

Efectul azotului lichid (-196°C) asupra polenului unor specii cultivate sau ornamentale

Liquid Nitrogen (-196°C) effect under pollen of some cultured or ornamental species

Monica ȘIPOȘ¹, Sabina GLIGOR²

¹University of Oradea, Department of Biology, Oradea, Romania, siposmonica@yahoo.com

²Student, University of Oradea, Department of Biology, Oradea, Romania

Abstract. The criopreservation involve the stock of the vegetal material at low temperatures (-196°C) in liquid nitrogen, in thermal conditions in which the division of cells and metabolic processes slow down, thus that the samplings may be conserved for long periods without suffering any genetic modifications. This stock technique is applied till present only on 80 vegetal species, keeping their seeds and vitrocultures preponderantly; researches were made regarding the maintenance of pollen in liquid nitrogen.

The mature pollen, able to resist a higher degree of desiccation, may be conserved at low temperatures, without criopreservation. It was made researches on criopreservation of rise, maize, wheat, roses, sun flower and soy pollen. Our study purpose was to follow the impact of liquid nitrogen (-196°C) about on viability of some cultured and ornamental species. The designed time of criopreservation it was 30 minutes and 7 days, using the TTC (tripheniltetrazole chloride) method which allows testing the viability of vegetal material based on dehydrogenase activity.

It was observed at *Petunia hybrida* species, that the pollen viability was low - in relevance with the witness represented from the pollen which was not resigned to the nitrogen liquid treatment - between percentage limits of 3.5-8%, in the case when the vegetal material was submersed 30 minutes in liquid nitrogen and 7.5-14.5% 7 days at (-196°C). The submersing of *Nicotiana alata* var. *grandiflora* species at 7 days, determined a low viability with 11.53%. The following two studied species *Cucurbita* and *Hosta* were proved to be the most resistant at submersing and maintenance in liquid nitrogen. The most affected pollen was *Campsis radicans* species. At *Datura stramonium* species was observed 2.59% a low viability of pollen, after 30 minutes of liquid nitrogen treatment, was 19.56%, after 7 days of submersing, the most pollen granules losing completely their viability.

Cuvinte cheie: crioprezervare, azot lichid, polen, *Petunia hybrida*, *Nicotiana alata* var. *grandiflora*, *Cucurbita pepo*, *Hosta plantaginea*, *Campsis radicans*, *Datura stramonium*

Keywords: criopreservation, liquid nitrogen, pollen, *Petunia hybrida*, *Nicotiana alata* var. *grandiflora*, *Cucurbita pepo*, *Hosta plantaginea*, *Campsis radicans*, *Datura stramonium*

Introducere

Crioprezervarea implică stocarea materialului vegetal la temperaturi joase (-196°C), în azot lichid, condiții termice în care diviziunea celulară și procesele metabolice încetează, astfel încât probele pot fi conservate pe perioade lungi de timp fără a suferi modificări genetice (Engelmann 2004). Extinderea utilizării acestei tehnici moderne de păstrare, în țări mai puțin dezvoltate, este împiedicată de costurile ridicate ale echipamentelor, reactivilor, mediilor de cultură, precum și de cerința unui personal cu înaltă calificare. De aceea, această tehnică de stocare este aplicată până în prezent doar la 80 de specii vegetale (Străjeru et al. 2001). Preponderent se păstrează semințele și, la ora actuală, se lucrează intens pentru perfecționarea tehnicilor de crioconservare a cormofito inoculilor și se fac cercetări și în ceea ce privește păstrarea polenului în azot lichid.

Polenul matur, apt să suporte un grad ridicat de deshidratare, poate fi conservat cu ușurință la temperaturi scăzute, fără o prealabilă crioprotecție a acestuia. S-a submersat în azot lichid polen de *Triticum aestivum* (Andreica et al. 1988), *Helianthus annuus* (Andreica și Spârchez 1990), de *Zea mays* (Broglia și Brunori 1994), de *Rosa* sp. (Rajasekharan și Ganesan 1994). Polenul de la 12 genotipuri aparținând speciilor anuale de soia, *Glycine* sp., precum și de la rudele lor sălbatice, perene, a fost stocat fără o predesicare, la -

20°C și la -196°C. După această operație a fost testată viabilitatea polenului prin cultură "in vitro", urmărindu-se dacă acesta germinează. Polenul de la genotipurile anuale de soia, stocat la -20°C, își menține viabilitatea pentru 4 luni, iar cel de la genotipurile perene își pierde capacitatea de a germina "in vitro". După crioprezervarea acestuia, s-a constatat că, polenizarea a fost la fel de eficientă ca și cea cu polen proaspăt. Rezultatele obținute sugerează că, la soia, crioprezervarea polenului poate fi folosită cu succes, oferind posibilitatea de a conserva gene haploide (Tyagi și Hymowitz 2003).

Polenul conservat prin metodele clasice sau crioconservat, poate fi utilizat în procesele de ameliorare a plantelor, în transgeneză (Cristea și Denaeyer 2004), în androgeniza experimentală (Prisecaru și Ghiorghiță 2002). Păstrarea polenului este o practică obișnuită în lucrările de ameliorare, mai ales atunci când nu există concordanță între data înfloritului la inflorescențele femeiești și la cele bărbătești, cum este de exemplu la porumb.

Cercetările noastre au urmărit efectul exercitat de azotul lichid asupra viabilității polenului de *Petunia hybrida* var. *axillaris*, *Petunia hybrida* var. *integrifolia*, *Petunia hybrida* var. *atkinsiana*, *Nicotiana alata* var. *grandiflora*, *Cucurbita pepo*, *Hosta plantaginea*, *Campsis radicans*, *Datura stramonium*, după menținerea acestuia timp de 30 de minute și de 7 zile la -196°C.

Material și Metodă

S-a recoltat polenul din florile mature, în plină perioadă de înflorire și a fost introdus în criotuburi, care au fost izolate cu parafilm. Submersarea în azot lichid s-a făcut rapid, prin plonjare directă. Decongelarea s-a efectuat rapid, în apă caldă, la 40°C, după care s-a introdus în fiecare criotub câte 2 ml soluție TTC 0,5% și probele au fost incubate timp de 30 de minute la 37°C, apoi au fost analizate microscopic. Soluția de 2,3,5-trifeniltetrazolium clorid (praf de culoare galbenă, otrăvitor) a fost preparată dizolvând 5 mg TTC la 1 ml soluție tampon fosfat de Na 0,2 M, cu pH = 7,2. Viabilitatea în cadrul acestei metode a fost testată pe seama activității dehidrogenazice. Aceste enzime reduc TTC-ul la formazan, care este de culoare roșie (Șipoș 2004; Samuel et al. 2005).

Examinare microscopică s-a efectuat utilizând garnitura ocular 10x și obiectiv 10x sau 40x. S-au analizat la microscop câte 3 preparate pentru fiecare specie și varietate, câte 5 câmpuri microscopice din fiecare preparat, deci în total 15 câmpuri microscopice. S-au numărat, în câmpurile alese, granulele de polen roșii, care și-au păstrat complet viabilitatea (dehidrogenazele sunt active), cele cu viabilitate parțială, care s-au colorat roșu deschis, iar polenul neviabil a fost de culoare galbenă (citoplasma a fost distrusă și prin urmare nici enzimele nu au mai fost active).

Rezultate și Discuții

Datele brute obținute, pentru fiecare specie, în urma analizării câmpurilor microscopice luate în studiu, au fost inserate în tabelul 1, rezultatele experimentale fiind expuse și în valori procentuale.

S-a acordat importanță mai ales polenului complet viabil, acest fiind apt pentru germinație și polenizare.

La *Petunia hybrida*, analizând rezultatele procentuale inserate în tabelul 1, se poate observa că, în urma submersării polenului în azot lichid, la cele 3 varietăți luate în studiu, viabilitatea totală a acestuia a scăzut între limitele procentuale de 3,5-8%, în cazul în care a fost tratat timp de 30 de minute cu azot lichid și între 7,5-14,5%, dacă a fost menținut timp de 7 zile la -196°C. S-a putut constata mai ales o scădere parțială a viabilității granulelor de polen.

Submersarea timp de 7 zile în azot lichid a polenului de *Nicotiana alata* var. *grandiflora* a determinat o scădere cu 11,53% a viabilității totale a granulelor de polen, cele mai multe pierzându-și complet viabilitatea. Tratamentul de scurtă durată, 30 de minute, s-a dovedit a fi mai puțin nociv, viabilitatea totală a polenului scăzând cu doar 1,78%.

Tabelul 1. Datele brute și exprimarea lor procentuală, privind viabilitatea polenului, postcriotocare în azot lichid (-196°C) timp de 30 de minute și de 7 zile, la: *Petunia hybrida* var. *axillaris*, *Petunia hybrida* var. *integrifolia*, *Petunia hybrida* var. *atkinsiana*, *Nicotiana alata* var. *grandiflora*, *Cucurbita pepo*, *Hosta plantaginea*, *Campsis radicans*, *Datura stramonium*.

Speciile și varietățile	Viabilitate polen	Martor, netratat cu azot lichid		Timpul destinat submersării în azot lichid			
				30 minute		7 zile	
		Date brute	%	Date brute	%	Date brute	%
<i>Petunia hybrida</i> var. <i>axillaris</i>	Viabilitate totală	133	38,22	72	30,23	91	30,58
	Viabilitate parțială	91	25,80	57	23,82	94	31,50
	Neviabile	125	35,98	110	45,95	113	37,92
<i>Petunia hybrida</i> var. <i>integrifolia</i>	Viabilitate totală	141	37,97	129	34,1	67	23,77
	Viabilitate parțială	80	21,42	88	22,98	98	34,89
	Neviabile	159	40,6	175	42,91	117	41,33
<i>Petunia hybrida</i> var. <i>atkinsiana</i>	Viabilitate totală	172	45,14	110	40,74	101	32,37
	Viabilitate parțială	78	20,47	65	24,07	99	31,73
	Neviabile	131	34,38	95	35,19	112	35,90
<i>Nicotiana alata</i> var. <i>grandiflora</i>	Viabilitate totală	132	43,47	133	41,69	98	31,94
	Viabilitate parțială	91	30,40	100	31,35	103	32,8
	Neviabile	79	26,13	86	26,96	111	35,35
<i>Cucurbita pepo</i>	Viabilitate totală	248	93,56	197	91,23	222	89,96
	Viabilitate parțială	7	2,62	8	3,65	3	1,26
	Neviabile	10	3,82	11	5,11	23	8,77
<i>Hosta plantaginea</i>	Viabilitate totală	372	94,44	388	91,49	351	91,42
	Viabilitate parțială	0	0	0	0	0	0
	Neviabile	22	5,56	36	8,51	33	8,58
<i>Campsis radicans</i>	Viabilitate totală	138	49,15	50	16,09	58	25,44
	Viabilitate parțială	57	20,35	57	18,37	59	25,67
	Neviabile	86	30,5	204	65,54	112	48,89
<i>Datura stramonium</i>	Viabilitate totală	136	42,89	126	40,3	70	23,33
	Viabilitate parțială	64	20,21	48	15,33	63	20,86
	Neviabile	117	36,90	139	44,37	167	55,81

Polenul următoarelor două specii luate în studiu, *Cucurbita* și *Hosta*, s-a dovedit a fi cel mai rezistent la submersarea și menținerea în azot lichid. Viabilitatea totală a acestuia scade cu 2-3%, după 30 de minute de tratament și cu 3-4%, după 7 zile de menținere la -196°C. Probabil că această rezistență se datorează, printre altele, și faptului că granulele de polen sunt mari ca dimensiuni, 61-74 μm, iar exina este groasă, cu ornamentații bine reprezentate, la polenul ambelor specii.

Cel mai afectat s-a dovedit a fi polenul de *Campsis radicans*, a cărui viabilitate totală a scăzut, după 30 de minute de submersare în azot lichid, cu 33,06%, majoritatea granulelor de polen pierzându-și complet viabilitatea. Spre deosebire de celelalte specii luate în studiu, la *Campsis*, submersarea polenului timp de 30 de minute în azot lichid a avut un efect mai nociv asupra viabilității acestuia, decât menținerea timp de 7 zile la -196°C, când parametrul urmărit a scăzut cu 23,71%.

La *Datura stramonium* s-a constatat o scădere a viabilității totale a polenului, care a crescut de la 2,59%, după 30 de minute de submersare în azot lichid, la 19,56%, după 7 zile de submersare, cele mai multe granule de polen pierzându-și viabilitatea complet.

Concluzii

Se poate realiza cu succes crioprezervarea polenului de *Cucurbita pepo* și *Hosta plantaginea*. Polenul de *Petunia hybrida*, *Nicotiana glauca* și *Datura stramonium* suportă bine expunerea în azot lichid (-196°C).

Sensibil la crioprezervare s-a dovedit a fi polenul de *Campsis radicans*.

Bibliografie

- Andreica, A., Spârchez, C. (1990): Germinarea in vitro a polenului de floarea soarelui păstrat în condiții de temperatură scăzută, St. Cercet. Biol., Veget., 42 (1): 51-53.
- Andreica, A., Spârchez, C., Soran, V. (1988): Germinarea polenului de grâu în condiții normale și de criostocare. Stud. Cercet. Biol. Ser. Biol. Veg., 40 (1):55-58.
- Broglia, M., Brunori, A. (1994): Synergistic effect of low temperature and high sucrose concentration on maize pollen viability in aqueous medium. Crop Sci., 34:528-529.
- Cristea, V., Denaeyer, S. (2004): De la biodiversitate la OGM-uri ?, Ed. Eikon, Cluj-Napoca.
- Engelmann, F. (2004): Plant Cryopreservation: progress and prospects, In Vitro Cellular and Development Biology-Plant, vol.40 (5):427-433.
- Prisecaru, M., Ghiorghiță, G. (2002): Haploidia experimentală în contextul biotehnologiilor moderne, Ed. Tehnică, București.
- Rajasekharan, P.J., Ganeshan, S. (1994): Freeze preservation of rose pollen in liquid nitrogen: feasibility, viability and fertility status after long-term storage. J.Hort. Sci., 63, 3: 565-569.
- Samuel, A.D., Vicaș, S. (2005) Actual and potential dehydrogenase activitate in a brown luvic soil, Studii și cercetări științifice, Seria Biologie, nr.10: 191-194.
- Samuel, A.D., Vicaș, S., Șipoș, M. (2005): Dehidrogenase and catalase activities in a brown luvic soil under wheat and maize crops, Analele Univ. Oradea, Fasc. Biologie, 12: 143-146
- Străjeru, S., Murariu, D., Popa, M., Plăcintă, D. (2001): Conservarea și utilizarea resurselor genetice vegetale, Ed. Universității, Suceava.
- Șipoș, M. (2004): Îndrumător pentru lucrările practice de citologie, Ed. Universității din Oradea.
- Tyagi, R.K., Hymowitz, T. (2003): Pollen from *Glycine* species survive cryogenic exposure, CryoLetters 24 :119-124.