ARBORETUM KÓRNICKIE
ROCZNIK 40, 1995

ROMA ŻYTKOWIAK

Indukcja somatycznej embriogenezy w kulturach kalusowych modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.)

Abstract

Żytkowiak R. 1995. Induction of somatic embryogenesis in callus cultures of larch (*Larix decidua* Mill.). Arbor. Kórnickie 40: 117-123.

The aim of this work was to determine optimal conditions for callus culture and initiation of somatic embryogenesis in two-year-old callus, and fresh callus derived from *Larix decidua* seeds and embryos. The influence of medium composition, light and temperature on the increase of callus mass and of PEG (Polyethylene Glycol) and casein hydrolisate on somatic embryogenesis were studied. The highest increase of callus mass was obtained on 1/2 LM culture medium with 5.0 mg/l 2.4-D (2.4-dichlorophenoxy acetic acid), 2.5 mg/l kinetine and 0.5 mg/l zeatine in darkness at 24°C. The addition of 200 mg/l of PEG and 500 mg/l of casein hydrolizate to the 1/2 LM culture medium and the increase of inositol concentration to 1 g/l and of sacharoze to 30 g/l, doubled the number of embryo initials in cultures derived from embryos.

Additional key words: Larix, somatic embryogenesis, 2.4-D, PEG.

Address: R. Żytkowiak, Polish Academy of Sciences, Institute of Dendrology, 62-035 Kórnik Poland.

Accepted for publication, February 1995.

WSTĘP

Tradycyjne metody hodowli drzew iglastych są czasochłonne ze względu na długi okres rozwoju generatywnego. Pierwsze kwitnienie u *Larix decidua* obserwuje się w wieku 10-15 lat (Wareing 1959), a pierwszy obfity urodzaj nasion występuje w wieku 25-30 lat (Matthews 1955). Zastosowanie inżynierii genetycznej i technik kultur *in vitro*, może skrócić czas niezbędny dla uzyskania mieszańców cennych ze względu na drewno oraz odpornych na szkodniki i choroby. Głównym ograniczeniem w uzyskaniu tą drogą sadzonek genetycznie zmienionych drzew jest niska zdolność regeneracji kalusa. Duże możliwości

http://rcin.org.pl

manipulowania materiałem roślinnym daje somatyczna embriogeneza z tkanki kalusowej. Jest to proces rozmnażania, w wyniku którego komórki zarówno diploidalne, jak i haploidalne mogą podlegać różnicowaniu i tworzyć zarodki – embrioidy, z pominięciem zapłodnienia i wytworzenia zygoty. Opanowanie metody somatycznej embriogenezy drzew iglastych pozwoli na szybkie ich rozmnażanie. Aderkas i Bonga (1993) przeprowadzili somatyczną embriogenezę z haploidalnego megagametofitu modrzewia. Otwiera to dwie możliwości dla nowoczesnej hodowli modrzewia. Pierwsza, to tworzenie dihaploidów hodowanych jako jednolity materiał do krzyżowania heterozyjnego, co stanowi postęp w stosunku do tradycyjnej hodowli. Druga, to możliwość posiadania haploidalnego materiału dla inżynierii genetycznej w celu fuzji haploidalnych protoplastów lub w celu introdukcji obcego DNA. Fuzja haploidalnych protoplastów może być wykorzystana do uzyskania z góry zaplanowanych krzyżówek, natomiast wprowadzając obce DNA do protoplastów, np. gen kodujący toksynę pochodzącą z *Bacillus* sp. możemy uzyskać rośliny odporne na uszkodzenia powodowane przez owady.

Zarodki somatyczne są prostymi strukturami dwubiegunowymi, nie wykazującymi waskularnego połączenia z tkanką macierzystą, w obrębie której wzrastają (Zenkteler 1984). Obecność osi korzeń-pęd u zarodka somatycznego umożliwia jego otoczkowanie i wytworzenie tzw. sztucznych nasion. Teoretycznie produkcja sztucznych nasion drzew jest bardzo atrakcyjna, gdyż powstawanie nasion w tradycyjnej hodowli wymaga około 10-15 lat, a zadowalające wyniki w uzyskaniu zdrowych nasion modrzewia pojawiają się rzadko (Fowells 1965).

Tworzone w Polsce banki genów realizowane są przez zakładanie upraw *in situ* i *ex situ* oraz długoterminowe przechowywanie nasion. Dla drzewostanów i drzew będących w fazie zamierania, gdzie niemożliwy jest zbiór nasion oraz rozmnażanie wegetatywne przez sadzonkowanie i szczepienie, te formy ratowania lasów są mało skuteczne. Alternatywę stanowi wówczas przechowywanie sztucznych nasion (otoczkowanych stożków wzrostu, merystemów, somatycznych zarodków) w niskich temperaturach – kriokonserwacja. W 1992 roku przeprowadzono próby zamrożenia w ciekłym azocie embriogennych kultur modrzewia i świerka, które po rozmrożeniu podejmowały wzrost (Klimaszewska i in. 1992).

MATERIAŁY I METODY

Badania nad hodowlą kultur kalusa prowadzone były w Instytucie Dendrologii PAN w Kórniku. W pierwszym etapie badań użyto subkultur powstałych w ramach doświadczenia założonego 20.11.1991 roku przez Dr G. Kosińskiego, z nasion modrzewia europejskiego, na pożywkach TD i 1/2 TD (tabela 1). Ocenę kalusa dwuletniego przedstawia tabela 2.

http://rcin.org.pl

Tabela 1

Skład pożywek.

Table 1

Medium composition.

Składnik / Component (mg/l)	TD	DT	Gamborg	Heller	1/2 LM
NH_4NO_3	800	340	0	0	800
$(NH_4)_2SO_4$	0	0	134	0	0
$NaNO_3$	0	0	0	600	0
KNO_3	340	2000	2500	0	1000
$Ca(NO_3)_2 4H_2O$	980	1500	0	0	0
KCI	65	0	0	750	0
KH_2PO_4	175	200	0	0	150
FeNaEDTA	0	25	25	0	20
Na_2EDTA	37	0	0	0	0
$MgSO_4$	370	400	122	122	800
$CaCl_2$	0	0	113	57	20
$FeSO_4 H_2O$	17	0	0	0	0
Inozytol	100	100	100	100	100
Sacharoza	30000	30000	30000	30000	20000

W pierwszym etapie praca polegała na hodowli dwuletniego kalusa na pożywkach o różnej zawartości makroelementów: DT, 1/2 LM oraz Gamborg i Heller (tabela 1). Do pożywek dodano 2,4-D w stężeniu 5,0 mg/l, kinetynę 2,5 mg/l i zeatynę 0,5 mg/l. Pożywki zestalono Phytagelem w ilości 2 g/l, a pH doprowadzono do wartości 5,8. Po trzech pasażach przeprowadzonych co 28 dni, wszystkie kultury przeszczepiono na pożywkę 1/2 LM, dającą najlepsze przyrosty masy kalusa. Część kultur umieszczono w ciemności, a pozostałe w 16-godzinnym oświetleniu, w dwóch wariantach temperatur, 23-25°C i 26-28°C.

W drugim etapie do doświadczeń zastosowano dwuletni kalus i nasiona rodu 18-71 zebrane w lutym 1994 roku. Nasiona przemyto w wodzie destylowanej z dodatkiem preparatu Tween, przepłukano w 70% alkoholu etylowym i sterylizowano w 1% roztworze azotanu srebra, w czasie 10 i 15 minut. Dwuletni kalus, całe nasiona, nasiona nacięte oraz wypreparowane zarodki wszczepiono na pożywkę 1/2 LM z dodatkiem 2,4-D w stężeniu 5,0 mg/l, kinetyny 2,5 mg/l i zeatyny 0,5 mg/l i umieszczono w temperaturze 27°C w zaciemnieniu. Po wstępnej hodowli uzyskano kalus, który był materiałem wyjściowym dla inicjacji somatycznej embriogenezy. Przeprowadzono ją wprowadzając modyfikacje, polegające na rezygnacji z regulatorów wzrostu i dodaniu do niektórych kultur hydrolizatu kazeiny 500 mg/l, PEG 200 mg/l, oraz na zwiększeniu stężenia inozytolu do 1 g/l i sacharozy do 30 g/l. Po zaobserwowaniu zmian charakterystycznych dla embriogennej tkanki (Rohr i wsp. 1989) dalsza hodowla przebiegała w 16-godzinnym fotoperiodzie, w tem-

http://rcin.org.pl

peraturze 24°C. Ocenę wielkości i stopnia brunatnienia kalusa przeprowadzano w skali od 0 do 3 (0-brak przyrostu masy kalusowej, brak przebarwień kultury, 3-całkowite wypełnienie powierzchni probówki masą kalusową, całkowite zbrunatnienie kultury).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Dwuletni kalus

Ocena rozwoju kalusa na poszczególnych pożywkach wykazała, że optymalny zestaw składników pokarmowych dla kultur modrzewia zawiera pożywka 1/2 LM z dodatkiem hormonów 2,4-D, kinetyny i zeatyny (tabela 2). W czasie kolejnych pasaży przeprowadzonych na tej pożywce zaobserwowano niewielki spadek wzrostu kalusa od 0,2-0,5, w skali 0-3, który mógł być spowodowany ustaleniem poziomu syntezy endogennych hormonów. Hodowle na pożywkach Gamborg, Heller i DT nie dały zadowalających wyników. Różnice jakościowe w charakterze tkanki kalusowej dotyczyły zabarwienia i struktury. Kalus hodowany na pożywce 1/2 LM był jasnozielony o luźnej jednorodnej strukturze tkanki i bez martwego centrum, natomiast pozostałe kultury były zielonobrunatne o strukturze zbitej, wyraźnie zróżnicowanej na część martwą i świeżą tkankę.

Tabela 2

Ocena dwuletniego kalusa w zależności od składu pożywki, temperatury i oświetlenia.

Table 2

Size and pigmentation of two-year-old callus depending on medium composition, temperature and light.

Pożywka Medium	Oświetlenie Light (lux)	Temp.(°C)	Hormony PGR	Wielk. kalusa Callus size*	Brunatnienie Browning*
TD	2500	22	A	1.8	1.0
1/2 TD	2500	22	A	1.5	1.1
DT	0	24	B	1.5	1.3
Gamborg	0	24	B	0.0	3.0
Heller	0	24	B	0.0	3.0
1/2 LM	0	24	B	3.0	0.0
1/2 LM	0	27	B	2.0	1.5
1/2 LM	2500	24	B	2.5	1.5
1/2 LM	2500	27	B	1.8	1.9

A – NAA 0.8 mg/l, BAP 0.5 mg/l.
B – 2.4-D 5 mg/l, kinetyna 2.5 mg/l, zeatyna 0.5 mg/l.
PGR – plant growth regulators.
* skala 0-3.
scale 0-3.

http://rcin.org.pl

Korzystną innowacją w składzie pożywki 1/2 LM, było dwudziestokrotne obniżenie stężenia wapnia i dwukrotne podwyższenie stężenia magnezu i potasu, w porównaniu do dotychczas stosowanych stężeń w pożywkach TD i 1/2 TD. Zapewnia to lepsze uwodnienie i szybszy wzrost tkanki kalusowej, należy tylko ściśle przestrzegać terminu kolejnych pasaży, by nie zabrakło w pożywce wapnia.

Przed rozpoczęciem tych badań, stosowany zestaw hormonów zawierał więcej auksyn niż cytokinin (1.6:1), nowy układ z zastosowaniem 2,4-D (auksyna o silnym działaniu) zwiększał przewagę auksyn wobec cytokinin (1.8:1). Przy wysokim stosunku auksyn do cytokinin komórki są duże i przylegają do siebie wąskimi partiami blaszki środkowej (Zenkteler 1984). Na podstawie wielkości i stopnia brunatnienia kalusa zaleca się w hodowli temperaturę 24°C i zaciemnienie (tabela 2). Potwierdzają to również wyniki uzyskane przez Cornu (1990) i Lelu i wsp. (1993).

Somatyczna embriogeneza

Duża ilość zakażeń (93-100%) występująca przy szczepieniu całych nasion i nasion naciętych, niezależnie od czasu trwania sterylizacji w roztworze $AgNO_3$, tj. 10 czy 15 minut, wyeliminowała ten materiał z doświadczeń. Przy szczepieniu izolowanych zarodków dla 10 i 15 minut sterylizacji uzyskano odpowiednio 50 i 65% niezakażonych kultur. Wyniki te były zadowalające i pozwoliły na kontynuowanie badań. Kalus embriogenny wyhodowano przy szczepieniu zarodków (tabela 3). Dwukrotnie większa ilość embriogennego kalusa na zmodyfikowanej pożywce 1/2 LM, była prawdopodobnie wynikiem dodania PEG i hydrolizatu kazeiny, oraz zwiększenia ilości inozytolu. Z danych przedstawionych przez Cornu (1990) oraz Lelu i wsp. (1993) wynika, że PEG zmienia siłę osmotyczną i napięcie powierzchniowe i dlatego obserwuje

Tabela 3

Skuteczność inicjacji somatycznej embriogenezy w kulturach kalusowych modrzewia.

Table 3

Efficiency of somatic embryogenesis in larch callus culture.

Materiał Material	Pożywka Medium	Kalus embriogenny Embryogenic callus, %
Dwuletni kalus Two-year-old callus	1/2 LM	0
	1/2 LM+	0
Kalus z zarodków Callus from zygotic	1/2 LM	10
embryos	1/2 LM+	20

1/2 LM+ – 1/2 LM + PEG 200 mg/l + hydrolizat kazeiny 500 mg/l + inozytol 1000 mg/l + sacharoza 30 g/l.

http://rcin.org.pl

się intensywniejszy wzrost tkanki embriogennej. Dziesięciokrotny wzrost stężenia inozytolu, który modyfikuje ściany komórkowe, również przyczynił się do wzrostu kultur embriogennych. Hydrolizat kazeiny wprowadzono jako źródło organicznego azotu. Uzyskany w doświadczeniach embriogenny kalus, nadaje się do dalszego pasażowania i prawdopodobnie w dalszej hodowli istnieje możliwość izolacji somatycznych zarodków, by w efekcie końcowym uzyskać całe rośliny zdolne do wzrostu w warunkach naturalnych.

W tym doświadczeniu somatyczną embriogenezę zainicjowano w dojrzałych zygotycznych zarodkach. W ośrodku INRA w Orleanie, somatyczne embrioidy uzyskano z niedojrzałych i dojrzałych zygotycznych zarodków, oraz z liścieni i igieł roślin powstałych z embriogennego kalusa (Lelu i in. 1994). Wyniki badań Ruanda (1992) dowodzą, że skuteczność inicjacji somatycznej embriogenezy z liścieni *Picea abies* jest znacznie wyższa, gdy indukowana jest w roślinach powstałych z somatycznych embrioidów, niż w zygotycznych roślinach. Thompson i wsp. (1992) somatyczną embriogenezę *Larix occidentalis* wspomagali kwasem abscyzynowym przez 1-2 tygodni, wydaje się więc celowe stosowanie tego regulatora wzrostu w hodowli dojrzewających embrioidów.

STRESZCZENIE

Celem pracy było ustalenie optymalnych warunków dla wzrostu kultur kalusowych oraz zainicjowanie somatycznej embriogenezy w dwuletnim kalusie, nasionach i zarodkach modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.). Badano zależność między składem pożywek, warunkami świetlnymi i temperaturą a przyrostem masy kalusowej, oraz wpływ PEG (glikol polietylenowy) i hydrolizatu kazeiny na inicjację somatycznej embriogenezy. Najlepsze przyrosty kalusa uzyskano na pożywce 1/2 LM z dodatkiem 5.0 mg/l 2,4-D, 2.5 mg/l kinetyny i 0.5 mg/l zeatyny w zaciemnieniu w temperaturze 24°C. Dodanie do pożywki 1/2 LM 200 mg/l PEG, i 500 mg/l hydrolizatu kazeiny oraz podwyższenie stężenia inozytolu do 1 g/l i sacharozy do 30 g/l zwiększało dwukrotnie liczbę embriogennych kultur, zainicjowanych w zarodkach.

Podziękowanie. Dziękuję Pani dr Krystynie Bojarczuk z Instytutu Dendrologii PAN w Kórniku oraz Panu dr Wojciechowi Lassocińskiemu z Katedry Biochemii AR w Poznaniu za pomoc przy realizowaniu tej pracy.

LITERATURA

ADERKAS P., BONGA J., 1993. Plants from haploid tissue culture of Larix decidua Theor. Appl. Genet. 87: 225-228.

CORNU D., GEOFFRION C., 1990. Aspects de l'embryogenèse somatique chez le mélèze. Bull. Soc. Bot. 137, Actual. Bot. (3/4): 25-34.

http://rcin.org.pl

FOWELLS H.A., 1965. Silvics of forest trees of the United States. USDA Agriculture Handbook, 271: 235-241.

KLIMASZEWSKA K., WARD C., CHELIAK M., 1992. Cryopreservation and Plant Regeneration from Embryogenic Cultures of Larch (Larix × eurolepis) and Black Spruce (Picea mariana). Journal od Experimental Botany, 43(246): 73-79.

LELU M.A., BASTIEN C., KLIMASZEWSKA K., WARD C., CHAREST P.J., 1994. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (Larix leptoeuropaea). Plant Cell. Tissue and Organ Culture 36: 107-115.

LELU M.A., KLIMASZEWSKA K., CHAREST P.J., 1993. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantles of Larix. Journal of Forest Research 24: 100-106.

MATTHEWS J.D., 1955. Production of seed by forest trees in Britain. Rep. For. Res. For. Comm. for the year ending March 1954: 64.

ROHR R., ADERKAS P., BONGA J.M., 1989. Ultrastructural changes haploid embryoids of Larix decidua during early embryogenesis. Amer. J. Bot. 76(10): 1460-1467.

RUAND J.N., 1993. Maturation and conversion into plantles of somatic embryos derived from needles and cotyledons of 7-56 day old Picea abies. Plant Science 92: 213-220.

THOMPSON R., ADERKAS P., 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of western larch. Plant Cell Reports 11: 379-385.

WAREING P.F., 1959. Problems of juvenility and flowering in trees. J. Linn. Soc. (Bot), 56: 282-329.

ZENKTELER M., 1984. Hodowle komórek i tkanek roślinnych. PWN, Warszawa.

http://rcin.org.pl