

Marcin Michalak

KRIOKONSERWACJA ZASOBÓW GENOWYCH WYBRANYCH GATUNKÓW DZIKICH DRZEW I KRZEWÓW OWOCOWYCH

Dziki drzewa i krzewy owocowe są integralną częścią ekosystemów leśnych w Europie. Charakteryzują się szlachetnym drewnem, powolnym wzrostem, a owoce i nasiona tych gatunków są pokarmem dla zwierzyny leśnej. Jabłoń dzika, grusza pospolita oraz leszczyna pospolita posiadają wartościowy materiał genetyczny przodków hodowanych obecnie odmian drzew i krzewów owocowych. Są gatunkami rzadkimi i zagrożonymi w Europie, w tym także w polskich lasach, wymagają więc ochrony *ex situ* w bankach genów.

Niniejsze badania miały na celu weryfikację hipotezy, że nasiona wybranych gatunków tolerują silną desykację oraz temperaturę ciekłego azotu (-196°C , LN) w szerokim zakresie wilgotności oraz drugiej hipotezy, że zmiany w poziomie wilgotności nasion poddanych kriokonserwacji, wywołują zmiany w poziomie globalnej metylacji cytozyny w DNA nasion oraz siewek, uzyskanych z tych nasion.

W pracy określono wrażliwość nasion czereśni ptasiej (*Prunus avium*), jabłoni dzikiej (*Malus sylvestris*), gruszy pospolitej (*Pyrus communis*) oraz leszczyny pospolitej (*Corylus avellana*) na silną desykację (nad żelem krzemionkowym) oraz temperaturę LN. Określono najwyższą bezpieczną wilgotność nasion zamrażanych w ciekłym azocie przez 24 h, czyli wilgotność HMFL oraz bezpieczne zakresy wilgotności (BZW) nasion zamrażanych w LN dla czterech badanych gatunków. Nasiona jabłoni dzikiej, gruszy pospolitej, czereśni ptasiej oraz osie zarodkowe leszczyny pospolitej przechowano w LN przez 2 lata.

W przypadku leszczyny pospolitej, dla której wrażliwość na LN całych nasion nie była przed rozpoczęciem badań w pełni rozpoznana, opracowano alternatywną metodę kriokonserwacji zasobów genowych w postaci izolowanych z nasion osi zarodkowych. Odtworzenie kompletnych roślin z osi zarodkowych przeprowadzone było na pożywkach agarowych w kulturach *in vitro*. Konieczne było zatem rozpoznanie warunków wzrostu osi pozbawianych liścieni w kulturach *in vitro*, określenie składu regulatorów wzrostu oraz makro i mikroelementów.

Reakcję nasion oraz osi zarodkowych na temperaturę LN badano za pomocą testów zdolności kiełkowania i wschodzenia, a także po raz pierwszy za pomocą badań

epigenetycznych. Wykorzystując metodę chromatografii cienkowarstwowej, określono poziom globalnej metylacji cytozyny w DNA nasion, osi zarodkowych oraz 3-miesięcznych siewek uzyskanych z nasion przemrożonych w LN.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że podsuszenie nasion jabłoni dzikiej badanej proveniencji do wilgotności 4,2% nie powodowało istotnego obniżenia zdolności kiełkowania. Jednakże przy tej wilgotności wschody uzyskane z przemrożonych nasion, utrzymywały się na istotnie niższym poziomie w porównaniu z nasionami niemrożonymi (spadek z 96% do 73%). W przeciwieństwie do jabłoni dzikiej, nasiona gruszy pospolitej i leszczyny pospolitej nie traciły zdolności kiełkowania i wschodzenia nawet na skutek desykcji do bardzo niskich poziomów wilgotności (odpowiednio 2,5% i 2,7%). Można je zatem zaliczyć do kategorii *orthodox*. Uzyskane wyniki wskazują, że wstępne podsuszenie nasion czereśni ptasiej z poziomu 17,8-19,8% do około 11-12%, powodowało istotny spadek ich zdolności wschodzenia (dla dwóch badanych proveniencji, z 73% do 16% oraz z 89% do 10%) i zostały zaklasyfikowane do kategorii *suborthodox (intermediate)*.

Bezpieczny zakres wilgotności nasion (BZW) przemrożonych w LN przez 24h dla jabłoni dzikiej wynosił 6,2-19,4%, a dla gruszy pospolitej 6,7-20,5%. Nasiona czereśni ptasiej przemrożone w LN i nasiona leszczyny pospolitej pozbawione okrywy owocni podczas takiego mrożenia, wschodziły po rozmrożeniu z LN na istotnie niższym poziomie w porównaniu z nasionami nietraktowanymi LN. Nasiona leszczyny o wilgotności 7,3% przemrożone w LN w okrywach owocni w pełni tolerowały temperaturę LN. Badania wykazały, że oprócz nasion, możliwa była również skuteczna kriokonserwacja osi zarodkowych leszczyny pospolitej, a najbardziej skuteczną pożywką do ich regeneracji w kompletne rośliny z czterech testowanych, okazała się pożywka agarowa WPM (Woody Plant Medium) z dodatkiem cytokininy 0,8 mg/l (6-benzylaminopuryny, BAP).

Najwyższa bezpieczna wilgotność HMFL nasion jabłoni dzikiej wynosiła 19,4%, gruszy pospolitej 20,5%. Wilgotność HMFL nasion czereśni ptasiej wstępnie poduszonych, a następnie dowilżonych przed przemrożeniem w LN wynosiła 14,9%, a nasion nieznacznie poduszonych po zbiorze 19,8%. Wilgotność HMFL określona dla nasion leszczyny pospolitej, pozbawionych okrywy owocni określona została jako 9,1%, a nasion przemrożonych w LN w okrywach jako 7,3%.

Nasiona jabłoni dzikiej, gruszy pospolitej, czereśni ptasiej zachowywały wysoką zdolność wschodzenia po 2-letnim przechowaniu w LN. Również osie zarodkowe leszczyny pospolitej przechowane przez 2 lata w LN charakteryzowały się tą samą żywotnością *in vitro* co osie nieprzechowywane.

W badaniach epigenetycznych stwierdzono, że poziom globalnej metylacji w nasionach gruszy traktowanych i nietraktowanych LN nie różnił się istotnie, gdy wilgotność przemrożonych nasion mieściła się w zakresie 5,3-16,6%, natomiast był on istotnie niższy od poziomu m^5C nasion niemrożonych, gdy przemrożono je przy wilgotności 20,5%. Podobny, bezpieczny zakres wilgotności nasion gruszy poddanych kriokonserwacji, można było wyznaczyć na podstawie analizy poziomu m^5C w 3-miesięcznych siewkach uzyskanych z takich nasion (traktowanych i nietraktowanych LN).

W pracy skorelowano po raz pierwszy wyniki badań nad zdolnością kiełkowania i wschodzenia nasion po kriokonserwacji z poziomem metylacji w przemrożonych w LN nasionach i siewkach, wyhodowanych z takich nasion. Na podstawie otrzymanych wyników badań epigenetycznych stwierdzono, że bezpieczne przechowywanie nasion gruszy pospolitej w LN zapewniła wilgotność nasion z zakresu 5,3-16,6%.

W przypadku leszczyny pospolitej wykazano w badaniach epigenetycznych, że już samo obniżenie wilgotności nasion z 37% do 7,3% powodowało istotny spadek poziomu globalnej metylacji izolowanych z nich osi zarodkowych z 6,38% do 4,71%. Przemrożenie w LN nasion leszczyny o wilgotności 7,3% nie powodowało zmian w poziomie m^5C osi zarodkowych w porównaniu z nasionami nietraktowanymi LN o tej samej wilgotności.

W przedstawionej rozprawie doktorskiej stwierdzono, że długoterminowe przechowywanie nasion w temperaturach kriogenicznych w bankach genów, możliwe jest z zachowaniem wysokiego poziomu żywotności dla wszystkich badanych gatunków.

Jednocześnie po raz pierwszy udowodniono, że silne podsuszenie nasion oraz traktowanie ich temperaturą LN może indukować zmiany w poziomie metylacji nasion. U większości badanych tutaj gatunków, umiarkowane podsuszenie nasion powodowało obniżenie globalnego poziomu metylacji w nasionach, a silne podsuszenie nad żelem krzemionkowym znaczne podwyższenie poziomu m^5C . Traktowanie natomiast nasion temperaturą LN obniżyło poziom metylacji w nasionach w porównaniu z nasionami niemrożonymi. Bezpieczne zakresy wilgotności nasion traktowanych LN, wyznaczone na podstawie prób kiełkowania i wschodzenia, w oparciu o wyniki przeprowadzonych badań epigenetycznych, zostały skorygowane i uściślone na podstawie zmian na poziomie epigenomu.

Wyniki niniejszych badań, opisujące wrażliwość nasion na desykcję, również na poziomie epigenetycznym, umożliwiają zaszeregowanie badanych gatunków do odpowiedniej kategorii nasion. Mogą też stanowić podstawę w opracowaniu bezpiecznych metod

długoterminowego przechowywania zasobów genowych *ex situ* w bankach genów, w temperaturze LN, w celu ochrony bioróżnorodności polskich i europejskich lasów.