



## Warunki przechowywania tkanek roślinnych w ciekłym azocie

Żanetta Makowska, Teresa Kotlińska

Instytut Warzywnictwa, Skierniewice

### Cryopreservation of plant tissue culture

#### Summary

Three methods of cryopreservation: vitrification, encapsulation and slow freezing were discussed. The factors having influence on long-term storage in liquid nitrogen as selection of plant explants, media, optimal condition for regeneration and growth of plants were described. Practical utilisation of vitrification method and obtained results on garlic (*Allium sativum* L.) are given as an example.

Vitrification involves treatment of samples with cryoprotective substances, dehydration with highly concentrated vitrification solution, aimed at water removal from the cells in order to protect them against destruction because of liquid nitrogen influence. This method offers a possibility to store plant material for a long time without any modification and contamination. The aim of the study is to develop a useful method for cryopreservation of apical meristems of garlic (*Allium sativum* L.) bulbils. The apical meristems of garlic bulbils were treated with PVS 3 solution containing 50% sucrose and 50% glycerol. The time of treatment of explants with PVS 3 was from 0 min to 240 min, then samples were plunged into liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>) where they were kept for 1 hour or 30 days. Rapid heat up was achieved by plunging the samples in a 45°C water-bath until cryoprotectant solution became liquid. After cryopreservation, survival and regrowth on MS (Murashige and Skoog) medium were observed. Results showed that the best kind of explants giving high percentage of regeneration were meristems with two leaves primordia about 1 mm of diameter and about 3 mm in length.

#### Key words:

garlic (*Allium sativum* L.), cryopreservation, vitrification, encapsulation, slow freezing.

#### Adres do korespondencji

Żanetta Makowska,  
Instytut Warzywnictwa,  
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3,  
96-100 Skierniewice.

### 1. Wstęp

Najczęściej stosowaną metodą zabezpieczania roślinnych zasobów genowych jest przechowywanie ich w postaci nasion, w ni-

skich temperaturach. Poprzez zmniejszenie zawartości wody w przechowywanym materiale można przedłużyć okres przechowywania. Są jednak gatunki charakteryzujące się zmniejszoną zdolnością do przechowywania w postaci nasion. Należy do nich wiele gatunków roślin tropikalnych, subtropikalnych i drzew. Są również gatunki nie tworzące nasion, które rozmnażają się tylko wegetatywnie, np. czosnek (*Allium sativum* L.), banan (*Musa* sp.), ziemniak (*Solanum tuberosum*). Jedynym sposobem ich zabezpieczenia jest utrzymywanie w kolekcjach polowych.

Zabezpieczanie zasobów genowych w kolekcjach polowych jest utrudnione ze względu na czynniki zewnętrzne takie jak: warunki atmosferyczne, choroby i szkodniki, co również zwiększa koszty utrzymania.

W ostatnich latach dość szeroko rozpowszechniła się metoda przechowywania materiału roślinnego w postaci kultur *in vitro*. Dotychczas na świecie jest przechowywane w ten sposób ponad 1000 gatunków (1). Metoda ta pozwala na otrzymanie dużej ilości materiału roślinnego uwolnionego od wirusów i innych patogenów. Wciąż udoskonalane są także techniki mikrorozmnażania zapewniające wysoki współczynnik namnażania. Ta metoda przechowywania niesie jednak czasami ryzyko utracenia materiału spowodowane błędem człowieka lub kontaminacją.

Problemy związane z zabezpieczaniem roślinnych zasobów genowych skłoniły naukowców do poszukiwania innych metod. Duże nadzieje wiąże się z kriokonserwacją, która polega na przechowywaniu materiału w ultraniskich temperaturach, w tym przypadku  $-196^{\circ}\text{C}$ , tj. w temperaturze ciekłego azotu. W takiej temperaturze zahamowane zostają procesy metaboliczne i aktywność komórek roślinnych. Teoretycznie materiał może być przechowywany przez nieograniczony okres bez żadnych zmian i modyfikacji w komórkach roślinnych. Jednocześnie metoda kriokonserwacji umożliwi przechowywanie materiału w bardzo małych objętościach zajmując niewielką powierzchnię.

Po raz pierwszy doświadczenia z udziałem kriokonserwacji zostały przeprowadzone w 1960 r. przez Sakai (2). Pełny rozwój tej metody przypada na lata 1970-1980.

Podstawowymi technikami stosowanymi w kriokonserwacji są:

- 1) technika „zeszklenia tkanek” (*vitrification*),
- 2) technika „otoczkowania” (*encapsulation*),
- 3) technika powolnego zamrażania (*slow freezing*).

Ad. 1) Technika ta polega na traktowaniu materiału roślinnego pobranego do badań substancjami wysoko skoncentrowanymi o specyficznym składzie. Proces ten ma na celu usunięcie z komórek roślinnych odpowiedniej ilości wody. Czyni się to, aby zabezpieczyć komórki przed zniszczeniem ich struktury pod wpływem działania ciekłego azotu. Przygotowany w ten sposób materiał można przechowywać w ciekłym azocie przez długi okres.

Ad. 2) Technika ma na celu usunięcie pewnej ilości wody z komórek roślinnych, podobnie jak technika pierwsza, przy zastosowaniu żelu krzemionkowego. Wiadomo, że posiada on właściwości higroskopijne i służy do osuszania. W technice tej stosuje się określony skład pożywek oraz roztwory wpływające na poziom cukrów w komórce.



Ad. 3) Technika polega na stopniowym ochładzaniu prób w aparaturze do dowolnego zamrażania typu „Minicool” w przedziale temperatur -25, -30, -40, -50°C.

Wybór eksplantatu ma istotne znaczenie w pracy nad kriokonserwacją i zależy on od gatunku, genotypu rośliny, użytej techniki i zdolności do regeneracji. Eksplantatami stosowanymi w tej metodzie mogą być merystemy wzrostu, wierzchołki pędu lub korzenia, zarodki somatyczne, nasiona lub zawiesiny komórkowe.

Na efektywność kriokonserwacji wpływa szereg czynników takich jak:

1. Rodzaj materiału roślinnego. W przypadku materiału *in vivo* rośliny powinny być młode i zdrowe, natomiast w przypadku materiału *in vitro* niezbędne jest określenie optymalnych warunków mikrorozmnażania i regeneracji w kulturach *in vitro*.

2. Rodzaj genotypu.

3. Znajomość podstawowych parametrów: wzrost i regeneracja w kulturach *in vitro*, zawartość wody w komórkach roślinnych, reakcja na stres spowodowany zastosowaniem ciekłego azotu, reakcja na krioprotektanty: (DMSO, sorbitol, mannitol, sacharoza), regeneracja po zamrożeniu w ciekłym azocie.

4. Rodzaj eksplantatu roślinnego: zawiesina komórek, kalus, zarodki somatyczne, stożki wzrostu, merystemy, fragmenty pędu lub korzenia.

5. Wybór techniki i dostosowanie jej do rodzaju eksplantatu. Metoda kriokonserwacji jest stosowana dla wielu gatunków roślin warzywnych, sadowniczych, ozdobnych, drzew tropikalnych itp. (tab. 1), (3).

Tabela 1

Wykaz gatunków przechowywanych w ciekłym azocie

| Gatunek                                      | Rodzaj eksplantatu | Rodzaj techniki                                     | Literatura                    |
|--|--------------------|---|-------------------------------|
| <i>Allium sativum</i> L.                     | stożki wzrostu     | zeszklenie tkanek                                   | Niwata, 1995                  |
| <i>Allium wakegi</i> (Araki)                 | stożki wzrostu     | zeszklenie tkanek                                   | Kohmura, 1994                 |
| <i>Asparagus officinalis</i> L.              | zarodki somatyczne | zeszklenie tkanek                                   | Uragami, 1989                 |
|  | zawiesina komórek  | zeszklenie tkanek                                   | Uragami, 1989                 |
| <i>Beta vulgaris</i> L.                      | stożki wzrostu     | otoczkowanie z wysuszeniem                          | Vandenbussche, de Proft, 1995 |
| <i>Brassica napus</i> L.                     | mikrospory zarodki | wysuszenie po inkubacji w roztworze krioprotektanta | Uragami, 1993                 |
| <i>Brassica campestris</i> L.                | zawiesina komórek  | zeszklenie tkanek                                   | Langis, 1989                  |
| <i>Cicborium intybus</i> L.                  | stożki wzrostu     | otoczkowanie z wysuszeniem                          | Vandenbussche, 1993           |
| <i>Chrysanthemum morifolium</i>              | stożki wzrostu     | zeszklenie tkanek                                   | Schneibel-Preikstas, 1992     |
| <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm) Swingle | zarodki somatyczne | wysuszanie  | Normah, Nordaini, 1994        |
| <i>Citrus halimii</i>                        | zarodki somatyczne | wysuszanie  | Normah, Hamida, 1992          |
| <i>Cucumis melo</i> L.                       | zarodki somatyczne | wysuszenie po inkubacji w roztworze krioprotektanta | Shimonishi, 1991              |
| <i>Daucus carota</i> L.                      | zarodki somatyczne | otoczkowanie z wysuszeniem                          | Dereudrdre, 1991              |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> L.                 | zarodki somatyczne | inkubacja w roztworze krioprotektanta               | Zavala, Sussex, 1986          |
| <i>Pisum sativum</i> L.                      | zarodki somatyczne | wysuszanie  | Mycok, 1995                   |
| <i>Solanum</i> spp.                          | stożki wzrostu     | zeszklenie tkanek                                   | Schneibel-Preikstas, 1992     |

W pracy przedstawiono zastosowanie techniki „zeszklania tkanek” do przechowywania zasobów genowych czosnku (*Allium sativum* L.).

## 2. Materiały i metody

Obiektem badań były genotypy czosnku (*Allium sativum* L.) nr nr 94, 183, 189, 392 pochodzące z kolekcji banku genów. Materiałem były merystemy o średnicy 1-2 mm i długości około 3 mm izolowane z cebulek powietrznych czosnku. Cebulki powietrzne przechowywane były w temperaturze 10°C. Po usunięciu suchych części łusek, materiał poddano sterylizacji przez traktowanie w 70% alkoholu etylowym przez 2-3 minuty, po czym sterylizowano podchlorynem sodu wytrząsając przez 15 minut. Wyizolowane merystemy umieszczono na pożywce MS I (4) uzupełnionej 0,1 mg/l IAA i 0,1 mg/l kinetyny. Zastosowano także nieco zmieniony skład witamin w pożywce (5) nicotinic acid 0,5 mg/l, tiamine HCl 0,4 mg/l, pyridoxine HCl 0,5 mg/l, myoinositol 100 mg/l.

Eksplantaty wyłożono na pożywkę MS I na 24 godziny w ciemności w pokoju fitotronowym, gdzie panowała temperatura 25°C. Następnie eksplantaty umieszczono w probówkach do głębokiego zamrażania i inkubowano w roztworze zwanym krioprotektantem (*loading solution*) zawierającym 2 M glicerol i 0,4 M sacharozę w płynnej pożywce MS I przez 20 minut. Po tym czasie merystemy traktowano wysoko skoncentrowanym roztworem PVS 3 (*vitrification solution*) zawierającym 50% sacharozy i 50% glicerol. Czas traktowania eksplantatów roztworem PVS 3 wynosił od 0 min do 240 min. Po inkubacji eksplantaty umieszczono w ciekłym azocie na 1 godzinę lub 30 dni, po czym gwałtownie ogrzewano w łaźni wodnej o temperaturze 45°C przez 2 min. Następnie usuwano z probówek roztwór PVS 3 i płukano eksplantaty w 1,2 M roztworze sacharozy w płynnej pożywce MS I, przez 10 min. Wyplukane eksplantaty osuszono na bibule i umieszczono na pożywce MS I z dodatkiem 0,3 M sacharozy zestalonej agarem, na 24 godziny w ciemności. Następnego dnia eksplantaty umieszczono na pożywce MS I, która jest standardową pożywką dla czosnku. W badaniach wykonano także próbę kontrolną, tj. nie zamrażaną w ciekłym azocie.

## 3. Wyniki

W badaniach użyto cztery klony czosnku. Obserwacje prowadzono po 6 tygodniach od momentu pasażu eksplantatów na pożywkę MS I, aby wyliczyć ile eksplantatów przeżyło po zamrożeniu w ciekłym azocie.

Dla klonu 94 najlepsze wyniki uzyskano, w przypadku gdy eksplantaty były bezpośrednio po dodaniu roztworu PVS 3 zanurzone w ciekłym azocie oraz umieszczone w ciekłym azocie po 60-90 min inkubacji eksplantatów w roztworze PVS 3 (tab. 2). Dla klonu 189 największy procent przeżycia, rozpoczęcia wzrostu i regeneracji ro-



Tabela 2

## Regeneracja klonu 94 po kriokonserwacji

| Czas inkubacji<br>w roztworze PVS 3<br>(min) | Procent regeneracji                   |      |                             |      |                                       |      |                             |      |                                       |     |                             |     |
|--|---------------------------------------|------|-----------------------------|------|---------------------------------------|------|-----------------------------|------|---------------------------------------|-----|-----------------------------|-----|
|  | doswiadczenie 1                       |      |                             |      | doswiadczenie 2                       |      |                             |      | doswiadczenie 3                       |     |                             |     |
|  | przeżywalność<br>po zamrożeniu<br>(%) |      | podjęcie regeneracji<br>(%) |      | przeżywalność<br>po zamrożeniu<br>(%) |      | podjęcie regeneracji<br>(%) |      | przeżywalność<br>po zamrożeniu<br>(%) |     | podjęcie regeneracji<br>(%) |     |
|  | -LN2                                  | +LN2 | -LN2                        | +LN2 | -LN                                   | +LN  | -LN                         | +LN  | -LN                                   | +LN | -LN                         | +LN |
| 0  | 100                                   | 30   | 100                         | 54,5 | 100                                   | 72,2 | 100                         | 72,7 | 100                                   | 40  | 100                         | 30  |
| 30   | 100                                   | 20   | 100                         | 27,3 | 100                                   | 9,1  | 100                         | 9,1  | 100                                   | 30  | —                           | 20  |
| 60   | 100                                   | 20   | 100                         | 36,4 | 100                                   | 36,4 | 100                         | 36,4 | 100                                   | 40  | 70                          | 10  |
| 90   | 100                                   | 50   | 100                         | 36,4 | 100                                   | 36,4 | 80                          | 27,3 | 100                                   | 50  | 100                         | 20  |
| 120  | 100                                   | 10   | 70                          | 18,2 | 100                                   | 18,2 | 70                          | 9,1  | 100                                   | 40  | 70                          | 10  |
| 150  | 100                                   | 20   | 70                          | 18,2 | 100                                   | 18,2 | 80                          | 9,1  | 100                                   | 50  | 70                          | 10  |
| 180  | 100                                   | 20   | 60                          | 18,2 | 100                                   | 45,5 | 80                          | 9,1  | 100                                   | 60  | 60                          | 10  |
| 210  | 100                                   | 40   | 50                          | 18,2 | 100                                   | 18,2 | 60                          | 9,1  | 100                                   | 50  | 60                          | 10  |
| 240  | 100                                   | 30   | 100                         | 9,1  | 100                                   | 18,2 | 60                          | 9,1  | 100                                   | 90  | 50                          | 0   |

ślin otrzymano po upływie 90-150 min (tab. 3). W przypadku klonu 392 eksplantaty przebywały w ciekłym azocie 30 dni. Dość dobre wyniki uzyskano po 60-90 min oraz 150 min (tab. 4).

Tabela 3

## Regeneracja klonu 189 po kriokonserwacji

| Czas inkubacji<br>w roztworze PVS 3<br>(min) | Procent regeneracji                   |      |                             |      |                                       |     |                             |     |
|--|---------------------------------------|------|-----------------------------|------|---------------------------------------|-----|-----------------------------|-----|
|  | doświadczenie 1                       |      |                             |      | doświadczenie 2                       |     |                             |     |
|  | przeżywalność<br>po zamrożeniu<br>(%) |      | podjęcie regeneracji<br>(%) |      | przeżywalność<br>po zamrożeniu<br>(%) |     | podjęcie regeneracji<br>(%) |     |
|  | -LN2                                  | +LN2 | -LN2                        | +LN2 | -LN                                   | +LN | -LN                         | +LN |
| 0  | 100                                   | 45,5 | 72,7                        | 36,4 | 100                                   | 60  | –                           | –   |
| 30   | 100                                   | 27,3 | 63,6                        | 18,2 | 100                                   | 40  | 90                          | 40  |
| 60   | 100                                   | 18,2 | 72,7                        | 18,2 | 100                                   | 60  | 90                          | 20  |
| 90   | 100                                   | 54,5 | 54,5                        | 27,3 | 100                                   | 60  | 80                          | 30  |
| 120  | 100                                   | 63,6 | 54,5                        | 27,3 | 100                                   | 50  | 80                          | 10  |
| 150  | 100                                   | 45,5 | 54,5                        | 27,3 | 100                                   | 30  | 60                          | 20  |
| 180  | 100                                   | 9,1  | 18,2                        | –    | 100                                   | 40  | 70                          | 30  |
| 210  | 100                                   | 36,4 | 27,3                        | –    | 100                                   | 40  | 40                          | 0   |
| 240  | 100                                   | 27,3 | –                           | 18,2 | 100                                   | 30  | 60                          | 0   |

Tabela 4

## Regeneracja klonu 392 i 183 po kriokonserwacji

| Czas inkubacji<br>w roztworze PVS 3<br>(min) | Klon 392                              |      |                             |      | Klon 183                              |     |                                       |     |
|--|---------------------------------------|------|-----------------------------|------|---------------------------------------|-----|---------------------------------------|-----|
|  | regeneracja (%)                       |      |                             |      | regeneracja (%)                       |     |                                       |     |
|  | przeżywalność<br>po zamrożeniu<br>(%) |      | podjęcie regeneracji<br>(%) |      | przeżywalność<br>po zamrożeniu<br>(%) |     | przeżywalność<br>po zamrożeniu<br>(%) |     |
|  | -LN2                                  | +LN2 | -LN2                        | +LN2 | -LN                                   | +LN | -LN                                   | +LN |
| 0  | 100                                   | 10   | 100                         | 30   | 100                                   | 60  | 100                                   | 10  |
| 60   | 100                                   | 30   | 100                         | 50   | 100                                   | 50  | 100                                   | 40  |
| 90   | 100                                   | 40   | 100                         | 50   | 100                                   | 10  | 100                                   | 30  |
| 120  | 100                                   | 0    | 100                         | 20   | 100                                   | 60  | 100                                   | 10  |
| 150  | 100                                   | 30   | 100                         | 70   | 100                                   | 20  | 100                                   | 0   |
| 180  | 100                                   | 0    | 100                         | 20   | 100                                   | 40  | 100                                   | 20  |
| 210  | 100                                   | 0    | 100                         | 10   | 100                                   | 20  | 100                                   | 0   |

Na podstawie wyników uzyskanych dla klonu 183 wykazano, że po upływie 30 dni przechowywania w ciekłym azocie największy procent przeżycia eksplantatów otrzymano po 60-120 min inkubacji w roztworze PVS 3 (tab. 4). Dotychczasowe wyniki wymagają potwierdzenia w kontynuowanych badaniach.



#### 4. Dyskusja

Na podstawie uzyskanych wyników w przeprowadzonych badaniach dowiedziano, że zdolność przeżywania eksplantatów po kriokonserwacji, a także rozpoczęcie przez nie wzrostu i późniejsza zdolność do regeneracji uzależniona jest w dużym stopniu od genotypu rośliny, klonu oraz wielkości cebulek powietrznych czosnku. Klony 183 i 189 miały cebulki średnie o 6 mm średnicy, natomiast klon 94 posiadał cebulki małe o średnicy 3 mm, klon 392 – cebulki duże o średnicy 8 mm. Stąd też mogą wynikać różnice między poszczególnymi klonami w zdolności do regeneracji i w czasie traktowania eksplantatów roztworem PVS 3. Podobne wyniki uzyskano podczas wcześniejszych badań przeprowadzonych na materiale pochodzącym z niemieckiego banku genów (6). Różnice mogą wynikać również stąd, że poszczególne genotypy w różnym stopniu reagują na roztwór krioprotektanta oraz stres spowodowany zamrożeniem. W dalszych badaniach planowane jest przeprowadzenie kolejnych doświadczeń na większej liczebności roślin i obiektów, aby wyjaśnić przyczyny odmienności wyników pomiędzy poszczególnymi klonami.

Badania są prowadzone w ramach programu Ochrona Zasobów Genowych Roślin Warzywnych finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa z funduszu Postępu Biologicznego.

#### Literatura

1. Bigot C., (1987), *Proceedings of IAPTC French- British Meeting, 8-9 Oktober, Cell Culture Techniques Applied to Plant Production and Plant Breeding*, Eds. Boccon-Gibod J., Benbadis A., Shont K. C., Angers, France, 5-17.
2. Sakai A., (1960), *Nature*, 185, 392-394.
3. Engelmann F., (1997), *Biotechnology and plant genetic resources*, Eds. J. A. Callow, B. V. Ford-Lloyd, H. J. Newbury, Wallingford, Oxon UK, 6, 119-161.
4. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
5. Moriconi D. N., Corci V. C., Nome S. F., (1990), *Phyton*, 51, 145-151.
6. Makowska Ż., Keller J., Engelmann F., (1999), *Cryo-Letters*, 20, 175-182.