

# Perspektywy wykorzystania sztucznych nasion w leśnictwie

Włodzimierz Grajek<sup>1</sup>  
Wojciech Lassocinski<sup>2</sup>  
Akademia Rolnicza  
Poznań

## 1. Koncepcja tzw. sztucznych nasion

Somatyczna embriogeneza jest procesem powstawania i rozwoju zarodków somatycznych w hodowlach komórek, tkanek i organów roślinnych. Zarodki somatyczne są prostymi dwubiegunowymi strukturami z wyodrębnioną osią korzeń-pęd, nie wykazującymi połączenia z tkanką macierzystą w obrębie której regenerują. Rozwój zarodków obejmuje kolejne stadia: kuliste, sercowate i torpedy. Dalszą hodowlę embrionów można prowadzić z kalusa embriogennego lub z zawiesiny. Obecność osi korzeń-pęd u zarodka umożliwia jego otoczkowanie i przeniesienie zregenerowanej rośliny do gleby. Otoczkowane somatyczne embriony mogą służyć do produkcji tzw. sztucznych nasion (11).

Warunki jakie musi spełnić somatyczna embriogeneza dla wytwarzania sztucznych nasion są następujące:

- 1) wysoka częstość embriogenezy, przy czym za stan zadowalający można uznać taki, gdy ponad 50% hodowanej tkanki podlega embriogenezie,
- 2) długotrwałość embriogenezy objawiająca się co najmniej wielomiesięcznym okresem tworzenia embrionów,
- 3) stabilność genetyczna danej linii komórkowej bez mutacji i poliploidyzacji w uzyskanych embrionach.

Embriogeneza somatyczna po raz pierwszy została odkryta u marchwi (23), a następnie u innych roślin. Musiało upłynąć aż 20 lat od pierwszych odkryć do czasu zrodzenia się idei praktycznego wykorzystania zarodków somatycznych do produkcji tzw. sztucznych nasion. Były one pomyślane jako embriony pozyskiwane w warunkach *in vitro*, a następnie otoczone sztuczną okrywą zawierającą przede wszystkim materiały odżywcze oraz regulatory wzrostu (12). W początkowym okresie badania nad embriogenezą somatyczną ograniczały się zaledwie do kilku roślin, głównie marchwi i selera. Od tego czasu koncepcja sztucznych nasion została znacznie rozszerzona i obejmuje obecnie

<sup>1</sup> Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

<sup>2</sup> Katedra Biochemii i Biotechnologii

zarówno wiele gatunków roślin, jak i wiele rodzajów nasion. Aktualnie stosowane technologie proponują dwie formy nasion, a mianowicie formę mokrą, w której zarodki są kapsułkowane w hydrożelach oraz suchą, w której zarodki po osiągnięciu stadium dojrzałości są bezpośrednio suszone. Należy podkreślić, że forma pierwsza jest stosowana głównie u tych gatunków roślin, które nie wykazują tolerancji na suszenie.

Dla innych celów niż wysiew do gleby, np. dla banków genów, można również otoczkować merystemy i również określać je jako sztuczne nasiona.

Badania nad embriogenezą somatyczną u drzew rozpoczęły się w latach osiemdziesiątych. Przebieg embriogenezy u drzew zależy w dużym stopniu od gatunku rośliny oraz od tego czy jest to roślina okrytozalążkowa czy iglasta.

TABELA 1  
PRZYKŁADY EMBRIOGENEZY SOMATYCZNEJ U DRZEW

Nazwa	Nazwa potoczna	Kiełkowanie	Konwersja	Lit.
<i>Larix decidua</i>	modrzew europejski	tak	tak	(13)
<i>Picea abies</i>	świerk norweski	tak	nie	(5)
<i>Picea glauca</i>	świerk biały	tak	nie	(10)
<i>Picea taeda</i>	świerk amerykański	tak	tak	(6)
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	daglezyja	nie	nie	(1)
<i>Fraxinus americana</i>	jesion biały	tak	tak	(15)
<i>Juglans regia</i>	orzech angielski	tak	tak	(24)

## 2. Metody wytwarzania sztucznych nasion

Proces wytwarzania sztucznych nasion jest dosyć skomplikowany i obejmuje cztery główne fazy:

- 1) hodowlę tkanki proembriogennej *in vitro*,
- 2) produkcję zarodków somatycznych w dużej skali w kulturach zsynchronizowanych,
- 3) przygotowanie zarodków do kiełkowania (wychładzanie, podsuszanie),
- 4) otoczkowanie w hydrożelu i kapsułkowanie.

Punktem wyjścia do produkcji jest izolacja tkanki embriogennej z rośliny. W tym celu pobiera się wycinki z różnych części roślin i doprowadza bądź do bezpośredniego uzyskania wolno rosnących komórek, bądź do wytworzenia embriogenego kalusa. Głównym źródłem komórek embriogenych są takie części roślin jak blaszka liściowa, końcówka korzenia, pylniki, ogonki liściowe, słupki i płatki kwiatowe. Materiał ten jest następnie sterylizowany poprzez krótką inkubację w roztworze aseptyków. Najczęściej stosowane są roztwory zawierające aktywny chlor lub etanol. Po sterylizacji skrawki są kilkakrotnie

przemywane sterylną wodą destylowaną i umieszczane w ciekłej pożywce. Najczęściej stosowana jest pożywka opisana przez Schenka i Hildenbrandta (SH) lub pożywka B5. Kolejne etapy hodowli polegają na wielokrotnym pasażowaniu tkanki na różnych pożywkach. Celem tych zabiegów jest uzyskanie wzrostu komórkowego w zawieszynie, to znaczy doprowadzenie do oderwania się komórek od tkanki kalusowej i rozpoczęcie ich indywidualnego rozwoju i rozmnażania w oderwaniu od wprowadzonego pierwotnie wycinka rośliny. Składy stosowanych pożywek i warunki ich hodowli są zróżnicowane i zależą od indywidualnych wymogów poszczególnych gatunków roślin.

Kultury zawieszinowe komórek roślin wyższych są z reguły niehomogenne, a populacja komórek w hodowli wykazuje duże zróżnicowanie stadiów rozwojowych, od pojedynczych komórek i agregacji komórek proembriogenicznych, aż do dojrzałych embrionów.

Hodowle komórkowe prowadzi się na ogół w specjalnych wytrząsawkach—inkubatorach z regulowaną temperaturą, oświetleniem i stężeniem dwutlenku węgla w atmosferze. Można do tego celu stosować również zwykłe wytrząsawki mikrobiologiczne umieszczając nad nimi odpowiednie oświetlenie.

Kolejnym ważnym etapem hodowli jest przygotowanie fazy proembriogennej. W tym celu hoduje się komórki na pożywce zawierającej odpowiednie fitohormony. Najczęściej stosowana jest pożywka MS (Murashige i Skoog) z dodatkiem kwasu 2,4-dwu-chlorofenoksyoctowego (2,4-D), pełniącego rolę sztucznej auksyny. Substancja ta działa bodźcowo powodując zapoczątkowanie pierwszych stadiów rozwoju zarodków somatycznych. Warto jednak zaznaczyć, że obecność w pożywce 2,4-D może powodować zmiany genetyczne oraz poliploidyzację roślin. Stąd też obecność tej auksyny powinna być ograniczona tylko do pierwszych stadiów fazy proembriogenicznej. Uzyskane komórki proembriogenne przenoszone są następnie do innej pożywki, wolnej od auksyn, które hamują dalszy rozwój zarodków, w celu rozwoju embriogenezy somatycznej. W praktyce sterowanie przebiegiem tego procesu odbywa się poprzez umiejętne wprowadzanie do pożywek wybranych kinetyln i aminokwasów.

Etap rozwoju komórek embriogennych i produkcji zarodków somatycznych odbywa się w większych naczyniach hodowlanych, zwykle w przystosowanych do tego celu bioreaktorach. Powiększanie skali hodowli jest trudne, gdyż tkanka embriogenna ma bardzo delikatną strukturę komórkową i łatwo ulega zniszczeniu pod wpływem sił mechanicznych związanych z mieszaniem i napowietrzaniem pożywki. Do hodowli komórek roślinnych najbardziej przydatne są bioreaktory typu *air-lift*, w których mieszanie odbywa się na drodze pneumatycznej. Dominują tutaj dwa typy reaktorów: kolumnowe z powietrznym podnośnikiem cieczy (rura cyrkulacyjna) i barboterowe (17). W literaturze dobrze opisano także bioreaktor wyposażony w wibrujący dysk służący do mieszania cieczy. W kulturach rosnących w zawieszynie występuje często aglomeracja komórek w zbite agregaty. Jest to zjawisko niekorzystne i należy utrzymać taką szybkość ruchu cieczy, aby agregaty były rozbijane. Ilość wytworzonych embrionów jest duża i dochodzi do stężenia rzędu kilkudziesięciu gramów w litrze.

Dużym utrudnieniem w powiększaniu skali procesu jest konieczność stosowania relatywnie dużego objętościowo wysiewu. Stwierdzono bowiem, że *inoculum* zawiera pewne substancje wytworzone przez wcześniejszą populację komórek, które są niezbędne dla namnażania się następnej generacji.

Rozwój i dojrzewanie embrionów jest sterowane obecnością i odpowiednim stężeniem substancji regulatorowych, między innymi takich jak kwas abscyzynowy (ABA) i giberelina GA3. Kwas abscyzynowy prawdopodobnie sprzyja akumulacji substancji zapasowych, takich jak białka i węglowodany, potrzebne jako materiał budulcowy i energetyczny przy regeneracji rośliny. Substancja ta powoduje wzrost jednorodności embrionów i zapobiega powstawaniu form nienormalnych. Proces dojrzewania zarodków trwa ok. 2-3 tygodni.

Praktyczna realizacja procesu wytwarzania zarodków somatycznych w bioreaktorach odbywa się zwykle na drodze hodowli wielostopniowych z międzyetapową separacją komórek. Wynika to z konieczności zmiany składu pożywek w poszczególnych etapach hodowli, a szczególnie między fazą proembriogenną (inicjacja embriogenezy) a embriogenną (produkcja dużej ilości embrionów). Proces embriogenezy zachodzi w bioreaktorze w sposób ciągły w całkowicie kontrolowanych warunkach środowiskowych. Wydajność tego procesu jest zależna od rodzaju rośliny, temperatury, pH, ciśnienia osmotycznego i obecności substancji regulatorowych. Obok tkanki embriogennej w pożywce ciekłej są obecne stadia pośrednie oraz embriony o różnym stopniu dojrzałości. Dla uzyskania jednorodnego wzrostu embrionów doprowadza się do synchronizacji komórek embriogennych, a tym samym do uzyskania jednorodnych stadiów rozwojowych zarodków. Proces jest zakończony po osiągnięciu przez zarodki stadium torpedy.

Dalszym etapem produkcji jest odławianie dojrzałych form embrionów, względnie separacja embrionów łącznie z tkanką embriogenną. Ten drugi sposób jest częściej stosowany, chociaż uzyskany materiał jest gorszej jakości. Separacja komórek roślinnych jest przeprowadzana głównie metodami filtracji sitowej, mikrofiltracji dynamicznej, wirowania oraz sedymentacji. W celu uzyskania zdolności do kiełkowania wydzielone zarodki poddawane są procesowi hartowania polegającego na ochłodzeniu i podsuszeniu.

Proces produkcji sztucznych nasion kończy się otoczkowaniem i kapsułkowaniem embrionów, najczęściej w hydrożelach. W tym celu substancję żelującą miesza się z embrionami i doprowadza do żelowania. W ten sposób powstaje sztucznie wytworzona kapsuła zawierająca dojrzały embrion.

Warstwa otaczająca embrion powinna być dla niego neutralna i nie wykazywać niszczącego działania. Chroni ona zarodek i substancje odżywcze przed utlenianiem i dehydratacją. Konieczne jest, aby zapewniała ochronę przed zniszczeniem mechanicznym w czasie przechowywania, transportu i wysiewania do gleby. Powinna także zaspokajać potrzeby żywieniowe w pierwszym okresie rozwoju rośliny, podobnie jak to ma miejsce w normalnych zygocytynych nasionach. Aby spełnić ten warunek, do otoczki wprowadza się kompleks substancji odżywczych, hormonów, dodatków chemicznych oraz niekiedy towarzyszącą roślinie mikroflorę i pestycydy. Bryłka tzw. sztucznego

nasiona musi wykazywać odpowiednie rozmiary fizyczne i dobrą odporność mechaniczną tak, aby nasiono mogło być wysiane za pomocą normalnych siewników stosowanych obecnie w gospodarstwach rolnych.

Najbardziej przydatnym hydrożelem do kapsułkowania zarodków jest alginian sodowy, żelujący w obecności jonów wapniowych. Problemy związane z kapsułkowaniem embrionów zostały szeroko przedstawione przez Redenbaugh i wsp. (19). Obok alginianu stosowane są też karaginan, agar, żelatyna, gerlit i pektynian oraz mieszaniny alginianu i karraginanu z gumami roślinnymi lub żelatyną. Substancje te żelują bądź pod wpływem kompleksowania z jonami kationowymi, bądź pod wpływem obniżania temperatury. Dla utrzymania określonej wilgotności nasiona bryłka hydrożelu jest pokrywana specjalną powłoką hydrofobową, hamującą transfer wody i wysychanie (np. Elvax 4260, Dupont).

Przy produkcji nasion w formie suchej możliwe są dwa rozwiązania (20). Pierwsze z nich polega na wstępnym otoczkowaniu embrionów poliksyetylenem, a następnie na wysuszeniu takiej mieszaniny w celu uzyskania zarodków zdolnych do przeżycia (7,8). Drugim rozwiązaniem jest bezpośrednio suszenie zarodków somatycznych, bez ich wcześniejszego otoczkowania. Badania nad suszeniem zarodków somatycznych w atmosferze powietrza o kontrolowanej wilgotności względnej pozwalają w wielu przypadkach na uzyskanie wysokiej wydajności konwersji embrionów (14,22). Wyniki publikowane w literaturze światowej wskazują jednak na fakty, gdy bezpośrednio suszenie zarodków somatycznych obniżało ich stopień kiełkowania (4).

Z punktu widzenia nauki o fizjologii roślin suszone zarodki somatyczne stanowią tylko namiastkę naturalnych nasion. Wynika to głównie z tego, że pozbawione są substancji odżywczych umożliwiających im samodzielny rozwój w glebie. Przed wysianiem muszą być regenerowane w sztucznych warunkach i hodowane na bardzo bogatych pożywkach. Znacznie bardziej zbliżone do naturalnych nasion są zarodki kapsułkowane w hydrożelach razem z substancjami wzrostowymi.

Z uwagi na duże trudności w konwersji zarodków somatycznych do normalnych roślin w glebie duże nadzieje pokłada się w nowej technologii mikro-rozmnażania drzew w fitotronach o podwyższonym 2-3-krotnie stężeniu dwutlenku węgla. W hodowlach autotroficznych uzyskano prawie dwukrotne przyspieszenie tempa wzrostu w stosunku do tradycyjnych kultur mikсотroficznych (2,3,9).

W konwencjonalnym rozmnażaniu roślin w warunkach *in vitro* stosuje się pożywki zawierające sacharozę. Powoduje to, że rośliny nie rosną autotroficznie, lecz mikсотroficznie. Czynnikiem wymuszającym szybki wzrost roślin jest pożywka bogata w składniki mineralne. Dla drzew iglastych nie można stosować tak bogatych pożywek, stąd konieczna jest redukcja stężenia sacharozy i niektórych soli mineralnych, szczególnie azotowych. Przyspieszenie wzrostu autotroficznego jest możliwe poprzez podwyższenie stężenia dwutlenku węgla oraz zastosowanie oświetlenia silnym światłem o właściwej barwie (21).

### 3. Zastosowanie sztucznych nasion w leśnictwie

Wykorzystanie metod biotechnologicznych w leśnictwie wymaga jeszcze bardzo wielu badań i odpowiedzi na wiele pytań. Teoretycznie, produkcja sztucznych nasion drzew, jak się wydaje, jest bardzo atrakcyjna. W tradycyjnej hodowli drzew do osiągnięcia stanu zdolności drzewa do tworzenia nasion zygotycznych potrzeba ok. 10-20 lat. Jest to bardzo poważne ograniczenie szczególnie przy roślinach transformowanych, gdzie efekt badań naukowych jest obserwowany dopiero po bardzo długim okresie. Możliwość przyspieszenia tego procesu na drodze embriogenezy somatycznej wydaje się bardzo atrakcyjną perspektywą dla hodowców.

Redenbaugh i Ruzin (20) wymieniają następujące korzyści ze stosowania embriogenezy somatycznej *in vitro*:

- 1) możliwość masowej produkcji tkanki embriogennej z komórek poddanych inżynierii genetycznej,
- 2) szybkie potwierdzenie transformacji genetycznych w regenerowanych roślinach,
- 3) możliwość wykorzystania embrionów do kriokonserwacji w ciekłym azocie najlepszych linii produkcyjnych lub jako materiału dla banku genów,
- 4) masowa produkcja i dojrzewanie zarodków somatycznych i ich przekształcenie w tzw. sztuczne nasiona.

Perspektywa wykorzystania sztucznych nasion została przedstawiona przez Murashige (12) w taki sposób: „aby mogło to mieć zastosowanie, metoda klonowania roślin musi być wyjątkowo szybka, zdolna do wytworzenia kilku milionów roślin dziennie oraz konkurencyjna ekonomicznie w porównaniu z nasionami naturalnymi”. Oznacza to, że w praktyce konieczna jest duża skala produkcji oraz wykorzystywanie roślin transgenicznych.

Dla zastosowań praktycznych – procent kiełkujących nasion (siła i energia kiełkowania) jest warunkiem najważniejszym. W roku 1982 procent kiełkujących embrionów lucerny, z których rozwijają się normalne nasiona wynosił zaledwie 0,5%. Pięć lat później uzyskano już 70% kiełkujących nasion. Należy jednak podkreślić, że dane te dotyczą warunków laboratoryjnych, a nie wysiewu do gleby. Analogicznych informacji o wynikach prac nad konwersją sztucznych nasion drzew nie ma w dostępnej literaturze. Można jednak przypuszczać, że stopień regeneracji nasion jest ciągle jeszcze bardzo mały. Osłabia to znacznie nadzieje na szybkie opanowanie metody masowej produkcji nasion, wykorzystując do tego celu zarodki somatyczne hodowane *in vitro*.

#### Literatura

1. Abo El-Nil M., (1980), Embryogenesis of gymnosperm forest trees. U.S. Patent 4:217,730. Washington, D.C.
2. Cournac L., Dimon B., Carrier P., Lohou A., Chagvardieff P., (1991), Plant Physiol., 97, 112-117.
3. Flygh G., Gronroos R., von Arnold S., (1989), Ann. Sci. For., 46, 168-170.

4. Gray D., (1987), *Hortic. Sci.*, 22, 810-814.
5. Gupta P. K., Durzan D., (1986), *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 22, 685-688.
6. Gupta P. K., Durzan D., (1987), *Biotechnol.*, 5, 147-151.
7. Kitto S., Janick J. (1985a), *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.*, 110, 277-282.
8. Kitto S., Janick J., (1985b), *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.*, 110, 283-286.
9. Kozai T., (1991), *Micropropagation Technology and Application*, eds.: P. C. Debergh, R. H. Zimmerman, Kluwer Academic Publishers.
10. Lu C. Y., Thorpe T., (1987), *J. Plant Physiol.*, 128, 287-302.
11. Malepszy S., (1988), *Postępy Nauk Rolniczych*, 4, 3-15.
12. Murashige T., (1977), *Acta Hort.*, 78, 17.
13. Nagamani R., Bonga J., (1985), *Can. J. For. Res.*, 15, 1088-1091.
14. Obendorf R., Sławińska J., (1986), *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 22, 53 (Abst).
15. Preece J., Zhao J. I., Kung F., (1987), *Hortsci.*, 22, 1131 (Abst 675).
16. Preil W., Beck A., (1991), *Acta Horticult.*, 289, 179-192.
17. Preil W., (1991), *Micropropagation*, eds. P. C. Debergh, R. H. Zimmerman, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 425-445.
18. Redenbaugh K., Paasch B. D., Nichol J. W., Kossler M. E., Viss P. R., Walker K. A., (1986), *Bio/Technology*, 4, 797-806.
19. Redenbaugh K., Slade D., Viss P., Fujii J.A., (1987), *Hortsci.*, 22, 803-809.
20. Redenbaugh K., Ruzin S. E., (1989), *Applications of Biotechnology in Forestry and Horticulture*, ed. V. Dhawan, Plenum Press, New York and London, 57-71.
21. Roeske C., Widholm J., Ogren W., (1989), *Plant Physiol.*, 91, 1512-1519.
22. Sławińska J., Obendorf R., (1987), *Annual Agronomy Meeting*, Atlanta, GA, 153 (Abst).
23. Steward F. C., Mapes M. O., Mears K., (1958), *Am. J. Bot.*, 45, 705-708.
24. Tulecke W., McGranahan G., (1985), *Plant Sci.*, 40, 57-63.

## Artificial seeds for plant propagation

### Summary

Artificial seeds, consisting of somatic embryos encapsulated with protective coating, have been proposed as a propagation system of plant propagation. Two types of artificial seeds have been developed, hydrated immobilized in hydrogels, and desiccated. The process of somatic embryogenesis runs in some steps. At first, the embryogenic tissue able to grow in suspension culture must be isolated. Subsequently, this tissue should be inducted by some auxins and kinetins introduced to the liquid medium to start the embryogenesis. The development and maturation of embryos carry out in special media. To scale up this process the bubble column and air-lift bioreactors are used. The more frequently material to encapsulate the somatic embryos is alginate hydrogel. The main problem in production of good quality artificial seeds is low efficiency of embryos conversion to normal plant in soil.

### *Adres dla korespondencji:*

Włodzimierz Grajek, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza, ul. Mazowiecka 48, 60-623 Poznań.