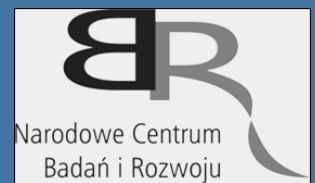




## ZASTOSOWANIE METOD KRIOGENICZNYCH W CELU UTWORZENIA BANKU GENÓW HISTORYCZNYCH ODMIAN JABŁONI N R12 0038 06/2009



Przez wiele lat naturalną formą gromadzenia oraz ochrony cennych genotypów roślin wieloletnich, w tym form lokalnych, było prowadzenie kolekcji polowych, który to sposób stanowi do dziś dnia podstawę wspomnianej ochrony. 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 kolekcji. Wysokie są również nakłady związane z organizacją miejsca uprawy oraz właściwą dla gatunku agrotechniką.

Inną z metod zachowania zasobów genowych roślin może być wykorzystanie techniki *in vitro* obejmującej hodowlę prowadzone w warunkach spowolnionego wzrostu. Dużym atutem w tym przypadku jest miniaturyzacja kolekcji, i jej w dużym stopniu niezależność od warunków środowiskowych. Wadą 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 obszernej kolekcji w warunkach *in vitro* wymaga także znacznych nakładów finansowych (odczynniki, prowadzenie laboratorium) jak i wymaga wysokiej 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 ( $-150^{\circ}\text{C}$ ) 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 ma to miejsce w przypadku kolekcji *in vitro*. Także tu występuje korzystne „zmniejszenie jej rozmiaru” oraz ograniczenie wydatków ponoszonych na obsługę i 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 jej w warunkach kriogenicznych zapewnia wysoki poziom bezpieczeństwa obiektów dzięki ograniczeniu do minimum oddziaływań środowiskowych.

W latach 2009 – 2012 w PAN Ogrodzie Botanicznym - Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej w Powsinie utworzono, dzięki dotacji Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, kriogeniczny bank genów historycznych odmian jabłoni (*Malus domestica* Borkh.). Wykorzystano w tym celu techniki kriogeniczne (przechowywanie materiału roślinnego w ultraniskich temperaturach par ciekłego azotu), do zamrożenia pąków spoczynkowych. Równoległe starano się optymalizować metodykę gromadzenia materiału roślinnego i szczegółowych wymogów metodycznych. W toku prac zabezpieczono 150 obiektów, w tym 121 odmian jabłoni pochodzących z kolekcji polowych z różnych rejonów Polski.

Zbiór materiału roślinnego, jakim były jednoroczne pędy, prowadzono zimą. Zrazy dzielono na fragmenty o zbliżonej długości i średnicy, zawierające jeden pąk. Poddawano je następnie częściowemu odwadnianiu (w temperaturze  $-3,5^{\circ}\text{C}$ ) do zawartości wody ok. 30% (fot. 1). Po osiągnięciu założonego poziomu wilgotności, przystępowano do właściwego procesu zamrażania. Temperaturę obniżano w sposób kontrolowany od  $0^{\circ}\text{C}$  do  $-32^{\circ}\text{C}$  z szybkością  $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (fot. 3). Próbkę utrzymywano w tej temperaturze przez 24h. Po upływie doby próbki przenoszono do zbiorników przechowalniczych i utrzymywano w fazie gazowej ciekłego azotu (fot. 4).

Dla kontroli żywotności zamrożonych pąków rozmrażano część z nich w łaźni wodnej o temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  przez 5 minut. Po rozmrożeniu fragmenty pędów z pąkami uwadnianiano w wilgotnym torfie, w temperaturze  $2^{\circ}\text{C}$ , przez 10 dni. Żywotność pąków i sąsiadujących tkanek oceniano wizualnie na podstawie obecności zmian nekrotycznych (zbrązowienia) na przekrojach podłużnych fragmentów (fot. 2) i finalnie, przez okulizację pąków na podkładkach wegetatywnych (M26) (fot. 5). Dla każdej odmiany okulizowano trzy rozmrożone pąki na każdej z dwóch podkładek.



5 Malus 'Kalwila Biała Zimowa' [Sk 13]