



„Kriokonserwacja zasobów genowych rodzimych gatunków dzikich drzew i krzewów owocowych”

Marcin Michalak

Stypendysta projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Jednym z zabezpieczeń świata roślin, dzikich gatunków oraz roślin uprawnych, przed skutkami jakie niosą ze sobą zmiany klimatu, jest gromadzenie i przechowywanie zasobów genowych *ex situ* w lokalnych bankach genów. Mając na uwadze zmiany klimatu zachodzące na Ziemi, ochrona i zrównoważone wykorzystanie leśnych zasobów genowych staje się coraz bardziej istotnym problemem dla zachowania równowagi europejskich lasów, jak i dla ochrony bioróżnorodności na szeroką skalę (1, 2). W ramach programu *Natura 2000*, ochroną objęto zasoby genowe zagrożonych gatunków w tym dzikie drzewa owocowe.

Najpowszechniejszą metodą utrzymywania zasobów genowych roślin *ex situ* na świecie jest przechowywanie nasion w temperaturze -18°C . Natomiast kriokonserwacja jest nową metodą długoterminowego (ponad 100 lat) przechowywania materiału biologicznego w temperaturze ciekłego azotu (-196°C) lub jego parach (ok. -130°C), Fot. 1. Kriokonserwacja jest dodatkowym zabezpieczeniem dla nasion *orthodox* (tolerujących odwodnienie), przechowywanych tradycyjnymi metodami lub jedyną metodą przechowywania dla gatunków produkujących nasiona krótkowieczne (*recalcitrant*). Przewidywana za pomocą ekstrapolacji długość życia nasion *orthodox* przechowywanych w parach ciekłego azotu wynosi 500 lat, a w przypadku przechowywania w samym ciekłym azocie 3400 lat. Badania wykazały, że im niższa jest temperatura przechowywania, tym dłuższy jest okres życia przechowywanych nasion (3).

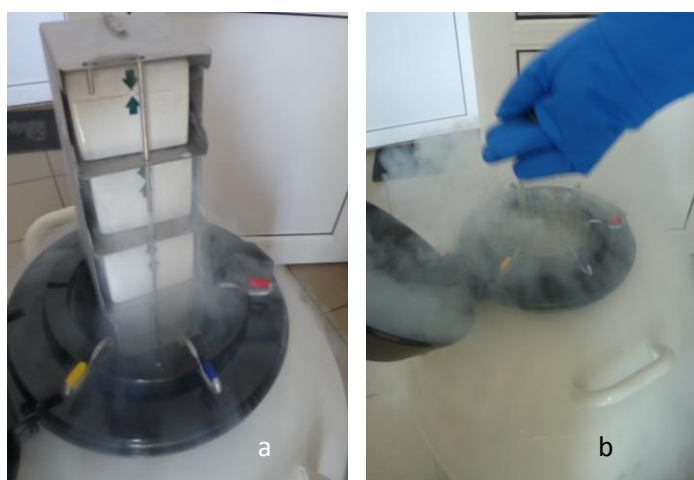
W mojej pracy doktorskiej materiałem badawczym są nasiona dzikich drzew owocowych, wybrane na podstawie rodzimości ich występowania w lasach niemal całej Europy, w tym również w Polsce i w Wielkopolsce. Wybrane gatunki drzew charakteryzują się szlachetnym drewnem, powolnym wzrostem i słabymi zdolnościami do

współzawodniczenia z innymi gatunkami. Posiadają wartościowy materiał genetyczny, jako przodkowie uprawianych obecnie odmian drzew i krzewów owocowych. Ich owoce i nasiona są pokarmem dla zwierzyny leśnej.

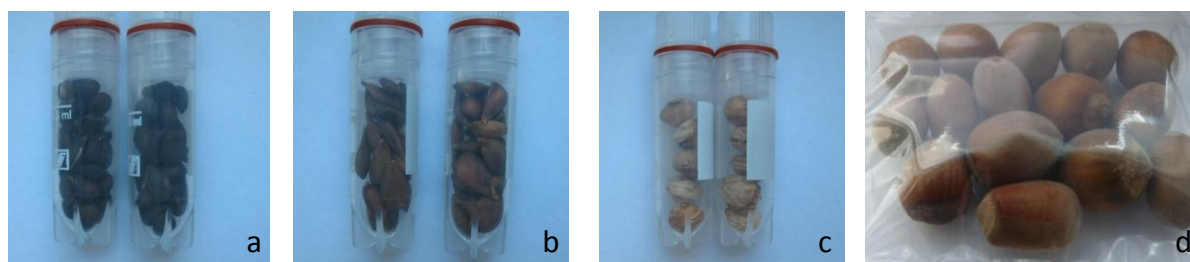
Celem pracy doktorskiej jest określenie wrażliwości nasion czereśni ptasiej (*Prunus avium* L.), gruszy pospolitej (*Pyrus communis* L.) jabłoni dzikiej (*Malus sylvestris* (L.)), oraz leszczyny pospolitej (*Corylus avellana* L.), Fot. 2, na silne odwodnienie w powiązaniu z temperaturą ciekłego azotu, w aspekcie zachowania ich zasobów genowych *ex situ*. W przypadku leszczyny pospolitej kriokonserwacji poddano izolowane z nasion osie zarodkowe, które po rozmrożeniu hodowane są w kulturach *in vitro*, Fot. 3. Przechowywanie materiału genetycznego *ex situ* oparte jest na założeniu, że materiał ten jest przechowywany w warunkach zapewniających stabilność genetyczną. W niniejszej pracy zostanie podjęta po raz pierwszy w skali światowej próba określenia zmiany w poziomie 5 metylocytozyny (m5C) w DNA nasion *Pyrus communis* i *Corylus avellana* poddanych procedurze kriokonserwacji w odniesieniu do nasion nie przechowywanych. Nasiona o znanej wilgotności, przechowywane są w bankach genów w kontrolowanej temperaturze. Wykazano, że czynniki te (wilgotność nasion i temperatura) mają podstawowy wpływ na przebieg procesów epigenetycznych w tym na metylację genomowego DNA. U organizmów eukariotycznych metylacja cytozyny związana jest z dużą liczbą kluczowych procesów, jak chociażby regulacją cyklu komórkowego, embriogenezą, piętnowaniem genomowym, a także wyłączeniem transpozonów i regulacją genów. Utrzymanie prawidłowego wzoru metylacji jest zabezpieczeniem dla prawidłowej regulacji transkrypcji i ekspresji materiału genetycznego organizmu (4, 5, 6). Dlatego niezwykle istotne jest określenie czy podczas zamrażania nasion w ciekłym azocie nie następują zmiany w jej wzorze.

W pracy doktorskiej wykorzystuję metody określające potencjalne zmiany w nasionach czy siewkach po kriogenicznym przechowywaniu na poziomie fizjologicznym i molekularnym. Wykluczenie niekorzystnych zmian w przechowywanych nasionach, zapewniłoby otrzymanie z nich siewek o wysokiej wartości hodowlanej w szkółkach leśnych. Wyniki otrzymanych badań będą podstawą do wnioskowania o stabilności epigenetycznej tkanek roślin drzewiastych przechowywanych w bankach genów z wykorzystaniem technik kriokonserwacji. Niniejsze badania mogą przyczynić się w przyszłości do zoptymalizowania metod kriokonserwacji zasobów genowych w postaci nasion, co doskonale wpisuje się w strategię Wielkopolski i Poznania jako miasta „Know-How” i społeczeństwa opartego na wiedzy.

Rezultaty badań, które zebrane będą w formie pracy doktorskiej wpisują się w strategię europejskiego programu EUFORGEN, którego celem działania jest m.in. opracowanie bezpiecznych metod długoterminowego przechowania nasion dzikich drzew i krzewów owocowych. Ponadto tematyka badań zgodna jest ze strategią działania Lasów Państwowych, dzięki czemu wyniki niniejszych badań będą mogły mieć zastosowanie zarówno dla dzikich drzew owocowych województwa wielkopolskiego jak również w skali całego kraju, a w przyszłości również i Unii Europejskiej.



Fot. 1. Nasiona umieszcza się w specjalnych plastikowych pojemnikach, zamkniętych w metalowej kolumnie (a), zamrożenie próbek w zbiorniku z ciekłym azotem (-196°C) (b). Fot. M. Michalak



Fot. 2. Nasiona gruszy pospolitej (a), jabłoni dzikiej (b) i czereśni ptasiej w okrywach owocowych (c) umieszczone w kriofiolkach oraz orzechy leszczyny pospolitej (d) zaspawane w trójwarstwowej folii polietylenowej, przygotowane do zamrożenia w ciekłym azocie, Fot. M. Michalak



Fot. 3. Siewki leszczyny pospolitej (*Corylus avellana* L.) uzyskane w hodowli *in vitro* z osi zarodkowych przechowywanych przez 2 lata w ciekłym azocie, Fot. M. Michalak

- 1 Corvalan C., Hales S., McMichael A., (2005) Millennium Ecosystem Assessment Ecosystem and Human Well-being: Biodiversity Synthesis, World Resources Institute, Washington, DC, US
- 2 http://www.mcpfe.org/filestore/mcpfe/Publications/pdf/state_of_europes_forests_2007.pdf.
- 3 Walters C., Wheeler L., Stanwood P.C., 2004. Longevity of cryogenically stored seeds. *Cryobiology* 48: 229-244
- 4 Law J.A., Jacobsen S.E., 2009. Dynamic DNA Methylation. *Science*, 323: 1568-1569.
- 5 Zhang X., 2008. The epigenetic landscape of plants. *Science*, 320: 489-492.
- 6 Zhang M., Wang H., Dong Z., Qi B., Xu K., Liu B., 2010. Tissue cultured induced variation at simple sequence repeats in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) is genotype-dependent and associated with down-regulated expression of a mismatch repair gene, MLH3. *Plant Cell Reports* 29: 51-59.