

Metody przechowywania nietrwałych nasion

# Życie utajone

PAWEŁ CHMIELARZ

Instytut Dendrologii, Kórnik  
Polska Akademia Nauk  
pach@man.poznan.pl

**Krzepkie drzewa, takie jak kasztanowiec czy dąb, wytwarzają zadziwiająco nietrwałe nasiona. Na szczęście ich przechowywanie jest możliwe dzięki nowoczesnym metodom kriokonserwacji**

Rośliny nago- i okrytonasienne zapewniają trwanie swoim gatunkom dzięki wytwarzaniu nasion. Dojrzałe i w pełni wykształcone nasiona są zarzewiem ukrytego życia, dają początek nowym pokoleniom. Okres, w ciągu którego nasiona są jeszcze zdolne do skielkowania i wytworzenia siewki jest, wbrew powszechnemu mniemaniu, bardzo krótki w przypadku niektórych gatunków - w optymalnych warunkach trwa od kilku tygodni do kilku miesięcy. Znamy również wiele roślin, których nasiona zachowują zdolność do skielkowania nawet przez kilka, kilkanaście lub kilkadziesiąt lat! W trosce o utrzymanie różnorodności rodzimych gatunków próbujemy opracować skuteczne metody wydłużania życia nasion, a co za tym idzie wydłużania czasu ich przechowywania.

Utrzymywanie bądź utrata żywotności w miarę upływu czasu związana jest głównie z wrażliwością nasion na odwodnienie. Jak nietrwałe są nasiona kasztanowca przekonali się zapewne ci wszyscy, którym zdarzyło się przynieść do domu zebrane kasztany, a dopiero po kilku dniach wysiać je do doniczek, by skielkowały. Próby te prawdopodobnie nie powiodły się, ponieważ nadmiernie przesuszone nasiona były martwe już w momencie wysiewu. Nasiona sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) czy klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) przetrzymane w podobnych warunkach zachowują jednak swoją żywotność przez znacznie dłuższy okres.

## W mroźnych oparach

Różna odporność nasion na wysuszenie sprawia, że nie wszystkie mogą być, w celu tworzenia rezerw gospodarczych lub zachowania zasobów genowych, przechowywane w temperaturze od  $-10^{\circ}\text{C}$  do  $-20^{\circ}\text{C}$ . Przełom XX i XXI wieku przyniósł szybki rozwój technik tzw. kriokonserwacji, czyli przechowywania tkanek roślinnych w temperaturze wrzenia ciekłego azotu ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) lub w jego parach (ok.  $-135^{\circ}\text{C}$ ). Stworzyło to szansę na przechowywa-

Marek Ryzczyński



Okres utajonego życia nasion drzew trwa, w zależności od gatunku, od kilku dni do nawet kilkudziesięciu lat. Na fotografii (od dołu): orzeszki brzozy brodawkowatej z łuskami, orzeszki olszy czarnej, nasiona lipy drobnolistnej (kuliste), oskrzydłone orzeszki wiązu górskiego, orzeszki grabu pospolitego, pestki czereśni ptasiej, trójkanciaste orzeszki buka zwyczajnego oraz skrzydlaki jesionu wyniosłego



nie nasion z kategorii „krnąbrnych” (*recalcitrant*), których czas życia jest stosunkowo krótki (kasztanowiec, dąb, jawor). Aby to osiągnąć, zamrażaniu poddaje się izolowane z nasion zarodki, albo jeszcze mniejsze – osie zarodkowe. Okazuje się, że zarodki lub osie zarodkowe można podsuszać aż osiągną 18–33% zawartości wody, podczas gdy całe nasiona znoszą wysuszenie, w zależności od gatunku, do 12–50%. Izolowane fragmenty nasion poddaje się zabiegom uniemożliwiającym powstawanie zagrażających życiu komórek kryształów lodu. Procedura ta zwana jest krioprotekcją i dzięki niej dochodzi do bezpiecznego, amorficznego zestalenia (zeszklania) cytoplazmy. Zwykle wymaga to obecności substancji ochronnych takich jak sacharoza, gliceryna, glikol polietylenowy lub DMSO (dwumetylowy tlenek siarki) oraz bardzo szybkiego tempa zamrażania, co osiąga się poprzez bezpośredni kontakt tkanek z ciekłym azotem. Przywrócenie aktywności zamrożonym tkankom uzyskuje się przez ich szybkie rozmrożenie w temperaturze 40°C.

### Wrażliwe jak dąb

W Instytucie Dendrologii PAN w Kórniku testowaliśmy możliwości zamrażania i przechowywania izolowanych z żołądzi osi zarodkowych dębu szypułkowego (*Quercus robur* L., kategoria *recalcitrant*). Okres zachowania żywotności całych nasion dębu jest krótki, co uniemożliwia przechowywanie ich w bankach genów dłużej niż przez 1–2 lata, gdzie byłyby rezerwuarem zasobów genowych tego gatunku. Zadowalające efekty uzyskaliśmy stosując zabiegi uprzedniej krioprotekcji osi zarodkowych kolejno w roztworach sacharozy i gliceryny. Następnie tkanka osi była podsuszana do 25% zawartości wody – była to wartość, przy której osie zarodkowe zaczynały powoli tracić żywotność na skutek odwodnienia, ale dla której odnotowano najwyższą przeżywalność po rozmrożeniu. Co ciekawe, wilgotność, przy której całe żołądzie zaczynają tracić żywotność, wynosi 38%, a zamrażane giną już w temperaturze od -6° do -8°C. Z odmrożonych z -196°C osi zarodkowych wyhodowano na pożywkach agarowych *in vitro* prawidłowo rosnące siewki, obecnie już małe drzewka rosnące w lesie doświadczalnym Instytutu Dendrologii. Nasze badania objęły również inne podejście: zamrażanie w ciekłym azocie nie fragmentów nasion, ale embriogenicznej tkanki kalusowej dębu szypułkowego otrzymanej wcześniej w hodowli *in vitro* z niedojrzałych zarodków. Tkanka ta zbudowana jest z szybko dzielących się komórek, będących zaczątkiem przyszłych zarodków somatycznych, z których można – dzięki zastosowaniu odpowiednich pożywek i zabiegów – wyhodować całą roślinę. Próby nasze powiodły się – z rozmrożonego embriogenicznego kalusa wyhodowano w kulturach *in vitro* zarodki, z nich prawidłowo rosnące sadzonki, a w końcu – całe drzewka dębu szypułkowego.

Paweł Chmielarz



**Przechowywanie nasion lub izolowanych z nich tkanek w parach ciekłego azotu (-135°C) umożliwi zachowanie zasobów genowych roślin nawet przez kilkaset lat. Na zdjęciu autor w Narodowym Centrum Zachowania Zasobów Genowych w Fort Collins (USA)**

### Setki lat

W Instytucie Dendrologii prowadzone są także badania nad wrażliwością nasion z kategorii bardziej odpornych na wysuszenie – intermediate i orthodox. Udało się ustalić bezpieczne zakresy wilgotności dla zamrażania w ciekłym azocie nasion ponad 20 gatunków drzew leśnych. Powodzenie naszych doświadczeń pozwala zakładać, że czas życia zamrożonych nasion jest znacznie dłuższy od czasu żywotności nasion przechowywanych w klasycznych warunkach. Podobne wnioski można wysnuć z badań ośrodków zagranicznych. Naukowcy z Narodowego Centrum Zachowania Zasobów Genowych (NCGRP) w Fort Collins w Kolorado dokonali ekstrapolacji wyników z 30-letniego (dotychczas najdłuższego na świecie) przechowywania nasion w ciekłym azocie lub jego parach. Wynika z niej, że szacowany okres bezpiecznego przechowywania wynosi nie dziesiątki, ale setki lat!

Po klęsce ekologicznej, jaka miała miejsce w Górach Izerskich w latach 80., w 1995 r. wybudowano w Karkonoszach nowoczesny Leśny Bank Genów-Kostrzyca. Obecnie przechowuje się tam w klasycznych warunkach roślinne zasoby genowe polskich lasów, a od 2005 roku funkcjonuje tam pracownia kriokonserwacji. W ciekłym azocie gromadzone będą tkanki zamrożonych gatunków, co pozwoli zachować dla przyszłych pokoleń uspijoną w nich leśną florę współczesnego świata. ■

### Chcesz wiedzieć więcej?

Suszka B., Chmielarz P., Walkenhorst R. (2005). How long can seeds of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) be stored? *Annals of Forest Science*, 62, 73–78.

Walters C., Wheeler L., Stanwood P. (2004). Longevity of cryogenically stored seeds. *Cryobiology*, 48, 229–244.

Suszka B., Müller C., Bonnet-Masimbert M. (1994). *Nasiona leśnych drzew liściastych od zbioru do siewu* (s. 1–293). Warszawa-Poznań: PWN.