działania na rzecz zachowania w warunkach naturalnych, również zasobów genowych roślin mających znaczenie użytkowe. Wydaje się, że ochrona *in situ* może mieć szczególnie duże znaczenie dla zachowania różnorodności genetycznej reprezentowanej przez dziko rosnące gatunki roślin, pokrewne roślinom uprawnym lub stanowiące ich dzikich przodków. Bardzo często występują one na ograniczonych obszarach, na których mogły zachować swoją pierwotną zmienność. Są to tzw. centra zróżnicowania roślin (ang. centers of plant diversity), [ZOHARY 1970; HAWKES 1991].

Na obszarach tych zachodziła podstawowa ewolucja różnych gatunków roślin użytkowych i są one najlepszym źródłem ich zmienności. Pierwszym autorem teorii centrów roślin uprawnych był wybitny genetyk rosyjski Mikołaj Wawilow, który pierwotnie nazwał je centrami pochodzenia roślin uprawnych [VAVILOV 1926] i obecnie następcy jedynie zmodyfikowali jego poglądy zmieniając również nazwę tych centrów na centra zróżnicowania roślin.

W warunkach naturalnych zachowało się jeszcze wiele populacji roślin, zarówno gatunków jak i genotypów roślin, o potencjalnym znaczeniu użytkowym. Przykładem mogą tu być stanowiska dzikich przodków roślin zbożowych w Izraelu, które podlegają ścisłej ochronie *in situ* [ZOHARY 1983]. Chronione są także zasoby genowe drzew owocowych w Turcji. W Anatolii można znaleźć wiele dzikich sadów gruszy, jabłoni i śliw, które były zachowane w naturalnej postaci przez tysiące lat [FORD-LLOYD, JACKSON 1986]. Na terenie Turcji ochroną zostały także objęte populacje dziko rosnących gatunków roślin cebulowych z rodzajów *Galanthus*, *Sternbergia* i *Leucojum*, używanych następnie przez Holendrów do hodowli nowych odmian roślin ozdobnych [BOGERS, VAN LEEUWEN 1992].

Ochrona *in situ*, dająca możliwość zachowania pierwotnej zmienności genetycznej w miejscach występowania starych genotypów, powinna być stosowana przez banki genów w miarę możliwości w największym stopniu. W niektórych krajach podjęto działalność mającą na celu wspieranie takich przedsięwzięć. Na przykład w Szwajcarii władze samorządowe finansują rolników utrzymujących w swoich gospodarstwach tradycyjne, lokalne odmiany roślin, zwłaszcza sadowniczych. W Polsce również przed kilku laty w ramach Krajowego Programu Ochrony Zasobów Genowych Roślin, koordynowanego przez Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, rozpoczęto prace nad zachowaniem w warunkach *in situ* starych sadów jabłoniowych znajdujących się na terenie Nadwiślańskich Parków Krajo-

Ochrona różnorodności genetycznej roślin *ex situ*

Podstawową strategią banków genów w zakresie zachowania zasobów genowych roślin i ich różnorodności genetycznej jest gromadzenie plazmy zarodkowej i jej przechowywanie w specjalnych kontrolowanych warunkach, czyli *ex situ* [PLUCKNETT i in. 1987; IPGRI 1993; EBERHART i in. 1995]. W zależności od rodzaju roślin stosuje się do tego różne metody mające na celu jak najdłuższe zachowanie plazmy zarodkowej w możliwie pełnej żywotności i bez zmian ich pierwotnej zmienności genetycznej przed przechowywaniem. Najczęściej przechowywanym rodzajem plazmy zarodkowej są nasiona w formie tzw. banków nasion. Jednak część roślin tworzy nasiona o małej trwałości lub też podstawowym typem ich reprodukcji pozostaje rozmnażanie wegetatywne i dlatego konieczne jest stosowanie innych metod, jak na przykład tworzenie kolekcji żywych roślin lub też tzw. polowych banków genów oraz utrzymanie ich w formie kultur *in vitro* [EBERHART i in. 1991; ROOS i in. 1996].

Banki nasion i zarodników

Nasiona są podstawowym utworem przetrwalnikowym do rozmnażania generatywnego gatunków roślin kwiatowych. U roślin niższych ich odpowiednikiem są zarodniki, przy pomocy których rozmnażają się paprocie, mszaki, wątrobowce czy porosty. Rośliny niższe nie należą raczej do roślin użytkowych, lecz niektóre gatunki paproci używane są jako rośliny ozdobne i dlatego też przechowywanie zarodników zostało włączone do niniejszego opracowania.

Kategorie nasion w zależności od możliwości ich długiego przechowywania

Materiałem do przechowywania w banku nasion są oczywiście nasiona, lecz także różne owoce suche, zwykle niepękające. Zachowują one cechy nasion, ale morfologicznie są owocami. Przykładami takich orgnów roślinnych, traktowanych jak nasiona są: ziarniaki traw (w tym wszystkich zbóż), orzechy: orzech leszczyny, żołądzie dębów i bukwie buka, orzeszki gryki i konopi, niełupki słonecznika, sałaty i cykorii oraz rozłupki roślin z rodziny baldaszkowatych [GRZESIUK, GÓRECKI (red.) 1994]. Dla uproszczenia ta grupa owoców suchych będzie omawiana w aspekcie przechowalnicwa jak nasiona.

Nasiona poszczególnych gatunków roślin charakteryzują się różną długością okresu żywotności uzależnionym zarówno od czynników określanych jako wewnętrzne i zewnętrzne [GRZESIUK, KULKA 1981]. Do głównych czynników wewnętrznych, związanych głównie z cechami samych nasion,

należą: budowa anatomiczna nasion i ich skład chemiczny, rodzaj i głębokość spoczynku nasion oraz stopień ich dojrzałości, gatunkowe właściwości genetyczne oraz porażenie nasion przez patogeny (grzyby i bakterie) lub też mechaniczne uszkodzenie nasion. Głównymi czynnikami decydującymi o długości życia nasion są jednak czynniki zewnętrzne do których należą: warunki przechowywania jak temperatura, skład atmosfery i aeracja (ciśnienie parcjalne tlenu), wilgotność powietrza oraz zawartość wody w nasionach.

Przez cały okres przechowywania nasion, począwszy od dojrzałości woskowej, przez spoczynek bezwzględny i względny, aż do pęcznienia i kiełkowania, zachodzi w nich kompleks niekorzystnych zmian określanych jako proces starzenia się nasion [GRZESIUK, KULKA 1981]. Zmiany te polegają na stopniowym obniżaniu się wigoru nasion, a następnie ich żywotności aż do całkowitej śmierci biologicznej. Powodem tego są uszkodzenia aparatu genetycznego i organelli komórkowych, a także zakłócenia procesów metabolicznych [GÓRECKI i in. 1998a, 1998b]. Tempo starzenia się nasion można opóźnić wprowadzając je w stan anabiozy, w którym procesy życiowe zostają znacznie spowolnione. Ma to szczególnie duże znaczenie dla jakości przechowywanych nasion, gdyż starzeniu się towarzyszą zawsze niekorzystne zmiany o charakterze genetycznym, jak mutacje chromosomowe i fenotypowe, szyft genetyczny spowodowany naturalną selekcją, czy też dryf genetyczny związany z liczebnością populacji [ROBERTS 1973a; ROOS 1988; PUCHALSKI 1993]. Wszystkie te procesy genetyczne powodują istotne różnice w zmienności genetycznej roślin powstających z tak uszkodzonych nasion, co jest przyczyną utraty części puli genowej przechowywanej plazmy zarodkowej. Banki genów poszukują więc metod skutecznego opóźniania starzenia się nasion, co jak wspomniano można osiągać wprowadzając nasiona w stan anabiozy. Szybkość starzenia się nasion w największym stopniu zależy od zawartości w nich wody, a także od temperatury przechowywania. Znana jest zasada HARRINGTONA [1973], mówiąca że okres żywotności nasion skraca się o połowę dla każdego wzrostu wilgotności nasion o 1% (w zakresie 5–14%) oraz każdego wzrostu o 5°C temperatury przechowywania (0°C–50°C). Zasada ta jest słuszna tylko ogólnie, a nie dla poszczególnych gatunków nasion, lecz jej sens pozostaje istotny dla przechowywania nasion. Dlatego też banki genów dążące do maksymalnego wydłużenia okresu przechowywania nasion, bez powstania w nich zmian starzeniowych, starają się stosować jednocześnie obniżanie temperatury i zawartości wody w nasionach. Badając jednak różne gatunki roślin zauważono, że wytwarzają one nasiona o bardzo zróżnicowanej trwałości związanej ze stopniem uwodnienia w okresie dojrzałości. Część gatunków posiada bowiem nasiona o wysokim uwodnieniu i drastyczne obniżanie w nich zawartości wody prowadzi do utraty ich żywotności. ROBERTS [1973b] podzielił wszystkie nasiona na dwie kategorie: orthodox (po polsku

przetłumaczone na typowe) oraz recalcitrant (po polsku nazwane jako nietypowe). Nasiona typowe mogą być suszone do względnie niskich zawartości wody, natomiast u nasion nietypowych istnieje duża wrażliwość na suszenie. BERJAK i in. [1990] nazwali obie grupy nasion inaczej: recalcitrant jako homoiohydrous (czyli o stałym uwodnieniu) oraz orthodox jako poikilohydrous – o zmiennym uwodnieniu w stanie dojrzałym. Terminy te nie przyjęły się jednak w literaturze na temat przechowywania nasion.

Do gatunków wytwarzających nasiona typowe (orthodox) należy większość gatunków występujących w strefie klimatu umiarkowanego. Natomiast nasiona nietypowe (recalcitrant) tworzą głównie gatunki roślin tropikalnych i wodnych oraz niektóre gatunki drzew rosnących w strefie umiarkowanej. KING i ROBERTS [1979, 1980] zestawili wszystkie gatunki roślin wytwarzające nasiona nietypowe. Przykładami są tutaj: kauczukowiec brazylijski, kakaowiec, kasztanowiec oraz gatunki dębów. W późniejszych badaniach ELLIS i in. [1990a] zauważyli, że nasiona uznawane jako recalcitrant można jednak w odpowiednich warunkach podsuszać i wprowadzili nową kategorię: intermediate czyli nasion pośrednich. Według HONGA i ELLISA [1996] kategorie nasion w zależności od możliwości ich suszenia dla celów przechowalniczych należy tworzyć następująco:

- a) nasiona typowe (orthodox) to nasiona znoszące odwodnienie do 5% zawartości wody i poniżej;
- b) nasiona pośrednie (intermediate) to nasiona tolerujące odwodnienie do około 10–12,5% zawartości wody. Przykładami takich nasion są nasiona cytryny, kawy arabskiej, herbaty chińskiej czy pieprzu czarnego;
- c) nasiona nietypowe (recalcitrant) to nasiona tracące żywotność przy wysuszeniu ich do około 15–20% zawartości wody (co odpowiada wilgotności równoważnej poniżej 70% w 20°C).

Dla nasion drzew stosuje się także inną klasyfikację nasion w zależności od ich pochodzenia, opracowaną przez BONNERA [1990]:

- a) true orthodox (całkowicie typowe) znoszące przechowywanie przez długi okres w niskich temperaturach przy zawartości wody 5–10%;
- b) sub-orthodox (podtypowe lub częściowo typowe) mogące być przechowywane w podanych wyżej warunkach, lecz przez znacznie krótszy okres czasu;
- c) temperate recalcitrant (nietypowe strefy umiarkowanej), które nie mogą być odwodniane, lecz zachowują żywotność przez 3–5 lat przechowywania w temperaturze ok. 0°C;

- d) tropical recalcitrant (nietypowe strefy tropikalnej), wrażliwe zarówno na suszenie jak i przechowywanie w temperaturach dodatnich poniżej 10–15°C.

Przechowywanie nasion typowych

Nasiona kategorii typowych można suszyć do niskich zawartości wody, jak i przechowywać w ujemnych zakresach temperatury. Szerokie badania nad wpływem temperatury oraz zawartości wody w różnych nasionach na ich okres żywotności prowadzone były w wielu ośrodkach, lecz pierwsze znaczące osiągnięcia w tym zakresie zanotował profesor E.H. Roberts ze swoim zespołem z angielskiego Uniwersytetu w Reading. Na podstawie wieloletnich badań różnych nasion opracował on specjalny wzór umożliwiający przewidywanie okresu żywotności nasion dla różnych gatunków w zależności od temperatury przechowywania oraz zawartości wody w nasionach [ROBERTS 1973b]. Zadanie to ułatwiać miały specjalne wykresy (nomografy) umożliwiające szybki odczyt maksymalnego okresu przechowywania nasion z zachowaniem założonego poziomu zdolności kiełkowania danej próbki. W późniejszym okresie zespół Roberta poprawił te dane i wprowadził nowy precyzyjniejszy wzór dla oceny możliwości przechowywania różnych gatunków roślin [ELLIS, ROBERTS 1980, 1981]. Stosowanie tego wzoru jest jednak dość trudne, gdyż należy znać trzy wartości stałe specyficzne dla odpowiednich nasion. We wzorze tym temperatura i wilgotność występują w potęgze liczby 10 i mogłoby się wydawać, że zawartość wody i temperaturę należałoby maksymalnie obniżyć, aby z kolei maksymalnie wydłużyć okres przechowywania nasion. Dlatego też ROBERTS i ELLIS [1989] zaproponowali, aby zawartość wody w nasionach przed przechowywaniem doprowadzać do poziomu 10% tzw. wilgotności równoważnej (RH). W zależności od typu nasion (oleiste lub skrobiowe) odpowiada to zawartości wody 2–6% [ELLIS i in. 1990b]. ROBERTS [1991] określił takie suszenie jako głębokie (ultra-drying) i założył, że wysuszone do 10% RH nasiona można przechowywać przez wielokrotnie dłuższy okres czasu nawet w temperaturach dodatnich, zachowując ich żywotność na poziomie 90%. Zupełnie inne stanowisko zajęła grupa uczonych z Narodowego Banku Nasion Stanów Zjednoczonych w Fort Collins [VERTUCCI, ROOS 1990, 1993b]. Stwierdzili oni, że minimalny poziom wody w nasionach może wynosić 19–27% wilgotności równoważnej (w zależności od rodzaju nasion), a suszenie poniżej tego poziomu powoduje w nasionach usuwanie cząsteczek wody związanej chemicznie lub niezbędnej dla zachowania ich funkcji życiowych, co ujawnia się w postaci obniżonej żywotności i innych trwałych uszkodzeniach cytologicznych i fizjologicznych. Oparte to było na badaniach z zakresu kinetyki wody w nasionach [VERTUCCI, LEOPOLD 1987; VERTUCCI 1989].

Te rozbieżne opinie stały się przedmiotem ostrej i krytycznej polemiki obu grup badaczy: angielskich [ELLIS i in. 1991; SMITH 1992] proponujących tzw. ultra-drying jako metodę do długotrwałego przechowywania nasion typowych (orthodox) w ekonomicznej temperaturze powyżej 0°C oraz amerykańskich [VERTUCCI, ROOS 1991, 1993a], nazywających takie suszenie terminem over-drying czyli przesuszeniem nasion i proponujących tylko niskie temperatury przechowywania. W późniejszym terminie uczeni z Fort Collins sprecyzowali optymalny poziom zawartości wody w nasionach przeznaczonych do długiego przechowywania na 22% RH (określony w temperaturze 35°C) [WALTERS i in. 1998].

W świetle tej polemiki bardzo interesujące wydają się wyniki badań nad próbkami nasion przechowywanych w hermetycznych ampułkach szklanych przez 110 lat przy niskiej zawartości wody, lecz w temperaturze pokojowej [STEINER, RUCKENBAUER 1995]. Otóż nasiona jęczmienia wysuszone do 2,61% zawartości wody po 10 latach zachowały zdolność kiełkowania w 90%, a nasiona owsa (przy 3,12% zawartości wody) kiełkowały w 81%. Należy jednak dodać, że ziarniaki pszenicy (3,55% zawartości wody) miały zdolność kiełkowania zaledwie 3,5%, a ziarniaki żyta mające początkową wilgotność 4,61% całkowicie utraciły swoją żywotność. Z wyników tych daje się zauważyć istotne różnice w zachowaniu żywotności pomiędzy nasionami różnych gatunków zbóż.

Drugim ważnym czynnikiem przy przechowywaniu nasion typowych jest temperatura. Zwykle w bankach nasion stosuje się temperatury ujemne poniżej -18°C jako warunek dla tzw. long-term storage, czyli przechowywania długotrwałego [ROOS 1989]. Do takiego celu służą zwykle komory z obniżonymi temperaturami do około -20°C (lub poniżej) lub też zamrażarki osiągające taką temperaturę. Zgodnie z obliczeniami na podstawie odpowiednich wzorów nasiona wysuszone do 5-7% zawartości wody mogą być przechowywane przez okres kilkudziesięciu lat z zachowaniem odpowiedniego poziomu żywotności, która zgodnie z zaleceniami IBPGR [1992] nie powinna spadać poniżej 85% początkowej zdolności kiełkowania nasion większości gatunków rolniczych, a dla nasion warzyw, gatunków dziko rosnących i drzew leśnych może być obniżona najwyżej do 75% zdolności kiełkowania. Tak ostre warunki wynikają z częstości zmian genetycznych w nasionach skorelowanych z poziomem starzenia się.

Coraz częściej w bankach nasion stosowane jest przechowywanie w warunkach kriogenicznych, w ultraniskich temperaturach, np. w temperaturze ciekłego azotu wynoszącej -196°C. Technikę taką dla nasion niektórych grup roślin stosuje Narodowy Bank Nasion Departamentu Rolnictwa USA w Fort Collins [STANWOOD 1985, TOWILL, ROOS 1989]. Według uczonych z Fort Collins [EBERHART i in. 1991] przechowywanie kriogeniczne w parach ciekłego azotu (poniżej -130°C), w stosunku do przechowywania w niskich temperaturach rzędu -20°C, ma cały szereg zalet do których zali-

czono: nieobecność płynnej wody, bardzo niską molekularną energię kinetyczną, ekstremalnie wolną dyfuzję, dłuższy okres życia nasion w wyniku spowolnienia starzenia się oraz brak ryzyka uszkodzenia nasion w wyniku przerw w dostawie elektryczności. Według STANWOODA i BASSA [1981] koszty przechowywania nasion cebuli przez okres około 100 lat w parach ciekłego azotu (w zakresie -150°C do -180°C), będą prawie 4-krotnie niższe w porównaniu do przechowywania w temperaturze -18°C , co wynika z niższych kosztów związanych z regeneracją nasion. Przechowywanie kriogeniczne wymaga jednak bardzo kosztownego wyposażenia, którego nie doliczono do kosztów. W zasadzie przy kilkuletnim lub kilkunastoletnim przechowywaniu nasion nie zauważa się różnic dla obu zakresów temperatur -18°C i -196°C . STANWOOD i SOWA [1995] badając nasiona cebuli przechowywane przez 10 lat w podanych wyżej obu ujemnych temperaturach nie zauważyli żadnego obniżenia żywotności, lecz ta sama próbka nasion przechowywana w temperaturze dodatniej 5°C miała już wyraźnie niższą zdolność kiełkowania 68% w stosunku do początkowej zdolności kiełkowania 94%.

Interesujące wyniki zostały opublikowane przez uczonych ze znanego niemieckiego Banku Genów w Gatersleben. Podsumowali oni 12- i 15-letnie wyniki badań nad przechowywaniem różnych nasion w temperaturze 0°C lub -15°C i zauważyli, że nasiona niektórych gatunków po tym okresie zachowały bardzo wysoką żywotność, nawet po przechowywaniu w 0°C . Dotyczyło to zwłaszcza nasion jęczmienia, pszenicy i grochu [SPECHT i in. 1997]. Natomiast temperatura 0°C była mniej korzystna dla żyta, owsa i *Aegilops*. Nasiona cebuli i selera znacznie obniżyły swoją żywotność nawet przy przechowywaniu w -15°C . Podobnie reagowały przechowywane w tej samej temperaturze nasiona buraka pastewnego, słonecznika i łubinu żółtego [SPECHT i in. 1998]. Z doświadczeń tych trudno jest wyciągnąć jednoznaczne wnioski, gdyż nasiona te nie miały porównywalnej wilgotności równoważnej.

Trzecim czynnikiem wpływającym na okres przechowywania nasion typowych jest skład atmosfery przechowalniczej, a zwłaszcza obecność tlenu i jego ciśnienie parcjalne. Czynnikiem ten ma mniejsze znaczenie niż omówione poprzednio zawartość wody w nasionach i temperatura przechowywania, lecz również stwierdzono jego niekorzystny wpływ na przechowywane nasiona [ROBERTS, ABDALLA 1968]. Ma to zapewne związek z udziałem aktywnych form tlenu w tworzeniu wolnych rodników będących główną przyczyną uszkodzenia nasion w trakcie procesu naturalnego ich starzenia się [GÓRECKI i in. 1998b].

NIEDZIELSKI i PUCHALSKI [1998] porównując próbki nasion żyta przechowywane przez 19 lat w hermetycznych naczyniach w atmosferze różnych gazów stwierdzili, że przechowywanie w obecności powietrza powodowało bardzo istotne obniżenie zdolności kiełkowania do zaledwie 17%,

podczas gdy próbki przechowywane w warunkach próżniowych lub w atmosferze azotu zachowywały swoją żywotność na odpowiednio wyższym poziomie 67% lub 60%. Próbki te zawierały 3,7% wody, a przechowywane były w temperaturze otoczenia. Dlatego też w Banku Nasion Ogrodu Botanicznego – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej PAN w Warszawie nasiona są przechowywane w warunkach próżniowych w hermetycznie zamkniętych torbach z folii aluminiowo-polietylenowej. Wilgotność początkowa nasion wynosi zwykle ok. 7%, a torebki z nasionami są umieszczane w zamrażarkach ze stałą temperaturą -20°C . Zakłada się, że w takich warunkach nasiona żyta zachowają wysoką żywotność przez okres powyżej 30 lat.

Przechowywanie nasion nietypowych i pośrednich

Nasiona nietypowe (recalcitrant) nie mogą być bezpośrednio przechowywane przez dłuższy okres ze względu na dużą wrażliwość na suszenie. Przy tak wysokim uwodnieniu procesy starzenia się zachodzą w nich bardzo szybko, a dodatkowo nasiona są łatwo porażane przez patogeny powodujące dodatkowe uszkodzenia i w wyniku tego okres ich życia jest zwykle bardzo krótki [BERJAK, PAMMENTER 1997]. Notuje się jednak znaczne różnice w minimalnym poziomie ich wilgotności dla zachowania żywotności u różnych gatunków roślin, od 13% u *Theobroma cacao* do 61,5% u *Avicennia marina* [HONG, ELLIS 1996]. Niektóre z gatunków ze strefy umiarkowanej, jak np. różne gatunki *Quercus*, tworzą nasiona (żołędzie), które można przechowywać w stanie uwodnionym w temperaturze ujemnej -3°C przez okres nawet 3 lat (Suszka 1971–1974, dane niepublikowane). Nie jest to jednak możliwe dla nasion gatunków ze strefy tropikalnej, które nie znoszą nawet niewielkiej obniżki temperatury do poziomu 15°C . Przykładem mogą być nasiona kauczukowca brazylijskiego, które wytrzymały wysuszenie nawet do 15–20% zawartości wody, a były natychmiast uszkodzane w temperaturze niskiej -5°C lub w temperaturze wysokiej 45°C [CHIN i in. 1981].

Udało się jednak opracować pośrednie metody zachowania gatunków tworzących nasiona wrażliwe na suszenie, zarówno kategorii nietypowych lub pośrednich. Polegają one na izolowaniu z tych nasion zarodków zygocycznych lub też samych osi zarodkowych [CHMIELARZ 1998a]. Izolowane zarodki lub ich osie są następnie odpowiednio przygotowywane do długotrwałego przechowywania, zwykle w stanie zamrożonym w ciekłym azocie. Polega to na ich suszeniu do różnego poziomu, a następnie na zabezpieczeniu przed szkodliwym wpływem zamrażania przez stosowanie różnych substancji ochronnych, tzw. krioprotektantów, których zadaniem jest z jednej strony zapobieganie uszkodzeniu komórek przez tworzący się lód, a z drugiej na utrzymywaniu odpowiedniego ciśnienia osmotycznego we

wnętrzu zamrażanych komórek, zmniejszającego dyfuzję wody z komórki wskutek wzrostu lepkości soku komórkowego. Do najczęściej stosowanych krioprotektantów należą wodne roztwory dwumetylowego tlenku siarki (DMSO), glikoli polietylenowego lub propylenowego, gliceryny i sorbitolu oraz proliny. Związki te są zwykle stosowane w sposób złożony, gdyż ich wspólne działanie zapewnia lepszą ochronę. Tak zabezpieczone tkanki, głównie osie zarodkowe nasion, poddaje się zamrażaniu stosując różne techniki, np. zamrażanie ultra szybkie czy technikę zeszklenia (vitrification), polegającą na wprowadzaniu zawartości komórki w stan zeszkłonego niekrystalicznego płynu podobnego do struktury szkła [ROOS i in. 1996]. Inną techniką jest otoczkowanie osi zarodkowych w alginianie wapnia (encapsulation) [CHMIELARZ 1998a].

Największe osiągnięcia w opracowywaniu metod przechowywania gatunków tworzących nasiona wrażliwe na odwodnienie mają uczeni z południowo afrykańskiego Uniwersytetu Natal w Durbanie, pracujący pod kierunkiem profesor Patrycji Berjak [BERJAK i in. 1990; PAMMENTER i in. 1991; BERJAK, PAMMENTER 1997; DUMET, BERJAK 1997]. Wspólnie z C.W. Vertucci z Fort Collins opracowali oni skuteczne metody kriokonserwacji nasion różnych gatunków tropikalnych, zaliczanych do kategorii recalcitrant lub intermediate, np. *Landolphia kirkii* [VERTUCCI i in. 1991], *Cameilia sinensis* [WESLEY-SMITH i in. 1992] czy też *Phoenix dactylifera* [MYCOCK i in. 1997].

Znaczącym osiągnięciem jest opracowanie przez pracowników Zakładu Biologii Nasion Instytutu Dendrologii PAN techniki kriokonserwacji żołędzi dębu szypułkowego, które zostały wykonane przez doktora P. Chmielarza pod kierunkiem profesora B. Suszki [CHMIELARZ 1997, 1998b]. Efektem tych prac jest uzyskanie zregenerowanych roślin w kulturach *in vitro* pochodzących z osi zarodkowych dębu szypułkowego przechowywanych w ciekłym azocie (Suszka 1999 – informacja ustna).

Przechowywanie zarodników

Zarodniki roślin niższych, analogicznie jak niektóre nasiona nietypowe roślin kwiatowych, bardzo trudno jest przechowywać przez dłuższy okres z zachowaniem ich zdolności kiełkowania. Opracowane zostały jednak odpowiednie techniki dla różnych gatunków paproci. SIMABUKURO i in. [1998] uzyskiwali kiełkujące zarodniki tropikalnego gatunku paproci *Cyathea delgadii* po poddaniu ich sterylizacji, wysuszeniu oraz 2-letniemu przechowywaniu w temperaturze -12°C .

Dużo skuteczniejszą metodą zachowania zasobów genowych paproci jest jednak wykorzystanie do tego celu kultur *in vitro* [GOLLER, RYBCZYŃSKI 1994]. Technika ta polega na uzyskiwaniu przedrośli z zarodników kiełkujących na odpowiednich pożywkach. Gametofity w pewnym stadium ro-

zwoju, np. sercowatym, są następnie przechowywane w kulturze *in vitro*, po czym są dalej doprowadzane do uzyskiwania sporofitów juwenilnych. Taką technikę do okresowego przechowywania krajowych gatunków paproci, głównie chronionych i zagrożonych, zastosowała ZENKTELER [1992]. Z kolei GOLLER i RYBCZYŃSKI [1995] opracowali technikę rozmnażania i przechowywania w kulturze *in vitro* tropikalnego gatunku paproci drzewiastej *Cyathea australis*. Wydaje się, że opisane wyżej techniki będą mogły służyć do tworzenia banków genów roślin zarodnikowych.

Banki pyłku

Pyłek jest raczej rzadko wykorzystywany jako plazma zarodkowa do przechowywania roślinnych zasobów genowych w bankach genów, ale potencjalne możliwości w tym zakresie istnieją [ROBERTS 1975; TOWILL 1985]. Może on być uzupełniającym w stosunku do nasion materiałem genetycznym, służącym zarówno do prac krzyżówkowych, jak i do długiego przechowywania. Dużą zaletą jest mała objętość pyłku ułatwiająca jego gromadzenie oraz wysyłkę. Wadą jest łatwość zakażenia pyłku przez patogeny chorobotwórcze.

Pyłek może być przechowywany w bankach genów analogicznie do nasion. Również okres jego żywotności zależy od zawartości wody oraz temperatury przechowywania [TOWILL 1985]. Pyłek przeznaczony do długiego przechowywania musi być odpowiednio wysuszony, przy czym stosuje się tutaj różne techniki suszenia jak suszenie nad stężonymi roztworami, suszenie próżniowe czy też liofilizacja. Zauważono jednak, że pyłek różnych gatunków roślin, też analogicznie do nasion, wykazuje różną wrażliwość na odwodnienie. Stwierdzono, że istnieją dwa typy pyłku różniące się możliwościami ich długiego przechowywania [HANNA, TOWILL 1995]. Jedna część gatunków roślin posiada w fazie dojrzałości dwukomórkowe ziarna pyłku, a druga ziarna pyłku składające się z trzech komórek. Oba te typy wyraźnie różnią się między sobą cechami fizjologicznymi i strukturalnymi oraz podatnością na przechowywanie. Pyłek dwukomórkowy, złożony z komórki wegetatywnej i generatywnej, ma grubszą warstwę egzyny i jest mało wrażliwy na odwodnienie, a także wytrzymuje dłuższe przechowywanie. Pyłek taki tworzą zwykle gatunki z prymitywniejszych rodzin, zarówno roślin nagozalążkowych, jak i okrytozalążkowych. Odmienne zachowuje się pyłek trójkomórkowy, który z powodu cieńszej warstwy egzyny jest dużo wrażliwszy na suszenie i przechowywanie w niskich temperaturach. Ten typ pyłku tworzą różne gatunki należące do rodzin *Gramineae*, *Umbelliferae*, *Cruciferae*, *Araceae*, *Caryophyllaceae* czy *Chenopodiaceae* [TOWILL 1985]. Największą wrażliwością na przechowywanie charakteryzuje się pyłek różnych gatunków traw. Zwykle pyłku traw

nie udaje się wysuszyć poniżej pewnego poziomu, co uniemożliwia jego dalsze przechowywanie. HANNA i in. [1983] opracowali jednak praktyczną technikę długiego przechowywania pyłku prosa perłowego. Dzięki wysuszeniu ziaren pyłku do wilgotności około 7,5% oraz przechowywaniu w hermetycznych torebkach w temperaturze -73°C zachowywały one zdolność kiełkowania nawet przez 185 dni. Dla różnych gatunków roślin opracowana została technika długiego przechowywania pyłku w warunkach kriogenicznych [CONNOR, TOWILL 1993]. Pyłek po zbiorze był suszony nad nasyconymi roztworami soli do zawartości wody 1–5%, a następnie był przechowywany w parach ciekłego azotu przez różny okres dla poszczególnych gatunków: od jednej doby do 6 miesięcy. Najwyższą zdolność kiełkowania zachowały ziarna pyłku sosny i świerka, a najniższą jabłoni i kukuzydzy.

Opisane metody przechowywania pyłku nie są jednak rutynowo stosowane przez banki genów dla zachowania różnorodności genetycznej roślin i mają raczej charakter doświadczalny. Wydaje się jednak, że w przyszłości pyłek może stać się bardzo ważną kategorią plazmy zarodkowej, zwłaszcza dla gatunków drzew lub też roślin wytwarzających nasiona nietypowe (recalcitrant). Może on być także zbierany w stadiach juvenilnych roślin wieloletnich, które jeszcze nie wytwarzają nasion.

Kolekcje żywych roślin i polowe banki genów

Istnieją gatunki roślin, których rozmnażanie z nasion jest trudne lub wręcz niemożliwe. Do tej grupy roślin należą gatunki rozmnażane w przeważający sposób wegetatywnie – przy pomocy bulw, kłączy lub cebul oraz gatunki wytwarzające nasiona, ale rozmnażane wegetatywnie dla zachowania ich stabilności genetycznej, na przykład różne gatunki drzew owocowych. Dlatego też dla zachowania zasobów genowych tych roślin stosuje się cykliczną uprawę w formie kolekcji wymagających ciąglego utrzymywania w warunkach polowych lub szklarniowych.

Takie kolekcje określa się jako polowe banki genów. W przypadku drzew owocowych kolekcje gromadzi się w tzw. sadach pomologicznych lub też w arboretach. W Stanach Zjednoczonych Ameryki takie kolekcje polowe plazmy zarodkowej zostały nazwane clonal repositories, czyli magazyny klonów [STUSHNOFF 1991]. Takie polowe banki genów są jednak bardzo kosztowne w utrzymaniu, a poza tym zagrożone są przez gwałtowne zdarzenia pogodowe – huragany, czy też mróz oraz narażone są na choroby i szkodniki. Innym niekorzystnym czynnikiem jest możliwość większej erozji genów w warunkach uprawy polowej. Dlatego też coraz częściej polowe banki genów zastępowane są przez banki kultur *in vitro* lub też banki tkanek [TOWILL 1988].

Banki roślinnych kultur *in vitro* i tkanek

Celowość tworzenia takich banków została już uzasadniona w poprzednim punkcie dotyczącym kolekcji żywych roślin i polowych banków genów.

W bankach zasobów genowych roślin przechowuje się obecnie zarówno izolowane tkanki, jak i różne kultury *in vitro*, na przykład zarodków lub osi zarodkowych, merystemów z wierzchołków pędów i korzeni, czy też w formie pąków – śpiących i kątowych. Zarodki pochodzą zwykle z roślin tworzących nasiona nietypowe i przechowuje się je głównie w warunkach kriogenicznych. Najczęściej stosuje się do tego celu zarodki zygocytne lub somatyczne, a rzadziej zarodki nucellarne oraz androgeniczne [BAJAJ 1985]. Najczęstszym eksplantatem dla kultur *in vitro* są jednak różne tkanki twórcze – merysystematyczne, gdyż mają one największy potencjał morfogenetyczny. Przy pomocy kultur merystemów utrzymuje się na przykład zasoby genowe roślin rozmnażanych przy pomocy bulw: ziemniaków, pochryznu (*Dioscorea* sp.), batatów czy manioku jadalnego [ASHMORE 1997]. Ze względu na dużą częstość występowania chorób bulw ziemniaczanych techniki kultur *in vitro* stały się podstawową metodą gromadzenia i długiego przechowywania zasobów genowych tego gatunku [ZAKLUKIEWICZ, SEKRECKA 1994].

Innymi eksplantatami dla kultur *in vitro*, wykorzystywanymi przez banki genów, są pąki pochodzące głównie z gatunków drzewiastych lub też wierzchołki pędów z gatunków zielnych [TOWILL 1988].

Do długiego przechowywania kultur *in vitro* stosuje się dwie podstawowe metody: hodowli w warunkach wolnego wzrostu lub w warunkach kriogenicznych [WITHERS 1991].

Metoda utrzymywania kultur *in vitro* w warunkach wolnego wzrostu polega na zapewnieniu uzyskanym tkankom lub zregenerowanym roślinom (ang. plantlets) minimalnych potrzeb dla ich wzrostu, tak aby maksymalnie ograniczyć ich starzenie się. W tym celu używa się pożywek uboższych w składniki mineralne, obniża się temperaturę hodowli lub zmniejsza się intensywność światła. Stosuje się także inhibitory wzrostu jak kwas abscyzynowy (ABA), inhibitory osmotyczne jak mannitol lub sorbitol oraz retardanty (Alar, CCC). Zmienia się także stężenie hormonów wzrostu, na przykład redukuje się zawartość cytokinin [ASHMORE 1997]. Metoda wolnego wzrostu ma różne ograniczenia dla jej zastosowania. Na przykład u gatunków roślin tropikalnych nie jest możliwe obniżanie temperatury hodowli czy też intensywności światła. Technika ta jest bardzo kosztowna i wymaga dużych nakładów pracy. Kultury *in vitro* narażone są także na różne nieprzewidywalne zmiany czy też porażenie przez patogeny. Stosowanie inhibitorów wzrostu, zwłaszcza ABA, powoduje u nich częstsze występowanie tzw. zmienności somaklonalnej. Dlatego też coraz większe zas-

tosowanie w bankach genów znajduje inna technika, polegająca na kriokonserwacji kultur i tkanek.

Kriokonserwacja umożliwia znacznie dłuższe przechowywanie kultur *in vitro* i przy odpowiednim zabezpieczeniu nie stwarza zagrożenia dla tkanek czy roślin w trakcie zamrażania. Klasyczną techniką kriogeniczną jest stosowanie różnych krioprotektantów (które omówiono w części dotyczącej przechowywania nasion nietypowych i pośrednich) dla zabezpieczenia komórek przed uszkodzeniem przez tworzący się lód czy też przed dyfuzją wody z komórki z powodu zagęszczenia soku komórkowego. Stosuje się także różne warianty tempa zamrażania – bardzo wolne lub ultra szybkie. W ostatnim czasie dużego znaczenia nabrały dwie nowe techniki kriokonserwacji: zeszklenia (vitrification) oraz otoczkowania przy pomocy alginianu wapnia (encapsulation), [TOWILL 1996]. Stosowane mogą być także różne kombinacje tych technik [ASHMORE 1997].

Techniki kriokonserwacji nabrały dużego znaczenia przy przechowywaniu izolowanych tkanek roślin drzewiastych. Drzewa owocowe rozmnaża się głównie wegetatywnie przez szczepienie zrazów lub oczek na odpowiednich podkładkach. Równolegle w dwóch laboratoriach opracowane zostały techniki kriogenicznego przechowywania zrazów jabłoni. Uczeni z laboratoriów przy bankach genów, należących do Departamentu Rolnictwa USA, podjęli próbę przechowywania w ciekłym azocie zrazów jabłoni w formie gałązki zawierającej po dwa pąki dla 313 odmian [FORS-LINE i in. 1993; ROOS i in. 1996]. W zastosowanych przez nich warunkach mogły być tylko przechowywane odmiany odznaczające się dobrą zimotrwałością. Inną technikę opracowali dla zrazów jabłoni TYLER i STUSHNOFF [1988]. Poddawali oni rośliny hartowaniu przeciwko niskim temperaturom, a także specjalnemu traktowaniu – odwodnieniu oraz wstępnemu zamrażaniu tkanek. Dzięki temu zamrożone fragmenty gałązek z pąkami w małym stopniu ulegały uszkodzeniu. Technika ta została w toku dalszych prac jeszcze udoskonalona i obecnie może już być rutynowo wykorzystywana do długiego przechowywania zasobów genowych jabłoni w warunkach kriogenicznych [STUSHNOFF, SEUFFERHELD 1995].

Banki DNA

Przyszłością dla banków genów jest długotrwałe przechowywanie materiału genetycznego na poziomie molekularnym. Wydaje się, że do tych celów będzie mógł służyć kwas dezoksyrybonukleinowy lub jego fragmenty. Można już przechowywać DNA, wyizolowany z żywych lub martwych tkanek i klonowane fragmenty DNA wraz z wektorami jako tzw. biblioteki genów [TOWILL, ROOS 1989]. Specyficzne znaczenie może mieć także przechowywanie cDNA, czyli kopii DNA na matrycy mRNA nie za-

wierającego intronów. Jako pomocnicze materiały do prac z zakresu genetyki molekularnej mogą być także przechowywane wektory, sondy genowe czy startery reakcji PCR. Do przechowywania takich molekularnych materiałów stosuje się zwykle zamrażarki głębokiego mrożenia osiągające temperaturę rzędu -85°C .

Literatura

- ASHMORE S.E. 1997. *Status report on the development and application of in vitro techniques for the conservation and use of plant genetic resources*. Int. Plant Genetic Resources Inst., Rome, Italy: 67 ss.
- BAJAJ Y.P.S. 1985. *Cryopreservation of embryos*. In: Kartha K. K. (ed.). *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*. CRC Press, Boca Raton, FL: 227–242.
- BERJAK P., FARRANT J.M., MYCOCK D.J., PAMMENTER N.W. 1990. *Recalcitrant (homoiohydrous) seeds: the enigma of their desiccation – sensitivity*. Seed. Sci. Technol. 18: 297–310.
- BERJAK P., PAMMENTER N.W. 1997. *Progress in the understanding and manipulation of desiccation – sensitive (recalcitrant) seeds*. In: Ellis R. H., Black M., Murdoch A.J., Hong T.D. (eds.). *Basic and Applied Aspects of Seed Biology*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht: 689–703.
- BOGERS R.J., VAN LEEUWEN P.J. 1992. *The protection of wild bulbs and the propagation of specialty bulbs in Turkey*. Acta Horticult. 325: 821–829.
- BONNER F.T. 1990. *Storage of seeds: potential and limitation for germplasm conservation*. Forest Ecol. and Management. 35: 35–43.
- CHMIELARZ P. 1997. *Preservation of Quercus robur L. embryonic axes in liquid nitrogen*. In: Ellis R.H., Black M., Murdoch A.J., Hong T.D. (eds.). *Basic and Applied Aspects of Seed Biology*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht: 765–769.
- CHMIELARZ P. 1998a. *Reakcja roślin na niskie temperatury. Metody kriokonserwacji komórek i organów roślin w ciekłym azocie*. Wyd. Z. Bartkowiak, Poznań: 48 ss.
- CHMIELARZ P. 1998b. *Kriogeniczne przechowywanie zasobów genowych dębu szypułkowego (Quercus robur L.), sosny zwyczajnej (Pinus sylvestris L.) i świerka pospolitego (Picea abies (L.) Karst.)*. (Streszczenie). Praca doktorska. Instytut Dendrologii PAN, Kórnik: 4 ss.
- CHIN H.F., AZIS M., ANG B.B., HAMZAH S. 1981. *The effect of moisture and temperature on the ultrastructure and viability of Hevea brasiliensis*. Seed Sci. Technol. 9: 411–422.
- CONNOR K.F., TOWILL L.E. 1993. *Pollen – handling protocol and hydration/dehydration characteristics of pollen for application to long-term storage*.

Euphytica. 68: 77–84.

DUMET D., BERJAK P. 1997. *Desiccation tolerance and cryopreservation of embryonic axes of recalcitrant species*. In: Ellis R.H., Black M., Murdoch A.J., Hong T.D. (eds.). *Basic and Applied Aspects of Seed Biology*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht: 771–776.

EBERHART S.A., ROOS E.E., TOWILL L.E. 1991. *Strategies for long-term management of germplasm collections*. In: Falk D.A., Holsinger K.E. (eds.). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford Univ. Press, New York, NY: 135–145.

EBERHART S.A., VERTUCCI C.W., ROOS E.E., TOWILL L.E., STANWOOD P.C. 1995. *Ex situ conservation of plant genetic resources*. In: Keammerer W.R., Hassell W.G. (eds.). *Proc. High Altitude Revegetation Workshop No. 11*. 16–17.03.1994. Colorado Water Resources Res. Inst., Colorado State Univer., Fort Collins, CO: 227–243.

ELLIS R.H., HONG T.D., ROBERTS E.H. 1990a. *An intermediate category of seed storage behaviour ? Coffee*. *J. Exp. Bot.* 41: 1167–1174.

ELLIS R.H., HONG T.D., ROBERTS E.H., TAO K.–L. 1990b. *Low moisture content limits to relations between seed longevity and moisture*. *Ann. Bot.* 65: 493–504.

ELLIS R.H., HONG T.D., ROBERTS R.H. 1991. *Seed moisture content, storage, viability and vigour*. *Correspondence. Seed Sci. Res.* 1: 275–279.

ELLIS R.H., ROBERTS E.H. 1980. *Improved equations for the prediction of seed longevity*. *Ann. Bot.* 45: 13–30.

ELLIS R.H., ROBERTS E.H. 1981. *The quantification of ageing and survival in orthodox seeds*. *Seed Sci. Technol.* 9: 373–409.

FORD-LLOYD B., JACKSON M. 1986. *Plant Genetic Resources. An Introduction to their Use*. E. Arnold, London: 146 ss.

FORSLINE P.L., STUSHNOFF C., TOWILL L.E., WADDELL J.W., LAMBOY W.F. 1993. *Pilot project to cryopreserve dormant apple (Malus sp.) buds*. *HortScience*. 28: 478.

GOLLER K., RYBCZYŃSKI J.J. 1994. *Zastosowanie kultur in vitro w wegetatywnym mnożeniu paproci tropikalnych*. *Prace Ogr. Bot. PAN, Seria: Konferencje, Warszawa-Powsin*. 5/6: 309–313.

GOLLER K., RYBCZYŃSKI J.J. 1995. *In vitro culture used for woody fern Cyathea australis (R. Br.). Domin vegetative propagation*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 64: 13–17.

GÓRECKI R.J., KULKA K., PUCHALSKI J. 1998a. *Biochemical aspects of seed deterioration during storage*. In: Gass T., Podyma W., Puchalski J., Eberhart S. A. *Challenges in Rye Germplasm Conservation*. Int. Plant Genetic Resources Inst., Rome, Italy: 37–44.

GÓRECKI R.J., KULKA K., PUCHALSKI J. 1998b. *Mechanizm starzenia się nasion w aspekcie ich długiego przechowywania*. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*

463: 191–210.

GRZESIUK S., GÓRECKI R.J. (red.) 1994. *Fizjologia Plonów. Wprowadzenie do Przechowalnictwa*. Wyd. Akad. Roln.-Techn. Olsztyn: 374 ss.

GRZESIUK S., KULKA K. 1981. *Fizjologia i Biochemia Nasion*. PWRiL, Warszawa: 604 ss.

HANNA W.W., TOWILL L.E. 1995. *Long-term pollen storage*. *Plant Breeding Rev.* 13: 179–207.

HANNA W.W., WELLS H.D., BURTON G.W., MONSON W.G. 1983. *Long-term pollen storage of pearl millet*. *Crop Sci.* 23: 174–175.

HARRINGTON J.F. 1973. *Problems of seed storage*. In: Heydecker W. (ed.). *Seed Ecology*. Butterworths, London: 251–262.

HAWKES J.G. 1991. *The importance of genetic resources in plant breeding*. *Biol. J. Linn. Soc. (London)* 43: 3–10.

HONG T.D., ELLIS R.H. 1996. *A protocol to determine seed storage behaviour*. IPGRI Technical Bull. No. 1, Int. Plant Genetic Resources Inst., Rome, Italy: 62 ss.

IBPGR 1991. *Elsevier's Dictionary of Plant Genetic Resources*. Elsevier, Amsterdam: 187 ss.

IBPGR 1992. *Report of the expert consultation on genebank standards*. 26–29 May 1992. FAO/IBPGR, Rome, Italy: 26 ss.

IPGRI 1993. *Diversity for Development. The Strategy of the International Plant Genetic Resources Institute*. Int. Plant Genetic Resources Inst., Rome, Italy: 62 ss.

KING M.W., ROBERTS E.H. 1979. *The storage of recalcitrant seeds: Achievements and possible approaches*. Int. Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy. (79): 44

KING M.W., ROBERTS E.H. 1980. *Maintenance of recalcitrant seeds in storage*. In: Chin H. F., Roberts E. H. (eds.). *Recalcitrant Crop Seeds*. Tropical Press, Kuala Lumpur: 53–89.

MYCOCK D.J., BERJAK P., PAMMENTER N.W., VERTUCCI C.W. 1997. *Cryopreservation of somatic embryoids of Phoenix dactylifera*. In: Ellis R. H., Black M., Murdoch A. J., Hong T. D. (eds.). *Basic and Applied Aspects of Seed Biology*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht: 75–82.

NIEDZIELSKI M., PUCHALSKI J. 1998. *The effects of different gaseous atmosphere and seed moisture content on viability of rye seeds in long-term storage experiment*. In: Gass T., Podyma W., Puchalski J., Eberhart S. A. (eds.). *Challenges in Rye Germplasm Conservation*. Int. Plant Genetic Resources Inst., Rome, Italy: 24–26.

PAMMENTER N.W., VERTUCCI C.W., BERJAK P. 1991. *Homeohydrous (recalcitrant) seeds: dehydration, the state of water and viability characteristics in Landolphia kirkii*. *Plant Physiol.* 96: 1093–1098.

- PLUCKNETT D.L., SMITH N.J., WILLIAMS J.F., MURTHI-ANISHETTY N. 1987. *Gene Banks and the World's Food*. Princeton Univ. Press, Princeton: 247 ss.
- PUCHALSKI J. 1993. *Izoenzymy jako markery zmian genetycznych w siewkach żyta wywołanych przechowywaniem i regeneracją ziarniaków*. Prace Ogr. Bot. PAN. Seria: Monografie i Rozprawy, Warszawa-Powsin. 4: 87 ss.
- ROBERTS E.H. 1973a. *Loss of seed viability. Chromosomal and genetical aspects*. Seed Sci. Technol. 1: 515–527.
- ROBERTS E.H. 1973b. *Predicting the storage life of seeds*. Seed Sci. Technol. 1: 499–514.
- ROBERTS E.H. 1975. *Problems of long-term storage of seed and pollen for genetic resources conservation*. In: Frankel O.H., Hawkes J.G. (eds.). *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow*. Cambridge Univ. Press, Cambridge: 262–295.
- ROBERTS E.H. 1991. *Genetic conservation in seed banks*. Biol. J. Linn. Soc. (London). 43: 23–29.
- ROBERTS E.H., ABDALLA F.H. 1968. *The influence of temperature, moisture and oxygen on period of seed viability in barley, broad beans, and peas*. Ann. Bot. 32: 97–117.
- ROBERTS E.H., ELLIS R.H. 1989. *Water and seed survival*. Ann. Bot. 63: 39–52.
- ROOS E.E. 1988. *Genetic changes in a collection over time*. HortScience. 23: 86–90.
- ROOS E. E. 1989. *Long-term seed storage*. Plant Breeding Rev. 7: 129–158.
- ROOS E.E., TOWILL L.E., WALTERS C.W., BLACKMAN S.A., STANWOOD P.C. 1996. *Preservation techniques for extending the longevity of plant tissues*. In: Stuess T. F., Sohmer S. A. (eds.). *Sampling the Green World. Innovative Concepts of Collection, Preservation, and Storage of Plant Diversity*. Columbia Univ. Press, New York: 157–204.
- SIMABUKURO E.A., DYER A.F., FELIPPE G.M. 1998. *The effect of sterilization and storage conditions on the viability of the spores of Cyathea delgadii*. Amer. Fern J. 88: 72–80.
- SMITH R.D. 1992. *Seed storage, temperature and relative humidity. Correspondence*. Seed Sci. Res. 2: 113–116.
- SPECHT C.-E., KELLER E. R. J., FREYTAG U., HAMMER K., BÖRNER A. 1997. *Survey of seed germinability after long-term storage in the Gatersleben genebank*. Plant Genet. Res. Newsl. 111: 64–68.
- SPECHT C.-E., FREYTAG U., HAMMER K., BÖRNER A. 1998. *Survey of seed germinability after long-term storage in the Gatersleben genebank (part 2)*. Plant Genet. Res. Newsl. 115: 39–43.
- STANWOOD P.C. 1985. *Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation*. In: Kartha K.K. (ed.). *Cryopreservation of Plant Cells and*

Organs. CRC Press, Boca Raton, FL: 199–226.

STANWOOD P.C., BASS L.N. 1981. *Seed germplasm preservation using liquid nitrogen*. Seed Sci. Technol. 9: 423–437.

STANWOOD P.C., SOWA S. 1995. *Evaluation of onion (*Allium cepa* L.) seed after 10 years of storage at 5, -18, and -196°C*. Crop Sci. 35: 852–856.

STEINER A.M., RUCKENBAUER P. 1995. *Germination of 110-year-old cereal and weed seeds, the Vienna sample of 1877. Verification of ultra-dry storage at ambient temperature*. Seed Sci. Res. 5: 195–199.

STUSHNOFF C. 1991. *Cryopreservation of fruit genetic resources – Implications for maintenance and diversity during conservation*. HortScience 26: 518–522.

STUSHNOFF C., SEUFFERHELD M. 1995. *Cryopreservation of apple (*Malus species*) genetic resources*. In: Bajaj Y. P. S. (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 32. Cryopreservation of Plant Germplasm I. Springer Verlag, Heidelberg: 87–101.

TOWILL L.E. 1985. *Low temperature and freeze/vacuum – drying preservation of pollen*. In: Kartha K. K. (ed.). Cryopreservation of Plant Cells and Organs. CRC Press, Boca Raton, FL: 171–198.

TOWILL L.E. 1988. *Genetic considerations for germplasm preservation of clonal material*. HortScience 23: 91–95.

TOWILL L.E. 1996. *Vitrification as a method to preserve shoot tips*. In: Gray D. J., Trigiano R. N. (eds.). Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. CRC Press, Boca Raton, FL: 297–304.

TOWILL L.E., ROOS E. E. 1989. *Techniques for preserving of plant germplasm*. In: Knutson L., Stoner A. K. (eds.). Biotic Diversity and Germplasm Preservation. Global Imperatives. Kluwer Acad. Press, Dordrecht: 379–403.

TYLER N.J., STUSHNOFF C. 1988. *The effects of prefreezing and controlled dehydration on cryopreservation of dormant vegetative apple buds*. Can. J. Plant Sci. 68: 1163–1167.

VAVILOV N.I. 1926. *Centers of origin of cultivated plants*. Trudy po prikl. bot. i selek. Vol. 16. In: Vavilov N. I. Origin and Geography of Cultivated Plants. Cambridge Univ. Press, Cambridge (1992): 22–135.

VERTUCCI C.W. 1989. *The effect of low water contents on physiological activities of seeds*. Physiol. Plant. 77: 172–176.

VERTUCCI C.W., BERJAK P., PAMMENTER N.W., CRANE J. 1991. *Cryopreservation of embryonic axes of an homoeohydrous (recalcitrant) seed in relation to calorimetric properties of tissue water*. Cryo-Letters 12: 339–350.

VERTUCCI C.W., LEOPOLD A.C. 1987. *The relationship between water binding and desiccation tolerance in tissues*. Plant Physiol. 85: 232–238.

VERTUCCI C.W., ROOS E.E. 1990. *Theoretical basis of protocols for seed storage*. Plant Physiol. 94: 1019–1023.

- VERTUCCI C.W., ROOS E.E. 1991. *Seed moisture content, storage, viability and vigour*. Seed Sci. Res.: 277–279.
- VERTUCCI C.W., ROOS E.E. 1993a. *Seed storage, temperature and relative humidity: response*. Seed Sci. Res. 3: 215–216.
- VERTUCCI C.W., ROOS E.E. 1993b. *Theoretical basis of protocols for seed storage. II. The influence of temperature on optimal moisture levels*. Seed Sci. Res. 3: 201–213.
- WALTERS C.W., ROOS E.E., EBERHART S.A. 1998. *An analysis of seed storage practices*. In: Gass T., Podyma W., Puchalski J., Eberhart S.A. (eds.). *Challenges in Rye Germplasm Conservation*. Int. Plant Genetic Resources Inst., Rome, Italy: 12–23.
- WESLEY-SMITH J., VERTUCCI C.W., BERJAK P., PAMMENTER N.W., CRANE J. 1992. *Cryopreservation of desiccation – sensitive axes of Camellia sinensis in relation to dehydration, freezing rate, and thermal properties of tissue water*. Plant Physiol. 140: 596–604.
- WITHERS L.A. 1991. *In-vitro conservation*. Biol. J. Linn Soc. (London) 43: 31–42.
- ZAKLUKIEWICZ K.E., SEKRECKA D. 1994. *Kultury in vitro ziemniaka formą przechowywania genotypów i ich potencjalne możliwości dostarczania materiału do hodowli zachowawczej*. Prace Ogr. Bot. PAN. Seria: Konferencje, Warszawa-Powsin 5/6: 347–352.
- ZEDAN H. 1995. *Loss of plant diversity: a call for action*. In: Guarino L., Rao V.R., Reid L. (eds.). *Collecting Plant Genetic Diversity. Technical Guidelines*. CAB Int., Wallingford, UK: 9–14.
- ZENKTELER E. 1992. *Metoda in vitro w rozmnażaniu i okresowym przechowywaniu chronionych oraz rzadkich i ginących gatunków paproci*. Hod. Rośl. i Nasien. 5: 20–30.
- ZOHARY D. 1970. *Centers of diversity and centers of origin*. In: Frankel O. H., Bennett E. (eds.). *Genetic Resources in Plants – Their Exploration and Conservation*. Blackwell Sci. Publ., Oxford-Edinburgh: 33–42.
- ZOHARY D. 1983. *Wild genetic resources of crops in Israel*. Israel J. Bot. 32: 97–127.

Słowa kluczowe: różnorodność genetyczna, banki genów, przechowywanie nasion, kultury *in vitro*, kriokonserwacja, rośliny uprawne.

Streszczenie

Podstawowym zadaniem banków genów *ex situ* jest zachowanie pierwotnej różnorodności genetycznej przechowywanych zasobów genowych. Służy do tego tzw. plazma zarodkowa, którą mogą stanowić zarówno diaspory generatywne, jak

i wegetatywne. U roślin głównym źródłem plazmy zarodkowej są nasiona, przy czym poszczególne gatunki roślin tworzą nasiona o zróżnicowanym okresie żywotności, a także o różnej wrażliwości na wysuszenie i temperaturę. Dla przechowalności wyróżnia się trzy ich kategorie: typowe, nietypowe i pośrednie. Nasiona typowe mogą być odwadniane do niskiej zawartości wody poniżej 5%, co umożliwia ich długie przechowywanie. Pozostałe dwa typy są wrażliwe na odwodnienie i dla zachowania w bankach takich nasion wprowadza się techniki przechowywania ich izolowanych zarodków zygocycznych lub osi zarodkowych. Nasiona typowe mogą zachować wysoką żywotność przez dłuższy okres przy przechowywaniu ich w stanie wysuszonym w temperaturach ujemnych rzędu -20°C lub w warunkach kriogenicznych, na przykład w ciekłym azocie (-196°C) lub w jego parach (-150°C do -180°C). Innym rodzajem plazmy zarodkowej pochodzenia generatywnego jest pyłek, który zachowuje się w trakcie przechowywania podobnie do nasion.

Dla wielu grup roślin, np. wieloletnich oraz rozmnażających się wegetatywnie, różnorodność genetyczna musi być chroniona w formie kultur *in vitro* uzyskiwanych z zarodków (somatycznych i zygocycznych) oraz merystemów i pąków. Kultury przechowuje się przez dłuższy okres czasu w warunkach wolnego wzrostu lub też za pomocą różnych technik kriokonserwacji. Przyszłościowe znaczenie dla banków genów może mieć przechowywanie DNA w formie wyizolowanej z tkanki lub też jako tzw. biblioteki DNA lub cDNA.

LONG-TERM STORAGE OF CROP PLANT GERmplASM – METHODS AND PROBLEMS

Jerzy Puchalski

Botanical Garden – Centre for Biological Diversity Conservation
of the Polish Academy of Sciences, Warszawa

Key words: genetic diversity, gene banks, seed storage, *in vitro* cultures, cryopreservation, crop plants

Summary

The main goal of *ex situ* gene banks is the conservation of primary genetic diversity of stored genetic resources. For this purpose it is used so called germplasm, which could be represented by generative or vegetative propagules. The main source of plant germplasm are seeds, however the particular species produce seed with variable life span and with the different sensitivity to dehydration and temperature. For the storage purposes three seed categories are distinguished: orthodox, recalcitrant and intermediate. The orthodox seeds could be dried to low moisture content below 5%, what gives a possibility of their long-term storage. The remaining two types (especially recalcitrant seeds) are sensitive to dehydration and for their long-term storage other techniques must be applied – such as storage of isolated zygotic embryos or embryonic axes. Orthodox seeds

could preserve their high viability for long time, if they are stored as dried and in low (-20°C) or ultra-low temperature under cryogenic conditions, for example in liquid nitrogen (-196°C) or in vapour of LN_2 (-150°C to -180°C). The second type of generative germplasm is pollen, which behaviour is, in case of storage, similar to the seeds.

For several groups of plants, like perennials or plants vegetatively propagated, the *in vitro* cultures derived from embryos (somatic or zygotic), meristems or buds must be applied for their genetic diversity conservation. Cultures are preserved for longer periods using slow growth or various cryopreservation techniques. The future of gene banks might be connected with DNA storage: in form of extracted DNA or as DNA or cDNA libraries.

Doc. dr hab. Jerzy **Puchalski**

Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej PAN

ul. Prawdziwka 2

02-973 Warszawa 76

tel.: (0-22) 754-26-10, fax: (0-22) 757-66-45

c-mail: obpan@ikp.atm.com.pl