



Indukcja, namnażanie i przechowywanie tkanki embriogennej świerka serbskiego w warunkach ciekłego azotu

Teresa Hazubska-Przybył, Krystyna Bojarczuk
Instytut Dendrologii, Polska Akademia Nauk, Kórnik

Induction, proliferation and maintenance of embryogenic tissues of Serbian spruce in liquid nitrogen

Summary

Picea omorika (Pančić.) Purk. is an endemic species, threatened with extinction in the wild. Besides, it is a valuable species for nursery production. Hence it is necessary to protect its genetic resources *ex situ*. Somatic embryogenesis is a very beneficial micropropagation method because of potentially high regeneration rate and possibilities to maintain embryogenic tissue and somatic embryos in liquid nitrogen (LN). That is why the aim of this study was to induce embryogenic tissue culture of *Picea omorika* (Pančić.) Purk.

Key words:

Picea omorika, somatic embryogenesis, growth regulations, sucrose, silica gel, cryopreservation.

1. Wstęp

Świerk serbski (*Picea omorika* Pančić. Purk.) to endemiczny i reliktowy gatunek świerka, o ograniczonym zasięgu występowania, obejmującym tereny Serbii i Bośni (1). Cechą wyróżniającą go spośród innych gatunków świerka jest kolumnowy pokrój korony, szczególnie widoczny u dorosłych osobników. W Polsce uprawia się go obecnie w formie nasadzeń w parkach lub przydomowych ogródkach, głównie ze względu na nieopartarzalne walory dekoracyjne i odporność na mrozy, susze oraz zanieczyszczenia powietrza (1).

Adres do korespondencji

Teresa Hazubska-Przybył,
Pracownia Rozmnażania
Wegetatywnego,
Instytut Dendrologii,
Polska Akademia Nauk,
ul. Parkowa 5,
62-035 Kórnik;
e-mail: hazubska@o2.pl

Somatyczną embriogenezę świerka serbskiego uzyskano po raz pierwszy na początku lat dziewięćdziesiątych XX w. (2,3) w Serbii. W Polsce badania nad somatyczną embriogenezą *Picea omorika* podjęto w Instytucie Dendrologii PAN w Kórniku uzyskując pozytywne wyniki mikrorozmnażania dla tego gatunku świerka (4,5). Obecnie prowadzone są badania nad kriokonserwacją wyselekcjonowanych, najbardziej produktywnych linii embriogenicznych *Picea omorika*, bowiem jak dotąd nie ma doniesień dotyczących możliwości przechowywania jego tkanek embriogenicznych lub somatycznych zarodków w temperaturze ciekłego azotu.

Celem podjętych badań było zaindukowanie i namnożenie tkanki embriogenicznej *Picea omorika* (materiału przeznaczonego do zamrożenia w ciekłym azocie) oraz określenie zdolności regeneracyjnych tkanki po zabiegu kriokonserwacji.

2. Materiał i metodyka

2.1. Indukcja i namnażanie kultur embriogenicznych

Tkanki embriogeniczne *Picea omorika* zaindukowano z dojrzałych zygotycznych zarodków, pobranych z nasion, zebranych z drzew rosnących na terenie Arboretum Kórnickiego. Kulturę inicjalną prowadzono w fitotronie, w ciemności i temp. $24 \pm 1^\circ\text{C}$, na dwóch pożywkach: BM (6) i LM (7), w której obniżono o połowę stężenie składników ($\frac{1}{2}$ LM). Dla obu pożywek testowano następujące warianty stężeń regulatorów wzrostu: a) 2,4-D ($9 \mu\text{M}$) + BA ($4,5 \mu\text{M}$); b) NAA ($9 \mu\text{M}$) + BA ($4,5 \mu\text{M}$); c) Pikloram ($9 \mu\text{M}$) + BA ($4,5 \mu\text{M}$). Pożywki uzupełniono sacharozą, w stężeniu 10 g/l oraz L-glutaminą (po autoklawowaniu), w stężeniu 450 mg/l . Odczyn pożywek ustalono na poziomie 5,8.

Po ośmiu tygodniach od wyłożenia eksplantatów na testowane pożywki określono procent dojrzałych zygotycznych zarodków, z których uzyskano tkankę embriogeniczną (częstotliwość wytwarzania TE).

Namnażanie tkanek embriogenicznych prowadzono na pożywce $\frac{1}{2}$ LM, stosując wymienione warianty stężeń regulatorów wzrostu. Pomiaru masy TE, rosnącej na pożywce z określonym składem regulatorów wzrostu, dokonano w dwudziestym drugim dniu prowadzenia kultury.

2.2. Kriokonserwacja

Kriokonserwację tkanki embriogenicznej *Picea omorika* prowadzono w kolejnych etapach:

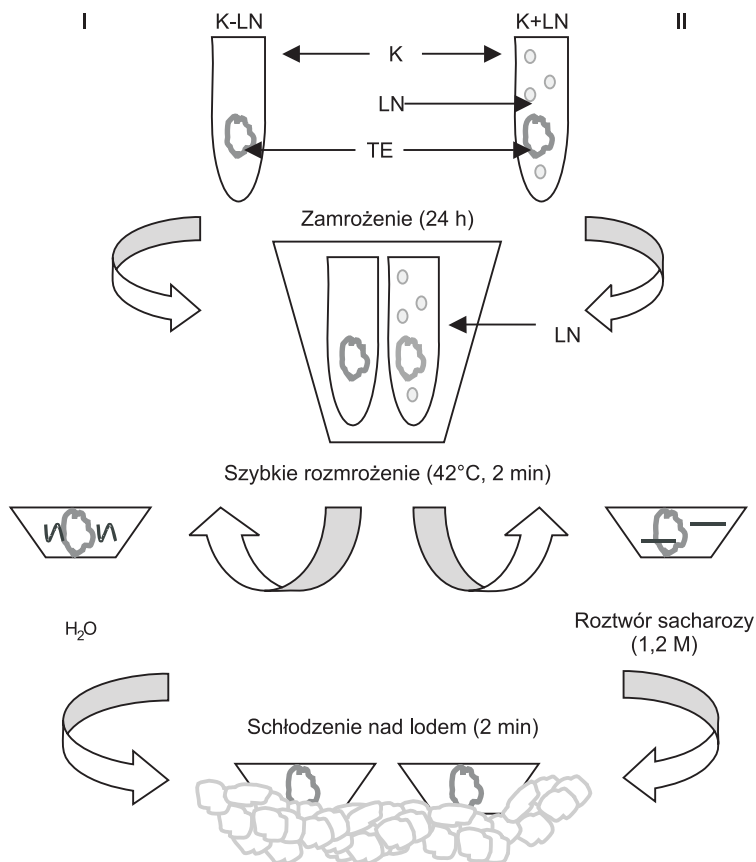
a. Prekultura TE, polegająca na traktowaniu pożywką $\frac{1}{2}$ LM, uzupełnioną o sacharozę w stężeniu 0,25; 0,5; 0,75 i 1 M. Czas traktowania tkanki poszczególnymi

stężeniami sacharozy wynosił odpowiednio: 1,1,2 i 3 dni, w sumie 7 dni. Wariant kontrolny stanowiła tkanka embriogenna, która nie podlegała prekulturze na pożywce z dodatkiem sacharozy w wysokich stężeniach. Prekulturę prowadzono w ciemności w temp. $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

b. Zabieg poduszowania tkanki nad żelem krzemionkowym w temp. $25 \pm 1^\circ\text{C}$ trwał 2 godziny. Zawartość wody w TE, po poduszowaniu, a przed zamrożeniem w ciekłym azocie, wynosiła 20%.

c. Zamrożenie i rozmrożenie tkanki z ciekłego azotu odbywało się dwoma sposobami, co zilustrowano na rysunku 1.

d. Uwodnienie rozmrożonej TE (po schłodzeniu nad lodem) w pożywce $\frac{1}{2}$ LM, z dodatkiem sacharozy, w stężeniu 1; 0,75; 0,5 i 0,25 M, poprzez traktowanie tkanki poszczególnymi stężeniami cukru po 1,5 h. Zabieg ten prowadzono w temp. $25 \pm 1^\circ\text{C}$.



Rys. 1. Schemat zamrażania i rozmrażania tkanki embriogenicznej świerka serbskiego z ciekłego azotu dwoma sposobami: I K-LN – wariant mrożenia tkanki bez dodatku ciekłego azotu do krioprobówki; II K+LN – wariant mrożenia tkanki z dodatkiem ciekłego azotu do krioprobówki; K – krioprobówka, LN – ciekły azot, TE – tkanka embriogenna.

e. Kultura odzyskanej TE na pożywce $\frac{1}{2}$ LM, zawierającej regulatory wzrostu: Pikloram ($9 \mu\text{M}$) i BA ($4,5 \mu\text{M}$) oraz sacharozę (10 g/l) i L-glutaminę (450 mg/l).

W trakcie prowadzenia kultury oceniono żywotność i zdolność do ponownego wzrostu tkanki embriogenicznej *Picea omorika* w 7. 14. i 21. dniu po rozmrożeniu z ciekłego azotu.

2.3. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną danych dla indukcji tkanki embriogenicznej prowadzono na podstawie testu X^2 , natomiast dla namnażania i kriokonserwacji tkanki, stosując jednoczynnikową analizę wariancji na bazie testu Tukeya, przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

3. Wyniki

3.1. Indukcja i namnażanie kultur embriogenicznych

Indukcję tkanki embriogenicznej *Picea omorika* z dojrzałych zygotycznych zarodków uzyskano w zakresie 0-23,8%, w zależności od rodzaju pożywki i regulatorów wzrostu (tab. 1). Częstotliwość wytwarzania TE przez eksplantaty była wyższa dla pożywki $\frac{1}{2}$ LM, w stosunku do pożywki BM, niezależnie od zastosowanych regulatorów wzrostu. Najlepszy wynik indukcji TE zanotowano dla tej pożywki, z dodatkiem Pikloramu ($9 \mu\text{M}$) i BA ($4,5 \mu\text{M}$). Otrzymany wynik nie był jednak statystycznie istotny.

Tabela 1

Indukcja tkanki embriogenicznej z dojrzałych zygotycznych zarodków *Picea omorika* na pożywce BM i $\frac{1}{2}$ LM, uzupełnionej o różne auksyny ($9 \mu\text{M}$) i BA ($4,5 \mu\text{M}$)

Regulatory wzrostu	Eksplantaty z tkanką embriogeniczną (%)	
	Pożywka	
	BM	$\frac{1}{2}$ LM
2,4-D + BA	2,5	21,3
NAA + BA	0	22,5
Pikloram + BA	1,3	23,8
Wartość poziomu p	0,24686	0,93080

Tempo namnażania tkanki embriogenicnej *Picea omorika*, było istotnie zależne od kombinacji regulatorów wzrostu zastosowanych w pożywce $\frac{1}{2}$ LM. Najkorzystniejszy wzrost tkanki obserwowano w trakcie prowadzenia kultury na pożywce z dodatkiem Pikloramu, w stężeniu $9 \mu\text{M}$ i BA, w stężeniu $4,5 \mu\text{M}$ (tab. 2).

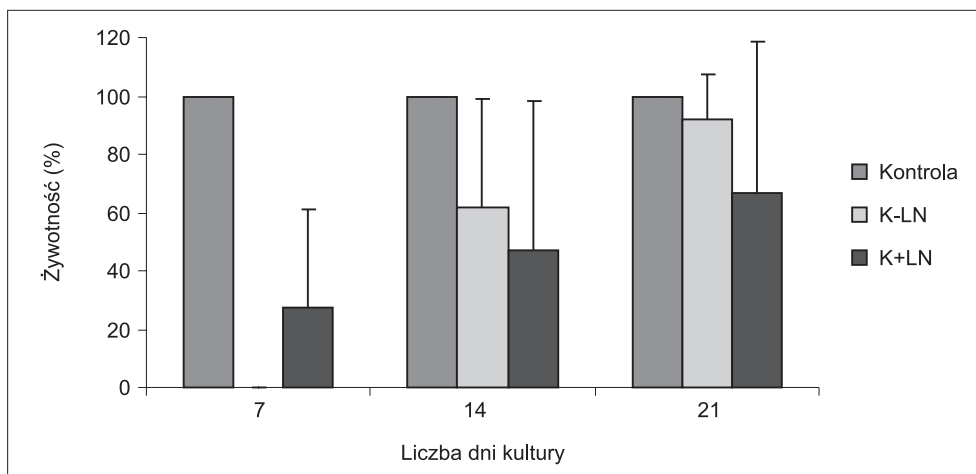
Tabela 2

Wpływ rodzaju zastosowanej auksyny ($9 \mu\text{M}$) i BA ($4,5 \mu\text{M}$) w pożywce $\frac{1}{2}$ LM na wzrost masy tkanki embriogenicnej *Picea omorika* (średnia \pm odchylenie standardowe)

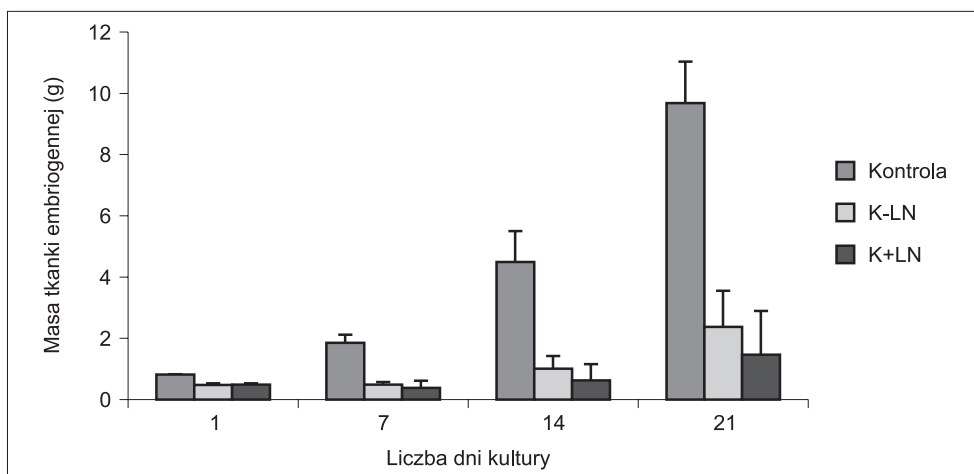
Regulatory wzrostu	Masa tkanki embriogenicnej (g)
2,4-D + BA	0,11 a \pm 0,06
NAA + BA	0,14 ab \pm 0,03
Pikloram + BA	0,17 b \pm 0,03
Wartość poziomu <i>p</i>	0,017683

3.2. Kriokonserwacja

Liczba fragmentów tkanki zdolnych do życia, po rozmrożeniu z ciekłego azotu, stopniowo wzrastała w trakcie trzech tygodni prowadzenia kultury embriogenicnej (rys. 2). W 21. dniu po rozmrożeniu żywotność tkanki dla wariantu K-LN, wynosiła ok. 92%, natomiast dla wariantu K+LN ok. 67% (rys. 2). W przypadku wariantu K+LN, w materiale zamrażanym w krioprobówce uzupełnionej ciekłym azotem, po-



Rys. 2. Żywotność (%) tkanki embriogenicnej w trakcie 21-dniowej kultury po rozmrożeniu z ciekłego azotu. Kontrola – tkanka nie mrożona, K-LN-1 i K+LN jak na rys. 1.



Rys. 3. Wzrost (g świeżej masy) tkanki embriogennej *Picea omorika*, rozmrożonej z ciekłego azotu w trakcie 21-dniowej kultury na pożywce namnażającej $\frac{1}{2}$ LM. Kontrola – tkanka nie mrożona, K-LN-1 i K+LN jak na rys. 2.

jawiały się często infekcje grzybowe i bakteryjne, co miało wpływ na ujawnienie się różnic w żywotności tkanki pomiędzy porównywanymi metodami mrożenia.

Podjęcie wzrostu przez TE zaobserwowano między 7. a 14. dniem po rozmrożeniu (rys. 3). Wzrost masy TE był niższy w przypadku wariantu K+LN, w stosunku do wariantu K-LN, co podobnie jak w przypadku jej żywotności wynikało z utraty części rozmrożonego materiału na skutek zaistniałych infekcji.

4. Dyskusja

Indukcję tkanki embriogennej drzew gatunków iglastych otrzymywano z niedojrzałych i dojrzałych zygocytynych zarodków, pobieranych z nasion (8,9). Wydajniejszym rodzajem eksplantatów, częściej wytwarzającym tkankę embriogenną, są zarodki niedojrzałe. Według Parka i wsp. (10), częstotliwość indukcji tkanki embriogennej *Picea glauca* była ponad dwukrotnie wyższa dla niedojrzałych zygocytynych zarodków (46,8%), w porównaniu z zarodkami dojrzałymi (20,8%). Jednakże pozyskanie zarodków w odpowiednim etapie rozwoju jest utrudnione, ponieważ są one dostępne tylko w ściśle określonym czasie liczącym od momentu zapłodnienia. Dogodniejszym źródłem eksplantatów są dojrzałe zarodki zygocytynne, które można pozyskiwać z nasion przechowywanych w chłodni przez dłuższy czas.

W przeprowadzonych badaniach otrzymaliśmy tkankę embriogenną *Picea omorika* z dojrzałych zarodków, wyizolowanych z nasion, przechowywanych po zbiorze w temp. 4°C. TE wytworzyło 23,8% eksplantatów, wyłożonych na pożywkę do induk-

cji tkanki. Uzyskana wartość jest porównywalna z badaniami Parka i wsp. (10) dla tego rodzaju eksplantatów, stosowanych do zaindukowania tkanki embriogennej świerka białego.

O sukcesie w pobudzeniu eksplantatów do indukcji tkanki embriogennej decyduje dobór pożywki oraz rodzaj zastosowanych regulatorów wzrostu. Kolevska-Pletkapić i wsp. (11) wykazali, że częstotliwość wytwarzania tkanki embriogennej *Picea omorika* z dojrzałych zygocytycznych zarodków była ściśle związana z rodzajem zastosowanej pożywki inicjalnej. Podobne wyniki uzyskano dla *Picea omorika* w tych badaniach, stosując pożywkę ½ LM na której dojrzałe zygocytyczne zarodki wytwarzały tkankę embriogenną częściej (21,3-23,8%) niż na pożywce BM (0-2,5%).

Do zaindukowania tkanki embriogennej świerków, wymagana jest obecność w pożywce zarówno auksyny, jak i cytokininy (12). W przypadku jodeł do zapoczątkowania tego procesu wystarczy tylko cytokinina (13). Najczęściej stosowanymi auksynami przy indukcji somatycznej embriogenezy są: 2,4-D i NAA (8,14), rzadziej Pikloram (10), natomiast najpowszechniej stosowaną cytokininą jest BA (15,16). W prowadzonych badaniach uzyskaliśmy indukcję tkanki embriogennej *Picea omorika*, przy zastosowaniu wszystkich wymienionych auksyn oraz cytokininy (BA). Częstotliwość indukcji tkanki embriogennej była porównywalna we wszystkich testowanych kombinacjach regulatorów wzrostu, chociaż najlepszy wynik uzyskano, przy zastosowaniu do pożywki ½ LM Pikloramu, w stężeniu 9 µM oraz BA, w stężeniu 4,5 µM.

Namnażanie, podobnie jak indukcja tkanki embriogennej świerków, przebiega w prawidłowy sposób tylko w obecności auksyny i cytokininy (4,14,17). W prowadzonych przez nas badaniach zaobserwowano, że tempo wzrostu masy tkanki embriogennej świerka serbskiego zależało od zastosowania do pożywki ½ LM określonego zestawu regulatorów wzrostu. Najwyższy wzrost masy tkanki stwierdzono w obecności Pikloramu, w stężeniu 9 µM oraz BA, w stężeniu 4,5 µM.

Tkanka embriogenna różnych gatunków drzew, ze względu na swoją strukturę stanowi najbardziej odpowiedni materiał do zamrożenia w ciekłym azocie (18). Zamrożone tkanki embriogenne mogą być wykorzystane do tworzenia banków klonów elitarnych linii drzew, które znajdują zastosowanie w gospodarce leśnej i w przemyśle (19). Zainteresowanie możliwością przechowywania kultur embriogennych gatunków drzew iglastych w warunkach ultraniskich temperatur wynika z kilku powodów: 1) metoda zapobiega obniżaniu, a nawet utracie potencjału embriogennego, czyli naturalnych zdolności do tworzenia somatycznych zarodków, przez długotrwałe namnażanie tkanek embriogennych w kulturze *in vitro*; 2) zapobiega wystąpieniu zmienności somaklonalnej w obrębie aktywnie namnażających się tkanek (20); 3) zabieg kriokonserwacji pozwala na ograniczenie prac laboratoryjnych do minimum, co wiąże się z obniżeniem poziomu infekcji bakteryjnych i grzybowych w materiale roślinnym (21); 4) metoda kriokonserwacji pozwala na długoterminowe przechowanie wyselekcjonowanego materiału roślinnego o określonym genotypie, który będzie można w przyszłości testować w warunkach polowych, po uzyskaniu somatycznych roślin (20).

Według Cyr i Klimaszewskiej (22) w ciekłym azocie przechowuje się z powodzeniem co najmniej 26 gatunków drzew iglastych z rodzaju: *Abies*, *Larix*, *Picea*, *Pinus* i *Pseudotsuga*. Programy kriokonserwacji kultur embriogennych wybranych gatunków świerka i sosny realizowane są już od wielu lat na szerszą skalę m.in. w takich krajach, jak: Kanada, Francja, Nowa Zelandia, Szwecja i USA (19).

Metodyka kriokonserwacji tkanki embriogennej *Picea omorika*, opracowana w naszym laboratorium, zapewnia uzyskanie wysokiej żywotności tkanki po rozmrożeniu z ciekłego azotu (ok. 92% – dla tkanki mrożonej w krioprobówce bez dodatku ciekłego azotu (K-LN) i rozmrażanej w wodzie). Rozmrożona tkanka embriogenna podejmowała wzrost między siódmym a czternastym dniem kultury. Wzrost tkanki był z powodzeniem kontynuowany w ciągu dalszych tygodni kultury w pożywce namnażającej $\frac{1}{2}$ LM. Jakość tkanki embriogennej po rozmrożeniu, którą namnażano w kulturze *in vitro*, nie odbiegała od jakości tkanki nie poddanej kriokonserwacji.

5. Podsumowanie

Opracowana przez nas procedura indukcji, namnażania i kriokonserwacji tkanki embriogennej *Picea omorika*, pozwoli na selekcję i długoterminowe przechowywanie elitarnych linii tego gatunku świerka, w warunkach ultraniskiej temperatury. Uzyskane przez nas wyniki mogą mieć znaczenie zarówno w badaniach naukowych, jak i w praktyce. Tkanka embriogenna jest bardzo dobrym materiałem roślinnym do badań podstawowych, zwłaszcza z dziedziny embriologii, biochemii, fizjologii i szeroko pojętej genetyki, wraz z transformacją genetyczną. Bank elitarnych linii *Picea omorika*, pozwala na zachowanie jego zasobów genowych *ex situ*, co jest ważne ze względu na ograniczony zasięg występowania tego gatunku świerka. Wyselekcjonowane, wartościowe linie embriogenne świerka serbskiego, przechowywane w ciekłym azocie, mogą być także cennym źródłem pozyskiwania wartościowego materiału roślinnego dla rynku szkółkarskiego.

Stosowane skróty

- 2,4-D – kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy
- NAA – kwas naftylo-1-octowy
- Pikloram – kwas 4-amino-3,5,6-trichloropikolinowy
- BA – 6-benzyloadenina
- TE – tkanka embriogenna
- LN – ciekły azot

Literatura

1. Bugała W., (2000), PWRiL, Warszawa, 155-157.
2. Budimir S., Vujičić R., (1992), *Plant Cell Tiss. Org.*, 31, 89-94.
3. Vujičić R., Budimir S., (1995), Somatic embryogenesis in woody plants, 3, 81-97.
4. Hazubska T., Szczygieł K., (2003), *Dendrobiology*, 50, 17-24.
5. Hazubska-Przybył T., Bojarczuk K., (2008), *Acta Soc. Bot. Pol.*, 3 (77), 189-199.
6. Gupta P. K., Durzan D. J., (1986), *In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant*, 22, 685-688.
7. Litvay J. D., Verma D. C., Johson M. A., (1985), *Plant Cell Rep.*, 4, 325-328.
8. Ramarosandratana A. V., van Staden J., (2003), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 74, 249-255.
9. Lelu-Walter M. A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K., (2008), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 92 (1), 31-45.
10. Park Y. S., Pond S. E., Bonga J. M., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 86, 427-436.
11. Kolevska-Pletikapić B., Krsnik-Rasol M., Lorković Z., Besendorfer V., Tramisak T., Jelaska S., (1995), *Acta Pharm.*, 45, 267-271.
12. Arnold S., von Egertsdotter U., Ekberg I., Gupta P., Mo H., Norgaard J., (1995), *Somatic Embryogenesis in Norway Spruce (Picea abies)*, in: *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, Eds. Jain M. S., Gupta P. K., Newton R. J., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, vol. 3, 17-36.
13. Salajova T., Jasik J., Salaj J., (1998), in: *In vitro cultures of conifers*, Veda Publishing House of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava, 63-69.
14. Filonova L. H., Bozhkov P. V., von Arnold S., (2000), *J. Exp. Bot.*, 51, 249-264.
15. Bozhkov P. V., von Arnold S., (1998), *Physiol. Plant.*, 104, 211-224.
16. Belmonte M. F., Macey J., Yeung E. C., Stasolla C., (2005), *Plant Physiol. Biochem.*, 43, 337-346.
17. Bellarosa R., Mo L. H., von Arnold S., (1992), *Ann. Bot.*, 70, 199-206.
18. Sakai A., (1995), *Cryopreservation of Germplasm of Woody Plants*, in: Ed. Bajaj Y.P.S., *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 32, *Cryopreservation of Plant Germplasm I*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 53-69.
19. Cyr D. R., (1999), in: Jain S. M., Gupta P. K., Newton R. J., *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, 4, 239-261.
20. Lelu-Walter A. M., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K., (2006), *Plant Cell Rep.*, 25, 767-776.
21. Malabadi R. B., Nataraja K., (2006), *Trees. In Vitro Cell Dev. Biol.- Plant*, 42, 152-159.
22. Cyr D. R., Klimaszewska K., (2002), *Dendrobiology*, 48, 41-49.