

PAWEŁ CHMIELARZ

## Zachowanie różnorodności genetycznej dębu szypułkowego\*

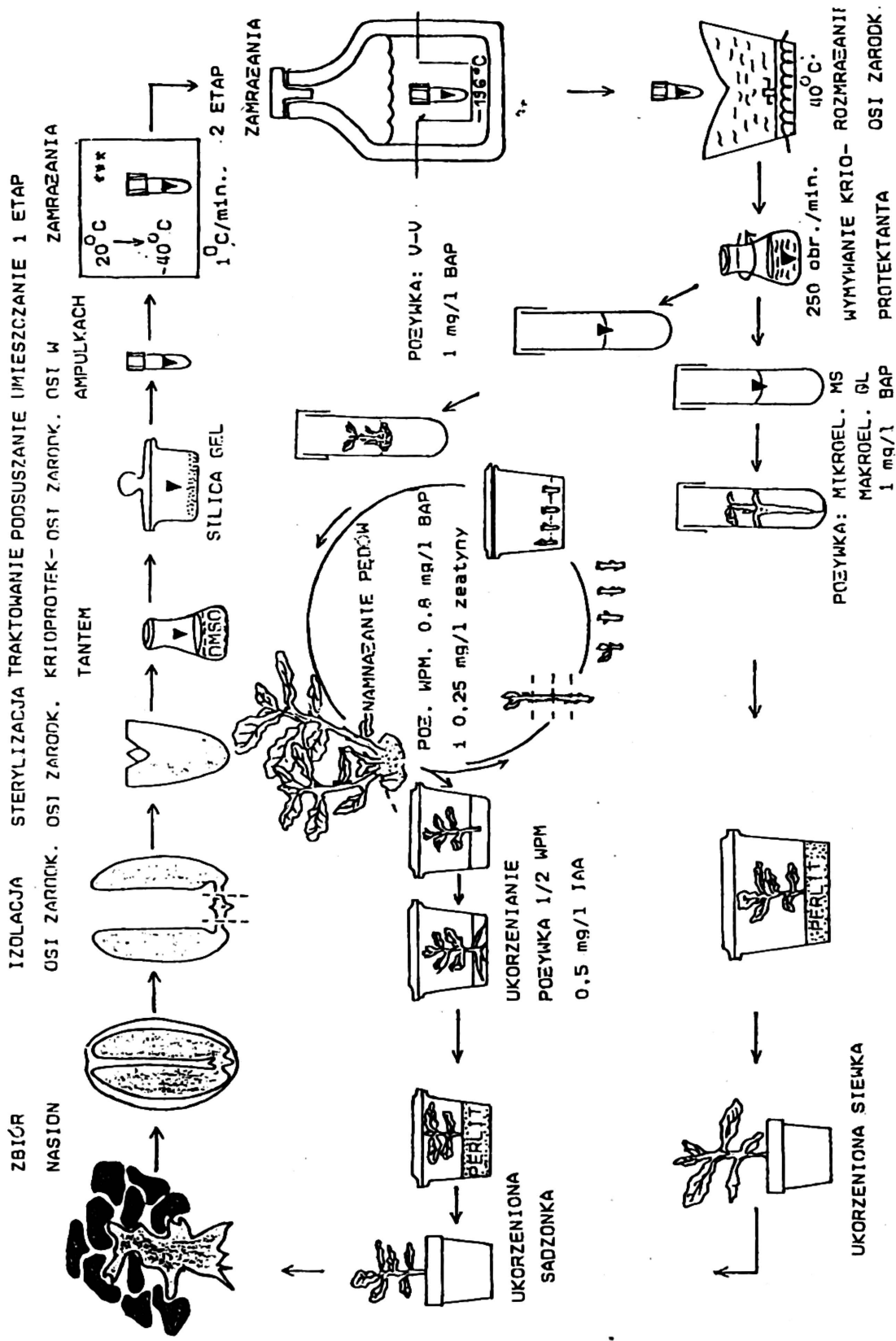
**P**ostępujące zanieczyszczenie środowiska naturalnego, prowadzące do zamierania, a w wielu wypadkach nawet do całkowitego wyginięcia gatunków sprawia, że w laboratoriach na całym świecie, powstają banki genów mające na celu zachowanie zasobów genowych cennych gatunków roślin. Jednym ze sposobów konserwacji różnorodności genetycznej jest przechowywanie całych nasion lub ich fragmentów w temperaturze ciekłego azotu ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Materiałem wyjściowym w badaniach kriogenicznych są nasiona, tkanki pobierane z pączków wegetatywnych i generatywnych czy też z innych części roślin, zawiesiny komórkowe, zarodki somatyczne otrzymane metodą "in vitro", zarodki zygotyczne, czy wreszcie osie zarodkowe. Te ostatnie stały się przedmiotem naszych badań w aspekcie kriogenicznego (w ciekłym azocie) przechowywania zasobów genowych dębu szypułkowego *Quercus robur* L.

Ze względu na możliwości przechowywania, wydzielono dwie kategorie nasion [1]. Nasiona "orthodox", które można odwołać do 5% zawartości wody lub mniej, bez obniżenia ich żywotności. W stanie podsuszonym żywotność tych nasion może być przedłużona przez przechowywanie ich w niskich temperaturach. Druga grupa — "recalcitrant" to nasiona o wysokim poziomie wilgotności, poniżej którego nasiona bezpowrotnie tracą żywotność. W przeważającej części są to gatunki strefy tropikalnej i subtropikalnej. Nasiona tej kategorii pozostają po zbiorze zdolne do życia tylko przez krótki okres (kilka tygodni czy miesięcy), nawet gdy przechowujemy je przy optymalnej wilgotności tracą żywotność. Wymienić tutaj można nasiona palmy oleistej, orzecha kokosowego, kakao, kawy i in. Klasycznym reprezentantem tej kategorii w naszej strefie klimatycznej (klimat umiarkowany) są między innymi żołędzie dębu szypułkowego, bezszypułkowego oraz nasiona kasztanowca.

Podsuszanie żołędzi do 40% zawartości wody (w świeżej masie) pociąga za sobą stopniowy, nieodwracalny spadek żywotności. Po obniżeniu wilgotności do 20–25% wszystkie

---

\* Jest to referat wygłoszony na sympozjum terenowym PTL Oddział w Gdańsku nt. "Stan dębu w drzewostanach Regionalnej Dyrekcji Lasów Państwowych Gdańsk oraz możliwości jego hodowli i wykorzystania".



RYC. Zamrażanie osi zarodkowych dębu (*Quercus robur* L.) w ciekłym azocie oraz hodowla osi zarodkowych w kulturach "in vitro"

żołędzie są martwe [2]. Przechowywanie nasion dębu przez 3 zimy przy wilgotności 40–45% w temperaturze  $-3^{\circ}\text{C}$ , zapewnia ich kiełkowanie i wschody w szkółce w ok. 50–60%. Po dłuższym przechowywaniu zdolność kiełkowania gwałtownie spada [3]. Niemożliwe jest zatem długoterminowe przechowywanie całych żołędzi, jako materiału zabezpieczającego zasoby genowe dębu szypułkowego. Bardziej odporne na odwodnienie są wypreparowane z żołędzi osie zarodkowe, wielkości kilku milimetrów, zaopatrzone w stożek wzrostu pędu oraz stożek wzrostu korzenia. Dzięki małej zawartości wody lepiej znoszą one działanie niskich temperatur. Sam pomysł zamrażania osi zarodkowych (w wypadku, gdy niemożliwe jest zamrożenie całych nasion) opracowali naukowcy, badający ten problem na nasionach pochodzących ze strefy tropikalnej (głównie prof. Chin z Malezji oraz prof. Sakai z Japonii). Sposób przygotowania materiału roślinnego do zamrażania, proces zamrażania oraz rozmrażania muszą być opracowane indywidualnie dla każdego gatunku. Celem naszych badań, rozpoczętych przed dwoma laty w Instytucie Dendrologii PAN w Kórniku, jest opracowanie kriogenicznej metody konserwacji zasobów genowych dębu szypułkowego.

Technika zamrażania polega na przygotowaniu osi zarodkowych przez traktowanie ich krioprotektantami, powolnym zamrażaniu, z regulowanym spadkiem temperatury ( $1^{\circ}\text{C}$ /minutę do  $-40^{\circ}\text{C}$ ), a następnie umieszczeniu ich w ciekłym azocie. Rozmrażanie przeprowadza się w łaźni wodnej w temperaturze  $40^{\circ}\text{C}$  przez 5 minut. Całą roślinę otrzymuje się metodą hodowli “in vitro”.

Po zbiorze nasion w październiku (możliwy jest także zbiór niedojrzałych żołędzi w sierpniu) osie zarodkowe wycina się z nasion skalpelem, sterylizując dalej w 0.1% chlorku rtęci. Sterylne osie zarodkowe otoczkuje się alginianem, tworzącym ochronę zewnętrzną warstwy tkanek osi przed zbyt gwałtownym wysychaniem podczas suszenia. Po częściowym odwodnieniu do około 20% wilgotności, osie zarodkowe traktuje się roztworem krioprotektantów o różnym stężeniu, w różnym czasie. Stosowane krioprotektanty to DMSO (dwumetylowy tlenek siarki), glikol propylenowy, sacharoza, mannitol. Tak przygotowane osie zarodkowe zamraża się do  $-40^{\circ}\text{C}$ .

W trakcie dotychczasowych badań opracowano dwie metody hodowli dębu sposobem “in vitro”, gdzie jako materiał wyjściowy do hodowli użyto niemrożonych osi zarodkowych. Pierwsza, bezpośrednia, polega na otrzymaniu ukorzonej “mikrosiewki”, na pożywce z mikroelementami Murashig’a i Skoog’a oraz makroelementami Quoirin’a i Lepoivre’a z dodatkiem 1 mg/l cytokininy — BAP. Ze stożka wzrostu pędu osi zarodkowej otrzymano rosnący pęd, a ze stożka wzrostu korzenia — korzeń. Metoda pośrednia, bardziej niezawodna, w pierwszym etapie namnażania na pożywce WPM (Woody Plant Medium) z dodatkiem 0,8 mg/l BAP oraz 0,25 mg/l zeatyny zapewniała wzrost nieukorzenionych pędów. W drugim etapie pędy te były ukorzeniane na pożywce WPM (50% koncentracja składników) z dodatkiem 0,5 mg/l auksyny (IAA). Tak wyhodowane “mikrorośliny” przesadzano z pożywki agarowej do perlitu i hartowano, zmniejszając stopniowo wilgotność powietrza.

W obliczu ogarniającego coraz większe obszary zjawiska zamierania dębów, w wypadku pomyślnego ukończenia badań nad kriokonserwacją tego gatunku, zamrażanie osi zarodkowych dębu w ciekłym azocie umożliwić ma w przyszłości wieloletnie przechowywanie zasobów genowych w bankach genów drzew leśnych.

## Literatura

1. **Roberts E.H.**, 1973. Predicting the viability of seeds. *Seed Sci. Technol.* 1, 499–514.
2. **Schönborn V.A.**, 1964. Die Aufbewahrung des Saatgutes der Waldbäume. BLV Verlagsges., München.
3. **Suszka B., Tylkowski T.**, 1980. Storage of acorns of the English oak (*Quercus robur* L.) over 1–5 winters. *Arbor. Kórnickie.* 25: 199–229.