

OCHRONA ROŚLIN ZAGROŻONYCH FLORY POLSKI W BANKACH NASION - W ULTRANISKICH TEMPERATURACH

Conservation of endangered plants of Polish flora in ultra-low temperature seed bank

Roman. MURANYI, Maciej NIEDZIELSKI, Jerzy PUCHALSKI

Ogród Botaniczny Polskiej Akademii Nauk, ul. Prawdziwka 2, 02-973 Warszawa-Powsin

WSTĘP

Utrzymujące się negatywne zmiany środowiska naturalnego powodują wzrost znaczenia ochrony *ex-situ* różnorodności szaty roślinnej Polski. Banki nasion zlokalizowane między innymi w ogrodach botanicznych mogą być istotnym i ważnym elementem działań prowadzonych w tym kierunku. Przechowywanie nasion w ultraniskich temperaturach pozwala na znaczne wydłużenie okresu ich żywotności i praktycznie eliminuje konieczność częstego reprodukowania. Zwiększa to istotnie możliwości zachowania gatunków zagrożonych. Duże zróżnicowanie między gatunkami pod względem ich budowy, fizjologii i składu chemicznego nasion zmusza do indywidualnych badań nad określeniem optymalnych warunków zamrażania każdego z nich. Dotychczasowe wyniki uzyskane w Ogrodzie Botanicznym PAN, potwierdziły zasadność użycia metod głębokiego zamrażania do przechowywania nasion roślin zagrożonych.

Skuteczne rozwiązywanie problemów związanych z ochroną przyrody, wymaga przyjęcia odpowiedniej strategii adekwatnej do aktualnych potrzeb i uwzględniającej przewidywalne kierunki zmian w przyszłości. Jednym z głównych kierunków i zadań ochrony przyrody jest ochrona naturalnej różnorodności roślinnych zasobów genowych, jako podstawy bytu ludzkości (Światowa Strategia Ochrony Przyrody 1985).

Dokument końcowy konferencji Narodów Zjednoczonych "Środowisko i Rozwój" wymie-

nia między innymi następujące działania na rzecz ochrony różnorodności biologicznej:

- ochronę zasobów genowych istniejących w populacjach wszystkich gatunków
- zapobieganie wyginięciu gatunków
- ochrona ekosystemów różnych stref klimatycznych, istniejących naturalnie lub stworzonych przez człowieka w toku jego działalności gospodarczej.

W opracowaniu "Strategia ekorozwoju Polski" stwierdzono, iż dotychczasowe wysiłki skierowane głównie na ochronę konserwatorską indywidualnych gatunków muszą być rozbudowane o ochronę całych ekosystemów oraz działania polegające na ochronie roślinnych zasobów genowych (*ex-situ*), poza środowiskiem naturalnym (Nowicki 1993). Istotną rolę mogą odegrać w tym ogrody botaniczne (Andrzejewski i Harabin 1993), a zasadniczym elementem działań w tej dziedzinie mogą być tworzone w ogrodach botanicznych banki genów.

AKTUALNY STAN ZAGROŻENIA FLORY POLSKIEJ

W chwili obecnej na liście całkowicie prawem chronionych znajduje się około 200 gatunków roślin, głównie naczyniowych. Częściowo chronionych jest 28 gatunków. Wiele gatunków z tej listy zasiedla rezerваты lub inne obszary chronione co powoduje, że nie grozi im w najbliższym czasie niebezpieczeństwo wyginięcia, powodowane dotąd ich zrywaniem oraz zmianami w środowisku naturalnym. Zagrożonych wyginięciem

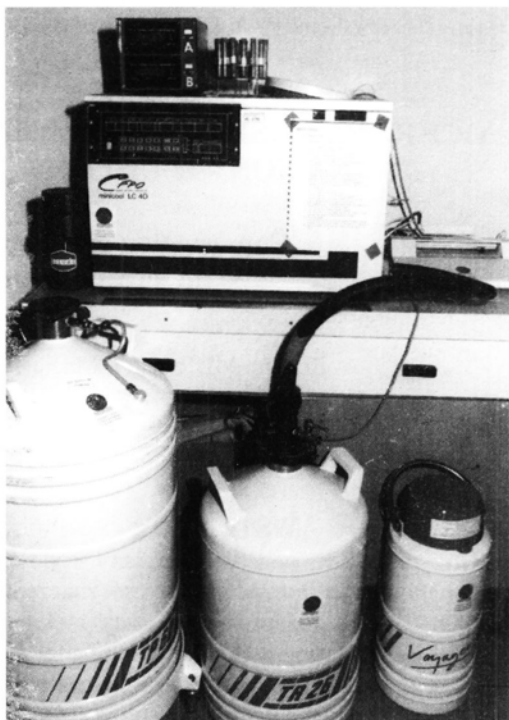
jest natomiast wiele gatunków nie objętych ochroną prawną a poddawanych silnej antropopresji. Obecny stan zagrożenia szaty roślinnej Polski przedstawiają między innymi takie opracowania jak "Lista roślin zagrożonych w Polsce" (Zarzycki i in. 1992), "Ochrona gatunkowa roślin w Polsce - stan, funkcjonowanie, potrzeby" (Piękoś-Mirkowa 1990). W każdej grupie roślin przedstawionej w wyżej wymienionych publikacjach zagrożonych jest kilkanaście do kilkudziesięciu procent gatunków. Postępująca degradacja środowiska, co podkreślają autorzy, zwiększa niebezpieczeństwo wyginięcia w najbliższym czasie kolejnych gatunków. Wydaje się, iż w chwili obecnej ochrona *in-situ* większości gatunków zagrożonych wyginieniem nie jest możliwa ze względów finansowych czy organizacyjnych, aczkolwiek nie należy rezygnować ze wszystkich dostępnych środków aby chronić środowisko w całej jego złożoności i różnorodności. Rozwiązaniem, które może być w znacznym stopniu pomocne jest utworzenie banków genów roślin ginących i zagrożonych.

BANKI NASION JAKO ELEMENT SYSTEMU ZACHOWANIA ROŚLINNYCH ZASOBÓW GENOWYCH

Zadaniem tworzonych banków genów jest gromadzenie i ochrona roślinnych zasobów genowych bądź to w formie kolekcji żywych roślin co jest najstarszą formą działalności, bądź w formie banków nasion lub banków tkanek z wykorzystaniem technik *in-vitro*.

Ochrona *ex-situ* gatunków ginących i zagrożonych jest w wielu wypadkach palącą koniecznością, wobec rosnącego szybko stopnia zagrożenia poszczególnych gatunków i ograniczonymi możliwościami ochrony i odbudowy środowisk naturalnych. Gromadzenie i ochrona zasobów genowych w postaci żywych kolekcji jest przedsięwzięciem bardzo kosztownym i wymagającym dużych nakładów pracy. Zgromadzenie w banku nasion i utrzymanie w stanie wysokiej żywotności próbek nasion jest w świetle dotychczasowych doświadczeń zarówno z punktu widzenia kosztów jak i możliwości logistycznych rozwiązaniem optymalnym.

Wyniki dotychczasowych badań nad możliwościami i optymalnymi sposobami przechowy-

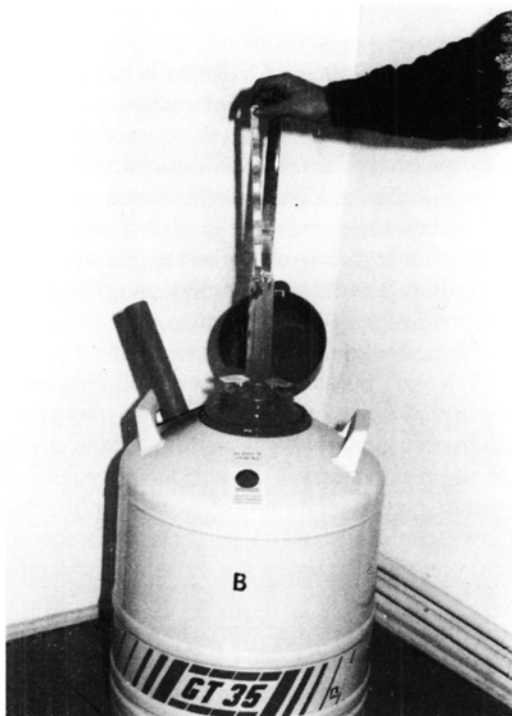


Ryc. 1. Aparatura do kontrolowanego zamrożenia nasion (fot. W. Potkańska)

Fig. 1. Equipment for controlled seed freezing (phot. W. Potkańska)

wania nasion wykazały istotny wpływ trzech czynników na długowieczność nasion. Szybkość zmian żywotności nasion w czasie przechowywania w decydującym stopniu regulują: wilgotność nasion, temperatura przechowywania i skład otoczenia gazowego nasion (Harrington 1973; Roberts 1972). Na podstawie omówionych badań opracowano zalecenia dotyczące warunków technicznych przechowywania roślinnych zasobów genowych w postaci próbek nasion (IBPGR 1984).

Z punktu widzenia możliwości długoletniego przechowywania nasiona podzielono na dwie grupy. Do pierwszej grupy nazwanej przez Roberta "orthodox" należą nasiona nie wykazujące istotnego obniżenia żywotności po wysuszeniu od stanu powietrznie suchych do wilgotności około 3%. Nasiona drugiej grupy zwanej "recalcitrans" nie mogą być suszone poniżej pewnej relatywnie wysokiej wilgotności zwykle powyżej



Ryc.2. Próbkę nasion przechowywane w ciekłym azocie (fot. W. Potkańska)

Fig. 2. Seed samples stored in liquid nitrogen (phot. W. Potkańska)

18% (Roberts 1973), a tym samym przechowywane przez czas dłuższy.

Do grupy orthodox należy zaliczyć znaczną część nasion roślin strefy umiarkowanej. Należy do niej większość nasion roślin uprawnych. Brak jest natomiast dokładnych informacji o charakterystyce nasion roślin dzikorosnących.

Długoletnie przechowywanie nasion typu orthodox według przyjętych standardów powinno być prowadzone w temperaturze około -20°C przy wilgotności nasion rzędu 6-8%. Jednakże takie warunki przechowywania nie zahamowują całkowicie procesów starzenia się nasion. Powolny spadek żywotności nasion prowadzi w rezultacie do konieczności regeneracji zgromadzonych próbek. Nadmierny spadek żywotności mógłby spowodować bowiem niekorzystne zmiany genetyczne prowadzące do naruszenia stabilności genetycznej przechowywanych populacji, co z kolei może prowadzić do uszczuplenia

zgromadzonej puli genowej (Ross 1981, Roberts 1972, 1975). Reprodukacja zgromadzonych kolekcji nasion jest procesem kosztownym, wymaga znacznych nakładów pracy, a jednocześnie wzrasta ryzyko przypadkowych błędów mogących naruszyć czystość genetyczną reprodukowanych populacji. W przypadku roślin ginących i zagrożonych reprodukcja powoduje konieczność bezpowrotnego zużycia w większości wypadków trudnych do pozyskania nasion. Jednocześnie przy ograniczonej wiedzy na temat fizjologii tych gatunków reprodukcja *ex-situ* może być bardzo trudna.

Wydaje się, iż szczególnie w przypadku takich unikalnych i szczególnie cennych materiałów maksymalne wydłużenie czasu przechowywania istotnie zwiększyłoby możliwości zachowania ich zasobów genowych w warunkach *ex-situ*. Zmniejszyłoby to w istotny sposób skalę ich zagrożenia. Możliwości takie stwarza przechowywanie nasion w ultraniskich temperaturach.

PODSTAWOWE PROCESY ZACHODZĄCE W CZASIE GŁĘBOKIEGO ZAMRAŻANIA NASION

Stosowanie ultraniskich temperatur w medycynie i różnorodnych badaniach z zakresu biologii roślin i zwierząt rozpoczęto na szeroką skalę kilkadziesiąt lat temu (Meryman 1966). Prowadzone w tym czasie badania pozwoliły określić przebieg procesów fizykochemicznych jak i biochemicznych mających miejsce w czasie zamrażania materiału biologicznego.

Głównym czynnikiem mającym decydujący wpływ na przebieg i rezultat zamrażania żywych organizmów jest zawarta w nich woda (Meryman 1966). Zasadniczym procesem zachodzącym w czasie zamrażania jest krystalizacja wody. Tworzenie się i wzrost kryształów lodu może być przyczyną uszkodzeń mechanicznych jakim ulegają komórki i tkanki. Jednakże, zamrażanie wody powodować może również uszkodzenia materiału biologicznego w wyniku postępującego odwodnienia cytoplazmy. Wzrost stężenia elektrolitów komórkowych, przy przekroczeniu określonych granic, powodować może uszkodzenia lub nawet śmierć komórek. Postępująca dehydratacja zawartości komórek może prowadzić także do zmian stopnia uwodnienia takich makrocząstek jak białka czy kompleksy białkowo-

lipidowe błon komórkowych. Naruszenie ochronnej i stabilizującej warstwy cząsteczek wody, powoduje czasami nieodwracalne zmiany strukturalne i funkcjonalne makrocząsteczek (Meryman 1966; Meryman i Williams 1985).

W chwili obecnej nie istnieje teoria wyjaśniająca przebieg i możliwe skutki zamrażania i rozmrażania materiałów biologicznych. Wydaje się, że procesy te przebiegają kilkoma drogami a stopień złożoności organizmów żywych w istotny sposób komplikuje możliwości przewidywania.

Przebieg i zakres możliwych zmian w czasie zamrażania i rozmrażania próbek zależą w znacznym stopniu od parametrów procesu zmian temperatury. Zawartość wody i temperatura początkowa próbek, szybkość zamrażania i rozmrażania mają wpływ na żywotność i przeżywalność próbek biologicznych.

Doświadczenia prowadzone przy użyciu nasion wykazały, iż nasiona typu *orthodox* mogą być zamrażane do temperatury ciekłego azotu bez istotnego ryzyka obniżenia ich żywotności. Nasiona te przy zawartości wody poniżej 15% (śm), mogą być zamrażane do temperatury ciekłego azotu w szerokim zakresie szybkości schładzania (Sakai i Noshiro 1975; Stanwood 1981, 1985). Uzyskane rezultaty wykazały możliwość zastosowania technik ultrazamrażania do długotermijnowego przechowywania nasion. Zastosowanie tak niskich temperatur, w przypadku ciekłego azotu (-196°C), pozwoli w założeniach teoretycznych przedłużyć czas przechowywania nasion do kilkuset lat bez konieczności reprodukcji. Dotychczasowe rezultaty uzyskane dla nasion roślin uprawnych zdają się potwierdzać wcześniejsze założenia (Stanwood 1985).

BANK GENÓW W ULTRANISKICH TEMPERATURACH ROŚLIN GINĄCYCH I ZAGROŻONYCH

Gromadzenie i ochrona *ex-situ* roślinnych zasobów genowych jest jednym ze statutowych celów ogrodów botanicznych, realizowanym poprzez utrzymanie w kolekcjach żywych roślin lub gromadzenie i przechowywanie próbek nasion w bankach genów. W przypadku roślin ginących i zagrożonych, daje to realne szanse uratowania gatunków szczególnie zagrożonych od całkowitego wyginięcia. Zastosowanie meto-

dy przechowywania nasion w ultraniskich temperaturach (w ciekłym azocie) pozwoli przechowywać nasiona w ciągu dziesiątków lub setek lat bez utraty ich żywotności. Tak zachowane próbki nasion mogą być podstawą do reintrodukcji danego gatunku po ustaniu lub minimalizacji przyczyn zagrożenia. Zastosowanie metod przechowywania w ciekłym azocie w odniesieniu do nasion roślin zagrożonych posiada tę istotną zaletę, iż wydłużając wielokrotnie czas przechowywania w stosunku do innych metod minimalizuje straty nasion koniecznych do reprodukcji populacji. Koszty utrzymania próbek w ciekłym azocie są porównywalne z kosztami utrzymania próbek nasion przy wykorzystaniu mechanicznych urządzeń chłodniczych. Istotnie mniejsze jest natomiast ryzyko utraty próbek w wyniku problemów technicznych takich jak wyłączenia energii lub poważne uszkodzenia instalacji chłodniczych.

Teoretyczne przesłanki przemawiają zdecydowanie za wykorzystaniem metod krio-przechowywania dla gromadzenia i ochrony zasobów genowych roślin ginących i zagrożonych. Aby jednak bank genów powstał i mógł być utrzymany konieczne jest prowadzenie szeregu prac eksperymentalnych.

Nasiona gatunków ginących i zagrożonych przedstawiają znaczne zróżnicowanie w zakresie fizjologii i morfologii, dodatkowo zaś zasób informacji w tej dziedzinie nie jest zbyt obszerny. Ze względu na to, iż nie są to nasiona roślin uprawnych, bardzo szczupła i fragmentaryczna jest wiedza o fizjologii ich kiełkowania, oraz o możliwościach przechowywania przy obniżonej wilgotności nasion.

Powoduje to konieczność prowadzenia wstępnych badań w stosunku do każdego gatunku jaki ma być przechowywany. Zasadniczym celem tych eksperymentów jest określenie optymalnych warunków zamrażania nasion. Parametry zamrażania nasion mogą wpływać na ich żywotność, zarówno po zamrożeniu jak i w czasie przechowywania. Decydujące znaczenie ma tu początkowa wilgotność nasion oraz szybkość spadku temperatury w czasie schładzania.

Żywotności nasion najczęściej oceniana jest przy pomocy laboratoryjnego testu kiełkowania. W przypadku nasion roślin uprawnych, znanych

jest również i wykorzystywanych, przynajmniej w ograniczonym zakresie, szereg innych testów (Grzesiuk i Kulka 1981). W odniesieniu do roślin dziko rosnących, przy szczupłości wiedzy o ich fizjologii i biochemii, zdolność kiełkowania wydaje się być najbardziej wiarygodnym testem oceny ich żywotności. W związku z bardzo ograniczoną ilością danych literaturowych dotyczących gatunków dziko rosnących, przed rozpoczęciem badań dotyczących warunków zamrażania, należy eksperymentalnie określić optymalne warunki testu kiełkowania nasion, indywidualnie dla każdego gatunku.

WYNIKI DOTYCZĄCYCH BADAŃ

W prowadzonych od 1991 roku doświadczeniach przebadano próby nasion 53 gatunków zagrożonych roślin naczyniowych flory polskiej. Listę gatunków przygotowano w oparciu o dane zawarte w następujących publikacjach: "Lista roślin zagrożonych w Polsce", "Polska czerwona księga roślin". Początkowo jako materiał do eksperymentów wykorzystywano nasiona pozyskane z kolekcji roślin chronionych i zagrożonych Ogrodu Botanicznego PAN w Warszawie. W chwili obecnej we współpracy z dr Piękoś-Mirkową dyrektorem Górskiego Ogrodu Botanicznego w Zakopanem analizowane są próbki nasion tam zebrane. Znaczna część roślin zagrożonych rosnących na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego i okolic to gatunki endemiczne szczególnie zagrożone wyginięciem.

Prace eksperymentalne obejmują badania nad optymalnymi warunkami laboratoryjnego testu kiełkowania oraz wpływu warunków zamrażania na żywotność nasion.

W przypadku wielu gatunków badanych nasion występuje zjawisko spoczynku warunkowane różnorodnymi czynnikami. W doświadczeniach dotyczących optymalizacji warunków kiełkowania nasion stosowane są metody fizyczne jak i biochemiczne w celu przerwania spoczynku nasion. Nasiona poddawane są stratyfikacji, skaryfikacji, do podłoża dodawane są fitohormony (GA₃), kiełkowanie prowadzone jest w zmiennych warunkach temperatury i oświetlenia.

Podstawowym parametrem różnicowanym w trakcie zamrażania nasion jest szybkość spad-

ku temperatury w czasie schładzania próbek. Zamrożone z różną szybkością do temperatury ciekłego azotu nasiona po rozmrożeniu kiełkowane są zgodnie z warunkami ustalonymi wcześniej.

W chwili obecnej dane dotyczące testu kiełkowania ustalono dla 39 gatunków, zaś w stosunku do 28 z nich znany jest również optymalny reżim zamrażania i rozmrażania. W roku 1993 rozpoczęto przechowywanie w ciekłym azocie pierwszych próbek 14 gatunków nasion. Ponieważ zgromadzono do przechowywania wystarczająco liczne próbki możliwe będzie zbieranie danych eksperymentalnych dotyczących żywotności nasion w czasie przechowywania.

Przechowywanie nasion w ciekłym azocie nie wymaga specjalnych technologii ani zaawansowanego wyposażenia technicznego. Nasiona w większości wypadków, bez widomych oznak spadku żywotności znoszą zamrażanie do temperatury ciekłego azotu i późniejsze rozmrażanie do temperatury pokojowej. Potwierdza to przyjęte na początku eksperymentów założenia dotyczące metodyki zamrażania i utrzymania banku nasion. Wskazuje także na wysoką przydatność krioprechowywania dla zachowania zasobów genowych roślin zagrożonych.

Zasadniczym czynnikiem limitującym tempo badań jest możliwość pozyskania dostatecznej ilości nasion. Ilości umożliwiającej przeprowadzenie testów zdolności kiełkowania i reakcji na zamrażanie oraz umieszczenie próby do przechowywania. W miarę gromadzenia wystarczającej ilości nasion próbki kolejnych gatunków umieszczone będą w ciekłym azocie.

SUMMARY

Negative changes of natural environment cause increase importance of *ex-situ* plant protection. Seed banks might be a significant and important way of protection activities realized in botanical gardens. Cryostorage sufficiently prolonged time of storage in comparison to other method. It makes possible to preserve seed of threatened plants without reproduction. A great interspecies variability of seed morphology, physiology and chemical constitution make necessary to evaluate freezing regimes individually for every species. Present results obtained in the Botanical Garden of the Polish Academy of Sciences, support a pre-

liminary hypothesis about high suitability of cryopreservation for protection of endangered plants.

LITERATURA

Andrzejewski R., Harabin Z., 1993. Obszary i gatunki chronione, w: Andrzejewski R.; Baranowski M. (red.) Stan Środowiska w Polsce, Państwowa Inspekcja Ochrony Środowiska, Centrum Informacji o Środowisku GRID - Warszawa, Warszawa: 29-42

Harrington J.F., 1973. Problems of seed storage, w: Heydecker W. (red.) Seed Ecology, Butterworths, London, 251-264

Grzesiuk S., Kulka K., 1981. Fizjologia i Biochemia Nasion, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa: 380-390

IBPGR 1984. Seed Management Techniques for Genebanks, IBPGR, Rome

Meryman H.T., 1966. Review of biological freezing, w: Meryman H.T. (red.) Cryobiology, Academic Press, London and New York: 2-106

Meryman H.T., Williams R.J., 1985. Basic principles of freezing injuries to plant cell, natural tolerance and approaches to cryoprotection, w: Kartha K.K. (red.) Cryopreservation of Plant Cells and Organs, CRC Press, Boca Raton: 14-41

Nowicki M., 1993. Strategia Ekorozwoju Polski, Ministerstwo Ochrony Środowiska, Zasobów Naturalnych i Leśnictwa, Agencja Reklamowo-Wydawnicza A. Grzegorzczak, Warszawa: 79-87

Piękoś-Mirkowa H., 1990. Ochrona gatunkowa roślin w Polsce - stan, funkcjonowanie, potrzeby, w: Klimek K. (red.) Obszarowa i Gatunkowa Ochrona Przyrody w Polsce Południowej. Funkcje, Waloryzacja, Perspektywy, Zakład Ochrony Przyrody i Zasobów Naturalnych PAN, Kraków: 141-168

Roberts E.H., 1972. Cytological, genetical, and metabolic changes associated with loss of viability, w: Roberts E.H. (red.) Viability of Seeds, Chapman and Hall, London: 253-306

Roberts E.H., 1973. Loss of viability: ultrastructural and physiological aspects, Seed Sci. and Technol. 1, 499-514

Roberts E.H., 1975. Problems of long-term storage of seed and pollen for genetic resources conservation, w: Frankel O.H.; Hawkes J.G. (red.) Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow, International Biological Programme 2, Cambridge University Press, Cambridge: 269-296

Roos E.E., 1981. Report of the storage committee working group on "Effect of storage on genetic integrity, Seed Sci. and Technol. 12, 255-260

Stanwood P.C., Bass L.N., 1981. Seed germplasm preservation using liquefied nitrogen, Seed Sci. and Technol. 9: 423-437

Stanwood P.C., 1985. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation, w: Kartha K.K. (red.) Cryopreservation of Plant Cells and Organs, CRC Press, Boca Raton: 200-225

Sakai A., Noshiro M., 1975. Some factors contributing to the survival of crop seeds cooled to the temperature of liquefied nitrogen, w: Frankel H.O.; Hawkes J.G. (red.) Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow, International Biological Programme 2, Cambridge University Press, 317-326

Światowa Strategia Ochrony Przyrody (tłum. R. Olaczek), 1985. Wyd LOP, Warszawa,

Zarzycki K., Szelaż Z., 1992. Czerwona lista roślin naczyniowych zagrożonych w Polsce, w: Zarzycki K.; Wojewoda W.; Heinrich Z. (red.) Lista Roślin Zagrożonych w Polsce, Instytut Botaniki PAN, Kraków, 87-98

Zarzycki K., Kaźmierczakowa R., (red.) 1993. Polska Czerwona Księga Roślin, Paprotniki i Rośliny Kwiatowe, Instytut Botaniki, Instytut Ochrony Przyrody PAN, Kraków