

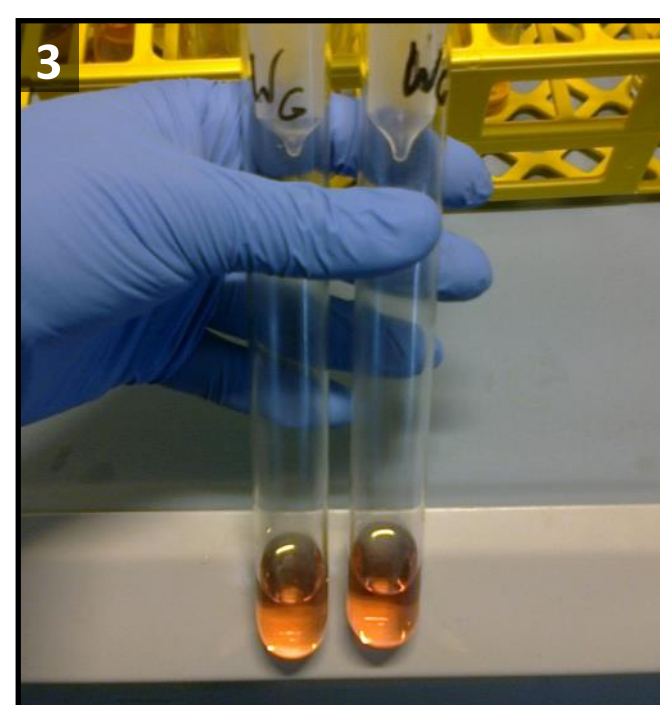
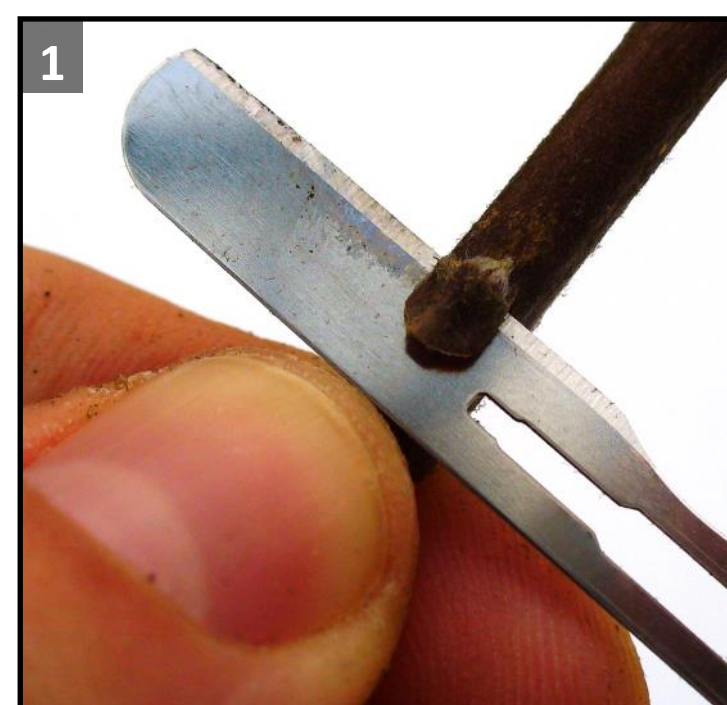


POLSKA AKADEMIA NAUK
OGRÓD BOTANICZNY

Ocena zawartości cukrów w pąkach spoczynkowych historycznych odmian jabłoni, zamrażanych w ciekłym azocie.

Konrad Woliński, Maciej Niedzielski, Wiesław Podyma

Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny - Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej w Powsinie
ul. Prawdziwka 2, 02-973 Warszawa

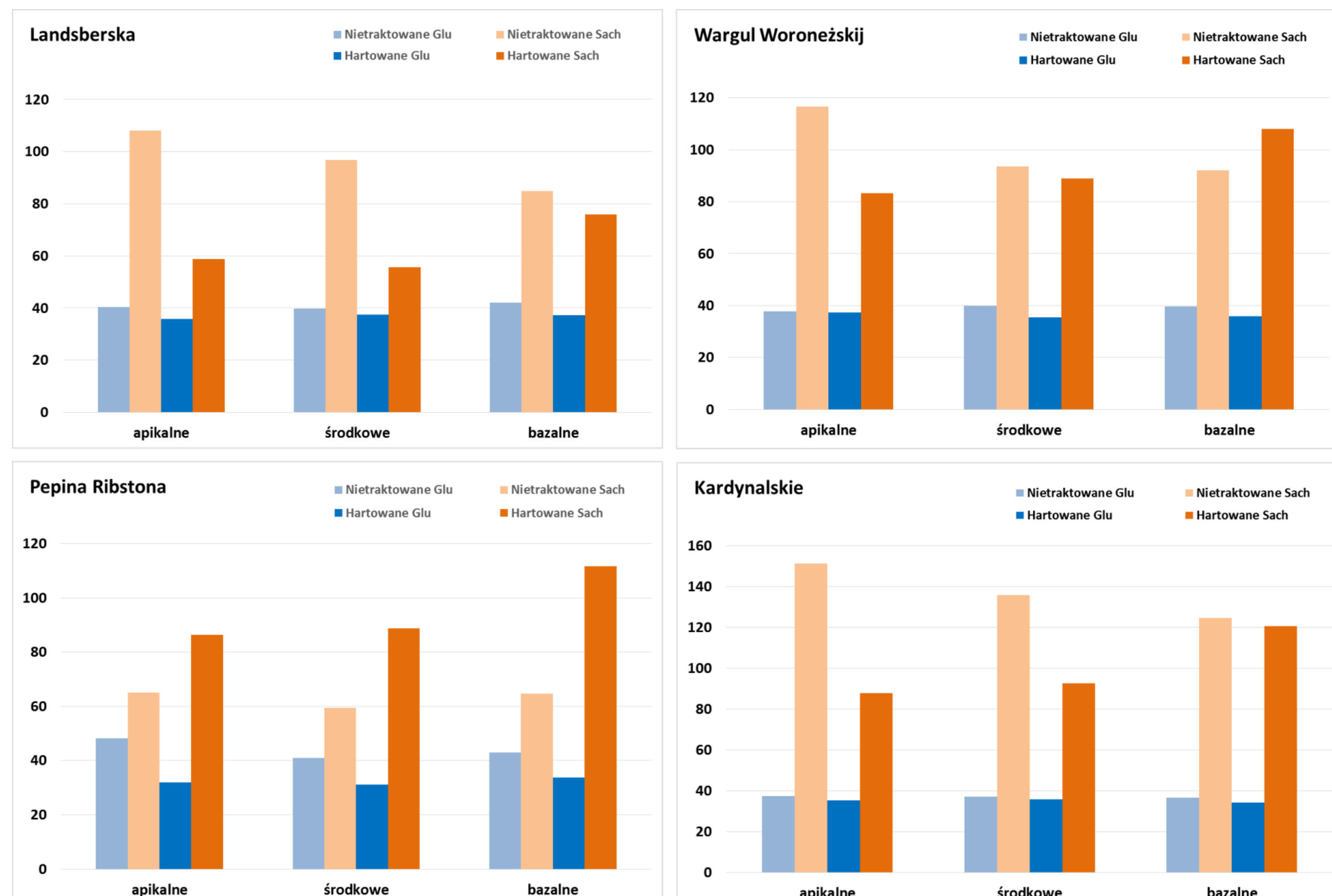


Wstęp:

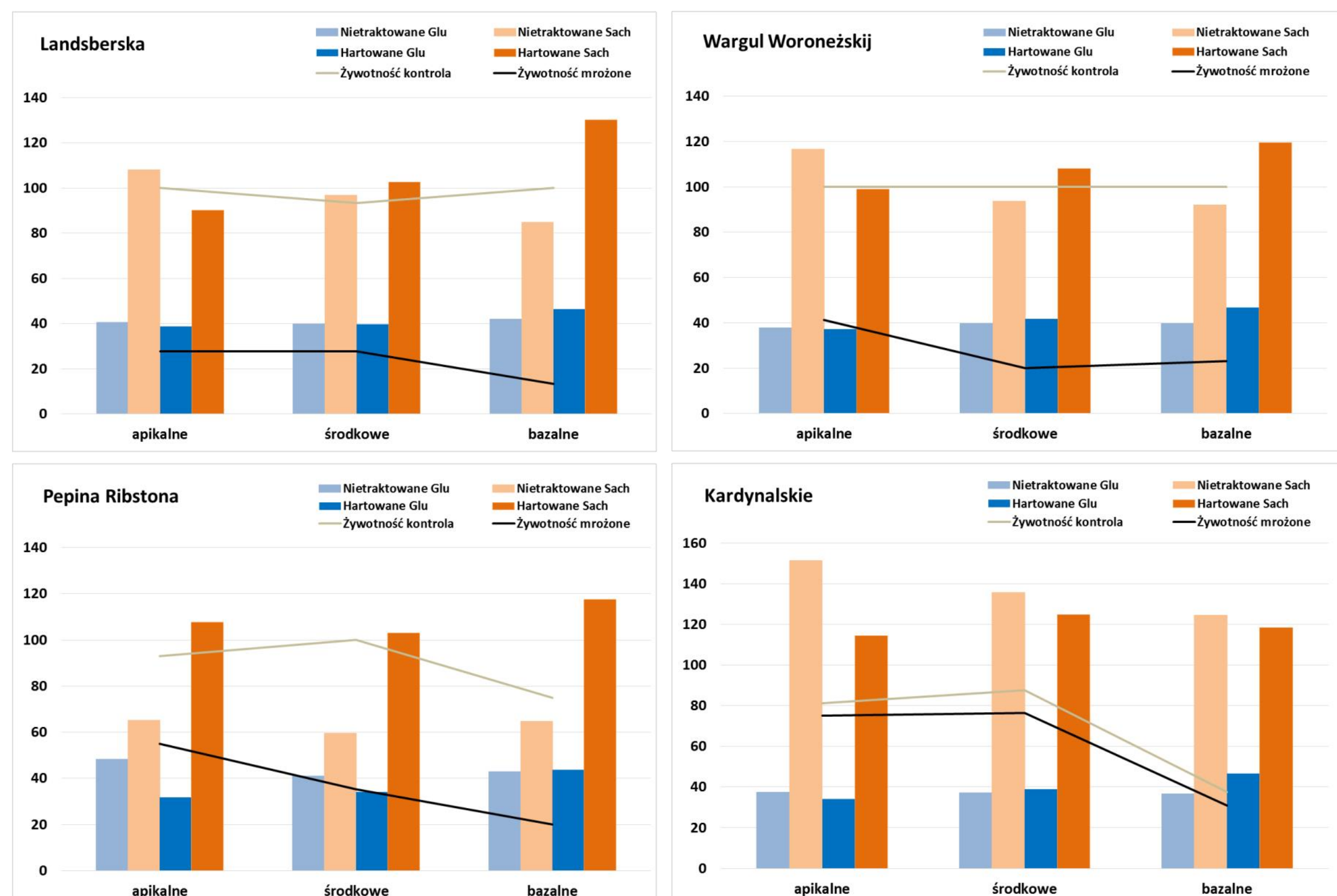
Od 2009 roku w PAN Ogródzie Botanicznym - CZRB w Powsinie tworzona jest kriogeniczna kolekcja historycznych odmian jabłoni (*Malus domestica* Mill.). Obecnie gromadzi ona 225 odmian, w dużej części reprezentując zmienność gatunku obserwowaną na terenie Polski. Wykorzystując efekt przechowywania pąków spoczynkowych w ciekłym azocie stanowi efektywną formę kolekcji dublującej kolekcje żywych roślin, a także jest w skali kraju unikalnym przedsięwzięciem tego typu dla jabłoni. Prowadzone każdorazowo oceny potwierdzają zaś skuteczność stosowanej metody dając średnio niemal 40% zdolności regeneracyjnej zamrożonych pąków i ponad 78% odmian.

W latach 2016 - 2018 oceniono zawartości cukrów (prostych i dwucukrów) w pąkach czterech odmian jabłoni. Zawartość cukrów szczególnie sacharozy jest jednym z ważniejszych elementów kształtujących odporność pąków na zamrażanie. Badane obiekty zróżnicowane ze względu na tę odporność wywodziły się z Rosji, Polski, Niemiec i Anglii. Oceniono zawartość glukozy i sacharozy w pąkach po zbiorze jak i w trakcie procedury zamrażania odniesieniu do pąków o zróżnicowanym położeniu na pędzie. Zawartość glukozy i sacharozy oceniono dla dwóch metod hartowania pędów po zbiorze. Uzyskane wyniki odniesiono do obserwowanej zdolności regeneracyjnej zamrażanych pąków.

Ocena zawartości cukrów po hartowaniu z udziałem glikolu polietylenowego (PEG 6000) w pożywce (mg/g śm):



Ocena zawartości cukrów po hartowaniu z udziałem sacharozy w pożywce (mg/g śm):



Metodyka:

Materiałem użytym do analiz były spoczynkowe pąki (1) z jednorocznych pędów jabłoni czterech odmian: Landsberska, Pepina Ribstona, Kardynalskie, Wargul Woroneżskij. Na pędach każdej z odmian wydzielano trzy odcinki (bazalny, środkowy i apikalny), z których osobno pobierano pąki. Materiał pobierano w styczniu 2017 roku z drzew rosnących w sadzie kolekcyjnym w PAN Ogródzie Botanicznym. Zbiór materiału dokonano w okresie przyjętym za optymalny dla pozyskiwania pąków z przeznaczeniem dla długoterminowego przechowywania w ciekłym azocie. Zawartość glukozy i sacharozy oznaczano w pąkach po zbiorze (kontrola), oraz po 21-dniowej inkubacji pędów w temperaturze -4°C (metodą wazonową) w pożywce MS wzbogaconej o 1M sacharozy. Równolegle prowadzono także inkubację w pożywce zawierającej 35% glikol polietylenowy (PEG 6000). Zarówno sacharozę jak i PEG zastosowano jako czynnik osmoaktywny zapobiegający zamarzaniu pożywki w czasie inkubacji. Inkubacja pędów po zbiorze jest rutynowo wykorzystywana jako zabieg hartowania pędów w przypadku braku odpowiednio długiego okresu temperatur ujemnych warunkującego wysoką odporność pąków na zamrażanie. Żywotność pąków oceniano po 5 dniowym uwodnieniu jednopąkowych fragmentów pędu w torfie w temperaturze pokojowej. Żywotność pąków i sąsiednich tkanek oceniano na przekroju wzdłużnym na podstawie barwy, przyjmując jako w pełni żywotne tkanki zielone bez obecności nekrotycznych brązowych obszarów.

Zawartość cukrowców wykonywano metodą DNS (kwas 3,5-dinitrosalicylowy). Do uzyskania roztworu podstawowego ok. 400 mg tkanki pąka (2) rozdrobnionej mechanicznie trzykrotnie ekstrahowano 15 minut we wrzącej łaźni wodnej z 5 ml wody destylowanej. Połączone ekstrakty po wystudzeniu uzupełniano do 50 ml i przesączano przez papierowy sączek. Glukozę oznaczano biorąc 2 ml roztworu bazowego i poddając go reakcji z 2 ml odczynnika DNS (1% kwas 3,5-dinitrosalicylowy) we wrzącej łaźni wodnej. Czas inkubacji wynosił 15 min. Intensywność barwnej reakcji oceniano spektrofotometrycznie przy długości fali 520 nm

Zawartość sacharozy oceniano po 30 minutowej hydrolizie. Do próbek opatrzonych chłodniczkami dodawano 5 ml roztworu bazowego i 1 ml 6M kwasu solnego. Roztwór po reakcji zobojętniano 1 ml 6M ługu sodowego. Do reakcji z DNS (2 ml) pobierano 1 ml hydrolizatu (3) i 1 ml wody destylowanej. Roztwór inkubowano przez 15 min we wrzącej łaźni wodnej. Oceniano spektrofotometrycznie przy długości fali 520 nm. Zawartość cukrowców oznaczano na podstawie odczytów krzywej standardowej.

Wyniki:

Zawartość rozpuszczalnych węglowodanów jest jednym z istotnych czynników decydujących o odporności komórek na odwadnianie i niskie, także ujemne temperatury. Obserwowano wyraźne zróżnicowanie odporności na zamrażanie w ciekłym azocie pomiędzy odmianami jabłoni. Celem badań była ocena zróżnicowania zawartości glukozy i sacharozy, podstawowych węglowodanowych składników tkanek w spoczynkowych pąkach czterech odmian jabłoni w fazie naturalnego spoczynku jak i poddanych dodatkowo hartowaniu. Zawartość cukrów rozpuszczalnych analizowano w zależności od położenia pąka na pędzie.

Zawartość glukozy w pąkach spoczynkowych jabłoni nie wykazała wyraźnego zróżnicowania w odniesieniu do położenia pąków na pędzie, jak i stopnia zahartowania materiału w przypadku odmian Landsberska, Wargul Woroneżskij i Kardynalskie. Odmiany te w dotychczasowej praktyce wykazywały wysoką odporność na zamrażanie w ciekłym azocie. W przypadku pąków odmiany Pepina Ribstona odmiany wrażliwszej na zamrażanie, obserwowano najwyższy poziom zawartości glukozy. Zabieg hartowania pąków szczególnie w odniesieniu do pąków pozyskiwanych z apikalnej i środkowej części pędu powodował wyraźny spadek zawartości glukozy, co wiązało się również z podniesieniem odporności na zamrażanie. Niewielkie podwyższenie zawartości glukozy obserwowano w pąkach pozyskiwanych z bazalnych części pędu hartowanych w obecności sacharozy.

Zawartość sacharozy w pąkach badanych odmian jabłoni była na poziomie 2-3 krotnie wyższym niż zawartość glukozy. Zaznaczył się tylko niewielki wpływ położenia pąka na pędzie na zawartość sacharozy. Najwyższy poziom wykazywały pąki usytuowane w szczytowej części pędu. Zabieg hartowania pąków powodował w przypadku zastosowania jako dodatku do pożywki sacharozy wzrost jej zawartości w pąkach, szczególnie zbieranych z bazalnych fragmentów pędu. Zastosowanie jako dodatku do pożywki PEG 6000 powodowało niewielkie obniżenie zawartości sacharozy. Wydaje się, iż zastosowanie sacharozy jako dodatku do pożywki w zabiegu hartowania jest wyborem lepszym niż PEG 6000. Jednocześnie żywotność pąków jabłoni zamrażanych w ciekłym azocie jest wynikiem nie tylko obecności cukrów szczególnie sacharozy, ale także innych czynników takich jak położenie pąka na pędzie, czy zróżnicowanie międzyodmianowe.