

ELŻBIETA BORKOWSKA

Przechowywanie tkanek roślinnych w niskiej temperaturze

Wstęp

Zanieczyszczenie środowiska naturalnego w wyniku rabunkowej gospodarki człowieka już dawno stało się faktem. Niezwykle groźną konsekwencją tego zjawiska jest zamieranie wielu gatunków fauny i flory prowadzące często do całkowitego ich wyginięcia. Alarmujące dane napływające z wielu regionów świata spowodowały, że rozpoczęto tworzenie banków genów roślin. Celem takich placówek jest zachowanie zasobów genowych cennych gatunków lub populacji. Rośliny chronić można w warunkach naturalnych — *in situ*, czyli w rezerwach przyrody, parkach narodowych, wyłączonych drzewostanach nasiennych oraz przez odnowienie z samosiewu. Metody wymagające ingerencji człowieka — *ex situ*, to kolekcje klonów, plantacje nasienne i plantacyjne uprawy nasienne, długotrwałe przechowywanie nasion w chłodniach i ciekłym azocie, zarodków i tkanek w ciekłym azocie, rozmnażanie tkanek *in vitro* oraz przechowywanie ich w niskiej temperaturze (19).

Zastosowanie i zalety przechowywania tkanek w niskiej temperaturze

Przechowywanie tkanek roślin w temperaturze od 0 do 10°C

Jest to praktyczny sposób zachowania wyselekcjonowanych genotypów, które muszą być rozmnażane wegetatywnie. Znaczną zaletą jest tu zużycie małej powierzchni przechowalniczej. Obliczono, że 2000 próbek z roślinami zajmuje 3,5 m³ chłodni, podczas gdy plantacyjny bank klonów potrzebuje aż 4 ha (2).

Spowolnienie procesów metabolicznych w porównaniu z kulturami *in vitro* uprawianymi w optymalnych warunkach powoduje, że rośliny mogą być znacznie rzadziej przesadzane ze starej pożywki na nową. Normalnie w technikach *in vitro* pasażę wykonywane są co 2–4

tygodnie. W temperaturze bliskiej 0°C wystarczy przesadzanie roślin raz w ciągu roku. Powoduje to znaczną oszczędność pracy i materiałów (odczynniki chemiczne, agar itp.) oraz, co jest ważne zwiększa stabilność genetyczną przechowywanego materiału, gdyż im częstsze pasażowanie *in vitro* tym większa możliwość zmian genetycznych (2, 4).

W kulturach tkankowych materiał roślinny może być namnażany przez cały rok, umieszczony w chłodni i wykorzystywany w sprzyjającym okresie — np. wiosną ukorzeniany i wysadzany w szkółce. Zaobserwowano, że rośliny przechowywane w chłodni wykazują często większą odporność na niskie temperatury po przeniesieniu do warunków naturalnych (14).

Przechowywanie tkanek roślinnych w temperaturze -196°C (ciekły azot)

Zatrzymanie procesów metabolicznych powoduje, że tkanki mogą być przechowywane praktycznie w nieograniczonym czasie. Co prawda niektórzy autorzy zwracają uwagę na działanie promieniowania kosmicznego na przechowywane próbki, nie wydaje się to jednak bardzo znaczące (9).

Temperatura kriogeniczna stwarza możliwość przechowywania nasion, zarodków oraz innych tkanek roślin z grupy recalcitrant. Nasiona przeznaczone do przechowywania można podzielić na dwie grupy, czyli: orthodox i recalcitrant (25). Pierwszą z nich stanowią rośliny, których nasiona można odwozić do 5% zawartości wody, bez obniżenia ich żywotności. Nasiona takie mogą być stosunkowo łatwo przechowywane przez wiele lat w chłodniach.

Drugą grupę stanowią rośliny, których nasiona są bardzo uwodnione i wrażliwe na suszenie. Nasiona takie mogą być przechowywane tylko wtedy, gdy zapewni im się odpowiednio wysoką wilgotność otoczenia. Ale nawet w optymalnej dla siebie wilgotności szybko tracą żywotność (tygodnie — miesiące). Są to głównie gatunki tropikalne i subtropikalne m.in. palma kokosowa i oleista, kawa, kakao i inne (9). W Polsce do drzew grupy recalcitrant należą dęby, jawor i kasztanowiec. Gatunki te nie mogą być długoterminowo przechowywane tradycyjnymi metodami. Żołądźcie wysuszone do krytycznej zawartości wody tzn. 40% (dalsze suszenie powoduje drastycznie spadek żywotności) mogą być przechowywane w temperaturze -3°C do 3 lat (28). Alternatywną drogą może tu być zatem przechowywanie w ciekłym azocie.

Zamrażanie tkanek jest nową metodą zachowania bogactwa genetycznego gatunków chronionych czy szczególnie cennych populacji. Istnieje już i stale się powiększa bank genów chronionych i zagrożonych roślin zielnych w PAN w Powsinie.

W temperaturze ciekłego azotu można przechowywać tkanki wyselekcjonowanych klonów, które mogą być rozmnażane wyłącznie wegetatywnie. Przechowywany materiał wolny jest od patogenów i stanowi on bardzo wygodną (ze względu na sterylność i małe rozmiary) formę międzynarodowej wymiany materiału roślinnego (3).

Sposoby przechowywania materiału roślinnego w niskiej temperaturze

Przechowywanie tkanek *in vitro* w temperaturze od 0 do 10°C

Chłodni używa się głównie do przechowywania pędów oraz w mniejszym stopniu kalusów. Duże znaczenie ma stan fizjologiczny przechowywanych tkanek. Muszą być one młode, zdrowe, w fazie aktywnego wzrostu. Istnieją różnice między gatunkami a nawet klonami. Materiał przed przeniesieniem do chłodni pasażuje się na świeżą pożywkę — najczęściej taką samą jaka jest normalnie stosowana dla danej kultury (2). W pewnych przypadkach zaobserwowano, że dodanie cukru do pożywki zwiększa przeżywalność roślin. Ma to znaczenie głównie dla roślin tropikalnych, wrażliwych na chłód. Badania prowadzone z przechowywaniem tkanek drzewa chinowego (15) wykazały, że dodanie 1–4% mannitolu zwiększyło przeżywalność materiału.

Z czynników zewnętrznych wpływ na to czy przechowywanie roślin zakończy się sukcesem czy nie, mają temperatura i światło. Optimum temperatury zależy od naturalnej tolerancji badanego gatunku na niską temperaturę. I tak, wrażliwe na chłód tkanki roślin tropikalnych i subtropikalnych powinny być przechowywane w temperaturze od 9 do 12°C, podczas gdy bardziej wytrzymałe gatunki iglaste wymagają temperatury przechowywania od 0 do 4°C (2). Rola światła nie jest jeszcze w pełni zbadana. Istnieje współdziałanie temperatury i napromieniowania na wyniki przechowywania. Przy niskiej temperaturze w chłodni (bliskiej 0°C) kultury mogą być trzymane w ciemności, natomiast przy przechowywaniu tkanek w temperaturze kilku stopni, konieczny jest kilkunastogodzinny fotoperiod (2). Pędy śliwy domowej przechowywane w temperaturze –3°C wykazywały większą przeżywalność gdy trzymano je w ciemności, podczas gdy pędy umieszczone w temperaturze 4 i 8°C wymagały szesnastogodzinnego fotoperiodu (20).

Długość okresu przechowywania tkanek bez utraty ich żywotności zależy od gatunku i rodzaju użytego materiału roślinnego. Kultury embriogenne eukaliptusa zachowały embriogenność po dziewięciomiesięcznym przechowywaniu w ciemności w temperaturze 4°C (22). Podobnie, z pozytywnym skutkiem przechowywano m.in. pędy winorośli w temperaturze 12°C przez 11 miesięcy (11), czy wierzchołki wzrostu pędów kiwi w temperaturze 4°C i 8°C przez rok (21). Ogólnie rzecz biorąc dla wielu gatunków istnieje możliwość długoterminowego przechowywania w chłodni pod warunkiem, że kultury raz do roku przesadzane będą na świeżą pożywkę. Część autorów twierdzi, że w ten sposób materiał roślinny może być przechowywany przez kilka 2–5 lat, inni, że czas ten jest znacznie dłuższy — do kilkunastu lat (2). W Polsce w ten sposób prowadzone są m.in. kolekcje roślin sadowniczych, storczyków oraz ziemniaków.

Metoda przechowywania kultur *in vitro* w temperaturze od 0 do 10°C jest przydatna ze względu na wysoką przeżywalność. Przy właściwym dobraniu parametrów tzn. materiału roślinnego i warunków przechowywania, osiąga się świetne rezultaty. Przechowywane pędy wykazują zdolność do regeneracji tkanek nawet do 100%, po ich przeniesieniu do wyższej temperatury (5).

Przechowywanie tkanek w ciekłym azocie (-196°C)

Proces ten przedstawia zamieszczony dalej schemat (ryc.).



RYC. Schemat zamrażania i przechowywania materiału roślinnego w ciekłym azocie (3- modyfikacja)

Bardzo duże znaczenie w procesie zamrażania i przechowywania ma rodzaj zastosowanego materiału roślinnego. Najlepsze do tego celu są młode komórki merystematyczne o gęstej niezakuolizowanej cytoplazmie czyli małej zawartości wody niezwiązanej (9), o cienkiej ścianie komórkowej wykazujące aktywny wzrost (3). Ten typ reprezentują m.in. komórki kalusa. Prowadzone były badania nad zamrażaniem kalusa embriogennego drzew leśnych m.in. świerka pospolitego i świerka białego (10, 13, 18), z którego po rozmrożeniu i odpowiedniej hodowli *in vitro* uzyskiwano zarodki somatyczne a następnie rośliny. Badania prowadzone na świerku pospolitym wykazały (10), że korzystniej jest zamrażać kalus w postaci zawiesiny niż zwartej tkanki.

Lepiej przechowują się zawiesiny protoplastowe niż komórkowe, ponieważ wyeliminowane są napięcia międzykomórkowe związane z istnieniem twardej ściany, powstające w procesie zamrażania; stwierdzono np., że przeżywalność zawiesiny protoplastowej marchwi wynosiła 68% a komórkowej 38% (3). Bardzo dobrze przechowuje się pyłek oraz suche (poniżej 5% zawartości wody) nasiona. Badania dla kilkunastu gatunków drzew wykazały, że liczba kiełkujących nasion i pyłku po wyjęciu z ciekłego azotu była bardzo podobna (w pewnych przypadkach nawet większa) do próbki kontrolnej (1, 16). Prowadzone próby z zamrażaniem całych nasion dębu wykazały ogromną nieskuteczność, po pierwsze ze względu na wrażliwość żołędzi na suszenie, po drugie ze względu na duży rozmiar nasion — w czasie zamrażania powstają znaczne różnice temperatur między wewnętrzną a zewnętrzną częścią nasienia co prowadzi do naprężeń i w konsekwencji do uszkodzeń (16).

Obecnie podejmowane są próby zamrażania wyizolowanych osi zarodkowych (7, 8, 12), oraz zarodków somatycznych powstałych w wyniku somatycznej embriogenezy (17). Przy wyborze materiału do zamrażania trzeba brać pod uwagę czy jest opracowana technologia regeneracji rośliny *in vitro* z konkretnej zamrażanej tkanki. Dla celów praktycznych nie wystarczy opracowanie samego sposobu zamrażania, ale musi być znaleziona jednocześnie metoda regeneracji rośliny. Dlatego przechowywanie tkanek w ciekłym azocie nie może być odizolowane od technik rozmnażania *in vitro*.

Materiał roślinny przeznaczony do krioprezerwacji należy odpowiednio przysposobić. Przeprowadza się to w ten sposób, że próbki umieszcza się w roztworach krioprotektantów na określony czas; zależy on od rodzaju i stężenia krioprotektanta, gatunku i rodzaju tkanki, i wynosi od kilkunastu minut do kilkunastu godzin.

Działanie krioprotektantów nie jest dokładnie poznane. Wiadomo że:

- jako substancje o wysokim potencjale osmotycznym odwadniają komórki, co zapobiega powstawaniu lodu krystalicznego w ich wnętrzu w czasie zamrażania,
- działają na struktury komórkowe jak impregnatory, zapobiegając zmianom w ich budowie; ważne jest, że krioprotektanty chronią aktywne centra enzymatyczne (9).

Powszechnie używanymi krioprotektantami są m.in.: dwumetylowy tlenek siarki (DMSO), glikol polietylenowy, glukoza i dwucukry — sacharoza, mannitol, sorbitol. Znacznie korzystniejsze jest stosowanie kombinacji kilku krioprotektantów niż pojedynczych związków chemicznych, po pierwsze dlatego, że niektóre z nich w wysokich stężeniach są fitotoksyczne (np. DMSO powyżej 5%), a po drugie mieszaniny kilku różnych substancji wykazują wszechstronniejsze działanie na komórkę (6, 13). W przypadku zamrażania suchych nasion czy pyłku, krioprotektanty nie muszą być stosowane.

W pewnych przypadkach działanie krioprotektantów można zastąpić lub uzupełnić przez odpowiednie manipulowanie niską temperaturą przed zanurzeniem tkanek w ciekłym azocie. Polega to na długotrwałym i stopniowym przechładzaniu tkanek. Materiał, który ma być zamrożony, w ciągu kilku godzin do kilku tygodni stopniowo umieszczany jest w coraz niższej temperaturze. W ten sposób hartowano m.in. kalus osiki (3) oraz merystemy

gruszy (24). Podczas bardzo wolnego chłodzenia, w komórkach zachodzi wiele zmian prowadzących do zabezpieczenia ich struktur. Zwiększa się przepuszczalność błon komórkowych (zmiany w budowie tłuszczów) dla wody co sprzyja jej wypływowi na zewnątrz (wolna woda wewnątrzkomórkowa zamarzając mogłaby uszkodzić struktury komórkowe), wzrasta ilość wody związanej przez zwiększenie zawartości koloidów hydrofilowych (niska temperatura stymuluje aktywację hydrolaz co powoduje m.in. rozkład skrobi na cukry rozpuszczalne, a białek złożonych na białka hydrofilowe), cukry (sacharoza, mannitol) łączą się z białkami i tworzą kompleksy zabezpieczające centra aktywne enzymów (27).

Znacznie częściej stosowanym sposobem chłodzenia tkanek jest wolne zamrażanie. Optymalna szybkość zamrażania wynosi $0,3-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, w zależności od gatunku i rodzaju zamrażanej tkanki (3, 4, 6, 13). Podczas tego procesu lód krystalizuje w przestrzeniach międzykomórkowych, ponieważ wewnątrz komórek — głównie młodych o gęstej cytoplazmie jest duże stężenie soku komórkowego, który obniża punkt zamarzania wody. Powstający lód pozakomórkowy znacznie obniża potencjał wodny w przestrzeniach międzykomórkowych, dzięki czemu woda dyfunduje z wnętrza komórki i kondensuje się na istniejących kryształach lodu (27). Komórki muszą być odwodnione na tyle, aby krystalizacja wody pozostałej w komórce nie spowodowała uszkodzeń w wyniku zamrażania, a jednocześnie nie nastąpił zbyt wysoki wzrost stężenia substancji chemicznych, co wywołałoby wzrost toksyczności w komórce (9).

Trzeci, szybki sposób zamrażania tkanki polega na bezpośrednim zanurzeniu jej w ciekłym azocie. Ponieważ proces przebiega bardzo szybko, lód krystalizuje się w mikrokryształy, które nie zagrażają strukturalnie komórkom. Metoda ta zalecana jest jednak głównie dla tkanek suchych. W ten sposób zamraża się nasiona i pyłek m.in. licznych gatunków drzew leśnych (1, 16), choć były prowadzone ze skutkiem pozytywnym próby zamrażania m.in. komórek morwy i merystemów pomidora (3, 6).

Działanie niskiej temperatury na komórkę z punktu fizjologii równoznaczne jest z jej odwadnianiem, dlatego musi być ono przeprowadzone bardzo ostrożnie. Trzeba pamiętać, że nadmierne odwodnienie może spowodować nieodwracalne zmiany m.in.: zniszczenie struktury białka. Brak płaszcza wodnego sprzyja zbliżeniu łańcuchów peptydowych, następuje utlenienie grup tiolowych i powstanie bardzo mocnych wiązań siarczkowych (27). Poza tym mogą się pojawić mechaniczne uszkodzenia protoplastu. Zwłaszcza w komórkach o dużych wakuolach czyli dużej ilości wody niezwiązanej, powstają zniekształcenia, pofałdowania i zgniecenia, co prowadzi do dużych napięć mechanicznych i uszkodzenia organelli (3).

Czasami wymagane odwodnienie osiągnąć jest bez użycia krioprotektantów czy sterowania niską temperaturą. Na przykład, zarodki araukarii suszone były w powietrzu o wilgotności około 20% i następnie umieszczone w ciekłym azocie (23). Odwadnianie tkanek w suchym powietrzu jest metodą dość drastyczną, prowadzącą niekiedy do uszkodzeń szczególnie delikatnych tkanek. Dlatego fragmenty tkanek przeznaczone do krioprezerwacji pokrywa się warstwą ochronną alginianu i dopiero potem stopniowo suszy (14).

W temperaturze ciekłego azotu zablokowane zostają wszystkie procesy metaboliczne. O ile komórka nie została uszkodzona w procesie mrożenia, w trakcie przechowywania nie

zachodzą w niej żadne zmiany. Problemy pojawiają się ponownie przy rozmrażaniu materiału. Proces ten musi przebiegać na tyle szybko, aby nie było możliwości tworzenia się jąder lodowych w komórkach i rekrytalizacji wody uwalnianej w czasie tajania. Prowadzone były badania z szybkim (w łaźni wodnej) i wolnym (w powietrzu) rozmrażaniem materiału roślinnego. W drugim przypadku, kiedy układ jest szalenie niestabilny, uwalniana woda często ponownie krystalizowała się wywołując uszkodzenia komórki. Dlatego zalecane jest rozmrażanie tkanek w łaźni wodnej w temperaturze 40°C (26).

Przeżywalność przechowywanego materiału bada się różnymi metodami chemicznymi. Powszechnie stosuje się trzy: fluorescencyjną, barwienie chlorowodorkiem tetrazoliny i barwienie błękitem Evansa (3, 6). Metody te są jednak często zwodne, ponieważ kultury wyjęte z ciekłego azotu i rozmrożone przeżywają swoisty szok. Jest to stan trwający do kilku miesięcy, kiedy to nie zachodzą procesy życiowe, komórki podczas barwienia zachowują się jak uszkodzone, a po pewnym czasie zaczynają wzrost i rozwój (3, 13, 16). Dlatego w zasadzie jednoznacznym wskaźnikiem śmierci jest brązowienie kultur kalusa czy merystemów lub brak kiełkowania pyłku i nasion.

Zakład Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych IBL od lipca 1994 r. jest wyposażony w urządzenie do krioprezerwacji firmy Cryoson. Planowane są badania w zakresie zamrażania i przechowywania tkanek roślinnych w ciekłym azocie.

Literatura

1. **Ahuja M.R.:** Storage of forest tree germplasm in liquid nitrogen (-196°C). *Silvae Genetica* 35, 5-6, 1986.
2. **Aitken-Christie J., A.P. Singh:** Cold storage of tissue. In: *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Edited by J.H. Bonga, Don J. Durzan, Martinus Nijhoff Publishers, vol. 2, 285-303, 1987.
3. **Bajaj Y.P.S.:** Technology and prospects of cryopreservation of germplasm. *Euphytica* 28, 267-285, 1979.
4. **Bonga J.M., P. von Aderkas:** In vitro culture of trees. Kluwer Academic Publishers, vol. 38, 151-153, 1992.
5. **Chalupa V.:** Temperature. In: *Cell and tissue culture in forestry*. Edited by J.M. Bonga, Don J. Durzan. Martinus Nijhoff Publishers, vol. 1, 142-151. 1987.
6. **Cheh T.H.H., K.K. Kartha:** Cryopreservation of woody species. In *Cell and Tissue culture in Forestry*. Edited by J.M. Bonga, Don J. Durzan. Martinus Nijhoff Publishers, vol. 2, 305-319, 1987.
7. **Chmielarz P.:** Zachowanie różnorodności genetycznej dębu szypułkowego. *Sylwan* 4, 67-70, 1994.
8. **Creasor Pence V.:** Desiccation and the survival of *Aesculus*, *Castanea*, and *Quercus* embryo axes through cryopreservation. *Cryobiology* 29, 391-399, 1992.

9. **Engelmann F.:** In vitro conservation of tropical plant germplasm — a review. *Euphytica* 57, 227–243, 1991.
10. **Galerie M., J. Dereuddre:** Survie de cals embryogenes d'epicea apres congelation a -196 C. *Annales de Recherches Sylvicoles, AFOCEL, France*, 7–33, 1988.
11. **Galzy R., D. Compan:** Growth and nutrition of grepevine during in vitro long — term storage., *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 13, 229–237, 1988.
12. **Gonzales-Benito M.E., C. Perez-Ruiz:** Cryopreservation of *Quercus faginea* embryonic axes. *Cryobiology* 29, 685–690, 1992.
13. **Gupta P.K., D.J. Durzan, B.J. Finkle:** Somatic polyembriogenesis in embryogenic cell masses of *Picea abies* (Norway spruce) and *Pinus taeda* (loblolly pine) after thawing from liquid nitrogen. *Can. J. For. Res.* 17, 1130–1134, 1987.
14. **Hellergren J.:** Cold acclimation of suspension cultures of *Pinus sylvestris* in response to light and temperature treatments. *Plant Physiol.* 72, 992–995, 1983.
15. **Hunter C.S.:** In vitro propagation and germplasm storage of cinchona. In: *Plant tissue culture and its agricultural applications*. Edited by L.A. Withers, P.G. Alderton. Butterworths England, 291–300, 1986.
16. **Jorgensen J.:** Conservation of valuable gene resources by cryopreservation in some forest tree species. *J. Plant Physiol.* 136, 373–376, 1990.
17. **Jorgensen J.:** Versuche zur Pollenregeneration zum Zwecke der Generhaltung bei Waldbaumen. *Mitteilungen der Bundesforschungsanstalt für Forst — und Holzwirtschaft, Habburg* 164, 391–395, 1990.
18. **Kartha K.K., L.C. Fowke, N.L. Leung K.L. Caswell, J. Hakman:** Induction of somatic embryos and plantlets from cryopreserved cell cultures of white spruce (*Picea glauca*). *J. Plant Physiol.* 132, 529–539, 1988.
19. **Korczyk A.:** Perspektywy rozwoju leśnej genetyki stosowanej. *Postępy Techniki w Leśnictwie* 51, 16–21, 1992.
20. **Marino G., P. Rosati, F. Segrati:** Storage of in vitro cultures of *Prunus* rootstocks. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 5, 73–78, 1985.
21. **Monette P.L.:** Cold storage of kiwifruit shoot tips *in vitro*. *Hort. Science* 21, 1203–1205, 1986.
22. **Muralidharan E.M., P.K. Gupta, A.F. Mascarenhas:** Plant production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. *Plant Cell Rep.* 8, 41–43, 1989.
23. **Pritchard H.W., F.G. Prendergast:** Effects of desiccation and cryopreservation on the *in vitro* viability of embryos of the recalcitrant seed species *Araucaria hunsteinii* K. Schum. *J. Exp. Bot.* 37, 1388–1397, 1986.
24. **Reed B.M.:** Survival of *in vitro* grown apical meristemsof *Pyrus* following cryopreservation. *Hort. Science* 25, 111–113, 1990.

25. **Roberts E.H.:** Predicting the viability of seeds. *Seed Sci. Technol.* 1, 499–514, 1973.
26. **Sakai A.:** Cryopreservation of germplasm of woody plants. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Edited by Y.P.S. Bajaj. Springer — Verlag Berlin Heidelberg vol. 1, 113–129, 1986.
27. **Salisbury F.B., C. Ross:** *Fizjologia roślin*. PWRiL, Warszawa.
28. **Suszka B., T. Tylkowski:** Storage of acorns of the English oak (*Quercus robur* L.) over 1–5 winters. *Arboretum Kórnickie* 25, 199–229, 1980.

*Z Zakładu Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych
Instytutu Badawczego Leśnictwa
w Warszawie*