

ALICJA OLSZEWSKA, WOJCIECH WESOŁY

## Nowe trendy w hodowli lasu – dąb w kulturach *in vitro*

New Trends in Silviculture – Oak *in vitro* Cultures

**L**asy odgrywają kluczową rolę w procesach ekologicznych, takich jak utrzymywanie struktury gleby oraz jej żyzności, wiązanie dwutlenku węgla oraz tworzenie biotopów niezbędnych do przetrwania wielu gatunków roślin i zwierząt. Służą one niezmiennie od wieków ludziom jako źródło paliw, materiałów budowlanych i półproduktów przemysłowych [30].

Jednakże w miarę postępującej degradacji środowiska lasy nie pozostają obojętne. Coraz trudniej człowiekowi odtworzyć przyjętymi metodami hodowlanymi zniszczone kompleksy leśne. Coraz częściej czas odgrywa bardzo istotną rolę w restytucji olbrzymich powierzchni, niegdyś zalesionych różnymi gatunkami drzew, a obecnie straszącymi kikutami umierających roślin.

Niekiedy nie jesteśmy w stanie wskazać dokładnych powodów zamierania lasów. Dlatego też, warto podjąć próby (w wielu laboratoriach na świecie próbuje się) uratowania zamierających drzewostanów przez stosowanie kultur *in vitro*. Rozmnażanie przez ukorzenianie pędów, tj. zrzesy jest trudne i wymaga dużej ilości materiału matecznego. Rozmnażanie *in vitro* stwarza natomiast potencjalne możliwości mikropropagacji drzew zaawansowanych wiekowo, które będą traktowane jako drzewa mateczne. Mikrorozmnażanie, zwane także rozmnażaniem klonalnym, pozwala w kulturach *in vitro* uzyskać z niewielkich fragmentów roślin wysoki wskaźnik rozmnażania wegetatywnego. Metoda ta wykorzystuje zdolność eksplantów do masowego tworzenia pąków bocznych, przybyszowych, mikrocebulek oraz zarodków [1, 2].

Zagrożonymi gatunkami drzew są zamierające okresowo dęby. Wykazano, że drzewostany dębowe zamierają zarówno w Polsce na Płycie Krotoszyńskiej [26], jak i w ekosystemach lasu Tronçais we Francji, w Austrii, na Węgrzech, w Rumunii Północnych Niemczech w Rosji i na Ukrainie. Zamierają także dęby na terenach krajów basenu Morza Śródziemnego [26, 20].

Rodzaj *Quercus* jest reprezentowany przez ponad 300 gatunków [5]. W Polsce występują 3 gatunki oraz ich mieszańce. W lasach polskich, najczęściej można spotkać *Quercus robur* dąb szypułkowy i *Quercus petraea* dąb bezszypułkowy oraz *Quercus pubescens* - dąb omszony, występujący u nas na stanowisku naturalnym w Bielinku nad Odrą.

Dęby, w sposób naturalny rozmnażają się przez żołędzie, przy czym u większości gatunków żołędzie dojrzewają w pierwszym miesiącu jesieni. Zbierać je należy w październiku. Żołędzie świeżo zebrane są wyjątkowo wrażliwe na wszelkie urazy mechaniczne (deptanie, obijanie) oraz mogą łatwo ulegać zaparzeniu, gdy składowane są w grubej warstwie lub przez kilka dni pozostają zamknięte w worku [13]. Żołędzie są także bardzo wrażliwe na przesuszenie. Przy obniżeniu wilgotności poniżej 40%, gwałtownie spada ich zdolność kiełkowania [28].

Na Płycie Krotoszyńskiej będącej jednym z najcenniejszych obiektów leśnych w Europie, okresy zamierania wystąpiły w latach 1911-1924, 1929-1934, 1939-1944 i nam współcześnie rozpoczynający się od 1981-1987 prawdopodobnie przedłużający się lokalnie na lata następne [27].

Na Płycie Krotoszyńskiej przebieg i przyczyny grupowego zamierania dębów były zbliżone do tych, jakie od początku tego wieku kilkakrotnie występowały w lasach dębowych Europy i Azji [26, 27]. Dlatego też, chcąc ratować dęby przed wymarciem rozpoczęto poszukiwanie innych niż naturalne metody rozmnażania.

Dęby zamierają, to bezsprzeczny fakt. Dlaczego więc w laboratoriach na całym świecie tak niechętnie podejmuje się próby ratowania tego gatunku? Otóż, odpowiedź na to pytanie leży najprawdopodobniej w genach dębu [18]. Jest to roślina, która niechętnie poddaje się badaniom i hodowli masowej w laboratoriach *in vitro*. Dąb wymaga specyficznych pożywek, olbrzymiej cierpliwości na każdym etapie hodowli, przy czym najmniejszy błąd ze strony hodowcy, przy tak wyjątkowo kapryśnym drzewie, powoduje jego natychmiastowe obumieranie w kolbach.

Wielu naukowców na całym świecie próbuje produkować dęby na skalę masową w laboratoriach *in vitro* [25, 7, 18], lecz nie jest to łatwe. Kłopoty rozpoczynają się już w początkowej fazie: podczas sterylizacji. W zależności od tego, z jakim materiałem roślinnym mamy do czynienia, wybiera się różne metody [7, 18, 25, 26, 32, 33, 34].

W przypadku młodych eksplantów zanurza się je początkowo w 70% etanolu przez 30 sek., następnie w 4-7% chlorku wapnia przez 5-7 min. Po takiej sterylizacji płucze się eksplanty kilkakrotnie sterylną wodą destylowaną. Jeśli materiałem roślinnym są żołędzie, wówczas sterylizuje się je wydłużając czas sterylizacji chlorkiem wapnia lub zwiększając jego stężenie, ewentualnie używając chlorku rtęci lub azotanu srebra (w stężeniach od 0,1-0,3%) [32]. Czasami dodaje się do roztworu Tweenu, aby zmniejszyć napięcie powierzchniowe. Żołędzie zanurza się w takim roztworze na 20 min., po czym płucze dokładnie sterylną wodą destylowaną [33].

Pomimo jednak takiego kilku etapowego sterylizowania, nie udało się do tej pory znaleźć jednej skutecznej metody sterylizacji dębu. Nie ma ustalonych stężeń roztworów gwarantujących udany proces sterylizacji. Dęby z jednej strony są bardzo odporne na sterylizację,

a z drugiej bardzo łatwo je "zabić", gdy czas sterylizacji jest zbyt długi lub stężenie zbyt wysokie.

Następnym problemem w hodowlach *in vitro* jest to, że dęby bardzo wolno i niechętnie rosną na pożywkach, które dotąd stosuje się w laboratoriach.

Na świecie stosuje się takie pożywki jak:

- zmodyfikowana Gresshoff'a, P.M. and Doy'a (1974)
- zmodyfikowana Murashige'o T. and Skoog'a F. (1962)
- Woody Plant Medium – Lioyd'a G. and McCowna B. (1981)
- BTM (broad-leaved tree medium, Chalupa (1981)  
BTM - 1 – zmodyfikowana (1981)
- Schenka R.U. and Hildebrandta A. C. (1972)

Do pożywek stosuje się różne dodatki w postaci: sacharozy, glukozy, thidiazuronu. Niezbędne są hormony roślinne syntetyczne bądź naturalne (2,4D, IAA, IBANAA, 2iP, Kinetyna, BAP, Zeatyna) [34, 6, 7]. Ogromne znaczenie ma pH pożywki. Na początku lat dziewięćdziesiątych sądzono, że pH wynoszące ok. 5,4-5,6 jest optymalne dla rozwoju eksplantów. Obecnie zauważono, że niższe pH 5,2-5,4 stwarza lepsze warunki dla wzrostu [4, 25].

Zmieniają się również poglądy dotyczące konsystencji pożywek. Do dzisiaj, od wielu już lat, stosuje się pożywki zestalone agarom, często jednak zostają one wypierane przez pożywki płynne. Pozwalają one lepiej pobierać eksplantom substancje odżywcze i nie wiążą niezbędnej do ich życia wody. Jednak takie media stwarzają zagrożenie gnicia eksplantów przy nieruchomym stanowisku. Aby tego uniknąć można więc używać pożywek dwufazowych, czyli stałą pożywkę zalewać dwumilimetrową warstwą płynną. Technika ta daje bardzo dobre rezultaty, jest jednak bardzo pracochłonna, a w związku z tym może być wykorzystywana jedynie w warunkach laboratoryjnych. Nie można liczyć na to, że przyjmie się w praktyce. Najnowszą tendencją jest aeroponika, czyli zamglawianie, które zdaje się zdecydowanie przewyższa media stałe i płynne.

Materiałem roślinnym w kulturach *in vitro* mogą być: żołądziejce, młode siewki, gałęzie pobierane z dorosłych drzew, odrosty od pni. Odpowiedni wybór materiału roślinnego decyduje o przebiegu kultury [20]. Żołądziejce, które dobrze znoszą sterylizację wykazują duże tendencje do brunatnienia i gnicia, zanim nastąpi ich rozwój. Metody te są jednak mało skuteczne dla drzewostanów i drzew będących już w fazie zamierania, jak ma to miejsce w przypadku dębów krotoszyńskich [29].

Najtrudniejszym preparatem do mikropropagacji są pędy pobierane z różnych warstw korony, przy czym najlepsze są gałęzie z zewnętrznej górnej warstwy [26] oraz pędy pobierane bezpośrednio z pnia [32, 33]. Im drzewo jest młodsze, tym większe są szanse na uzyskanie wzrostu w hodowli *in vitro*. Badania wykazały, że materiał pobrany z kilkusetletnich drzew właściwie nie nadaje się do hodowli. W takim przypadku 50% materiału ginie już podczas sterylizacji, natomiast pozostałe 50% ginie po kilku zaledwie pasażach [4]. Konieczne są prace nad optymalizacją warunków hodowli, aby właśnie te stare drzewa stanowić mogły materiał mateczny, gdyż właśnie one stanowią podstawową bazę rozwoju i ochrony zasobów genowych.

W przypadku mikrorozmnazania dębów można zauważyć ich gwałtowny wzrost podczas pierwszych czterech tygodni hodowli. Pączki na pędach nabrzmiewają, pojawiają się pierwsze liście. Jednak już w następnym tygodniu tempo wzrostu spada i zaczyna pokazywać się nekroza szczytowa [33, 4, 14]. Taki schemat hodowli wystąpił już kilkakrotnie. Jak dotąd nie ma sposobu na wyeliminowanie brunatnienia i nekrozy eksplantatów. Można jedynie próbować złagodzić nekrozę [31, 33]. Jest ona częściowo spowodowana oksydacją polifenoli, które występują w większej części drzewa. Skutki klonowania są typowe na różnych stopniach rozmnażania *in vitro* [18]. Aby złagodzić czernienie można stosować dodając do pożywek np. kwas askorbinowy, kwas cytrynowy, cysteinę, PVP i H<sub>2</sub>O [31]. Wykazano, że najskuteczniejszym związkiem jest kwas askorbinowy ponieważ eksplanty poddawane temu związkowi charakteryzowały się po sześciu tygodniach hodowli dość dobrym rozmnażaniem. Tylko 10% roślin zginęło, a reszta nie miała objawów nekrozy. Kwas cytrynowy był prawie tak dobry jak kwas askorbinowy (a w kilku przypadkach nawet lepszy) lecz później okazało się, że żywność eksplantatów była mniejsza.

W przypadku PVP oraz cysteiny, w pierwszych trzech tygodniach hodowli zaledwie 6% użytego materiału wykazywało prawidłowy wzrost. Jednak śmiertelność roślin była znacznie mniejsza niż w materiale nie traktowanym tymi związkami. Przemycanie H<sub>2</sub>O nie dawało żadnych rezultatów [31].

Obserwowano także nekrozy w hodowlach korzeniących i tam, gdzie następowała elongacja. Były one wynikiem nieobecności w pożywce cytokinin, a obecności IBA. W takim przypadku zapobiegano zmianom nekrotycznym obniżając ilość BA do IBA do 3 mg/l w pożywce. Gdy moczono rośliny w roztworze IBA, a następnie rosły one na pożywkach pozbawionych auksyn, ale zawierających BA (0,01 lub 0,05 mg/l) przez pierwszych 8 dni, po czym przenoszono je na pożywki pozbawione cytokinin, wówczas obserwowano gorsze ukorzenie [3, 33].

Następnym etapem w hodowli *in vitro* jest ukorzenie uzyskanych eksplantatów. Efekty korzeniotwórcze uzyskuje się dzięki sterowaniu odpowiednimi stężeniami substancji wzrostowych. Decydujące znaczenie tutaj ma zwłaszcza stosunek auksyn (IAA, IBA, NAA, 2,4 D) do cytokinin (kinetyna, BA, zeatyna, 2iP) [34, 25].

Celem hodowli dębów *in vitro* jest uzyskanie zarodków somatycznych, które umożliwiłyby szybkie opanowanie metody masowej produkcji nasion. Zarodki somatyczne powstają w procesie somatycznej embriogenezy z tkanek niegeneratywnych. Mogą tworzyć się bezpośrednio na eksplantacie lub z udziałem kalusa [1]. Rozwój tych zarodków jest podobny do embriogenezy zarodków zygotycznych. Są one strukturami biopolarnymi, ze stożkami wzrostu pędu i korzenia, mogą kiełkować dając roślin [11]. Obecność osi korzeń-pęd u zarodka umożliwia jego otoczkowanie. Otoczkowane somatyczne embriony mogą służyć do produkcji tzw. sztucznych nasion [19]. Sztuczne nasiona mogą być bardzo atrakcyjną perspektywą dla hodowców drzew, jednak trzeba odpowiedzieć jeszcze na wiele pytań, zanim dojdzie do produkcji na skalę masową.

Materiał roślinny, jakim jest dąb, jest na pewno trudny do hodowli w warunkach *in vitro* i na razie nie jest możliwa hodowla na skalę masową, lecz nasze badania wskazują na to, że wkrótce będzie to możliwe.

## Literatura

1. **Adamus A.**, 1996. Rozmnażanie i przechowywanie materiału roślinnego w kulturach *in vitro*. Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin. Kraków.
2. **Bach A.**, 1996. Advances in regeneration and micropropagation. *Biotechn.* 1 (32): 83-93.
3. **Ballester A., Sanchez M.C., San-Jose M.C, Vieitez A.M., Rodriguez R.**, 1990. Development of rejuvenation methods for *in vitro* establishment, multiplication and rooting of mature trees. *Life Sciences* 186: 43-49.
4. **Ballester A., Meier-Dinkel A.**, 1992. Micropropagation of *Quercus* species. Cost 87 Woody Plant Working Group, Commission of European Communities.
5. **Boratyński A.**, 1995. Podstawy systematyki dębów *Quercus* sp. *Biologia. Gospodarka. Kultury.* Wydawnictwo specjalne z okazji otwarcia wystawy Dąb. Gołuchów.
6. **Chalupa V.**, 1988. Large scale micropropagation of *Quercus robur* L. Using adenine-type cytokinins and thidiazuronto stimulate shoot proliferation. *Biologia plantarum.* Praga 30 (6): 414-421.
7. **Chalupa V.**, 1993. Vegetative propagation of oak (*Quercus robur* and *Quercus petraea*) by cutting and tissue culture. *Ann. Sci. For.* 50, Suppl. 1: 295-307.
8. **Danielewicz W.**, 1995. Dęby w lasach Polski. *Quercus* sp. *Biologia. Gospodarka. Kultury.* Wydawnictwo specjalne z okazji otwarcia wystawy Dąb. Gołuchów.
9. **Favre J.M., Juncker B.**, 1987. *in vitro* growth of buds taken from seedlings and adult plant material in *Quercus robur* L. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 8: 49-60.
10. **Favre J.M., Juncker B.**, 1989. Clonal effects in propagating oak trees *via in vitro* culture.. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 19: 267-276.
11. **Grajek W., Lassociński W.**, 1993. Perspektywy wykorzystania sztucznych nasion w leśnictwie. *Biotechnologia* 1 (20): 77-83.
12. **Hammant N.**, 1992. Progress in biotechnology of trees. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8: 369-377.
13. **Hryniewicz-Sudnik J., Sękowski B., Wilczkiewicz M.**, 1990. Rozmnażanie drzew i krzewów liściastych. PWN, Warszawa.
14. **Huetteman C.A., Preece J.E.**, 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. . *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 33: 105-119.
15. **Jorgensen J.**, 1993. Embryogenesis in *Quercus petraea*. *Ann. Sci. For.* 50, Suppl. 1: 344-350.
16. **Juncker B., Favre J.M.**, 1989. Clonal effect in propagating oak trees *via in vitro* culture.. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 19: 267-276.
17. **Malepszy S.**, 1988. Sztuczne nasiona – przełom w nasiennictwie. *Postępy Nauk Rolniczych*, 4: 3-15.

18. Malepszy S. (red.), 1990. Wprowadzenie do biotechnologii w genetyce i hodowli roślin. SGGW-AR, Warszawa.
19. Meier-Dinkel A., Becker B., Duckstein D., 1993. Micropropagation and *ex vitro* rooting of several clones of late flushing *Quercus robur* L. Ann. Sci. For. 50, Suppl. 1:319-322.
20. Oleksyn J., Przybył K., 1987. Oak decline in the Soviet Union- Scale and hypotheses. Eur. J. Path. 17: 321-336.
21. Puddephat I.J., Alderson P.G., Wright N.A., 1997. Influence of explant source, plant growth regulators and culture environment on culture initiation and establishment of *Quercus robur* L. *in vitro*. Journal of Experimental Botany. 48(309): 951-962.
22. Romano A., Noronha C., Martins-Loucao M.A., 1995. Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40: 159-167.
23. Sanchez M.C., Sanjose M.C., Ballester A., Vieitez A.M., 1996. Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Quercus rubra* shoots derived from mature trees. Physiology. 16(8): 673-680.
24. San-Jose M.C., Ballester A., Vieitez M., 1988. Factors affecting *in vitro* propagation of *Quercus robur* L. Tree Physiology 4: 381-390.
25. Savill P. S., Kanowski P. J., 1990. Tree improvement programs for European oaks: goals and strategies. Ann. Sci. For. 50, Suppl. 1:368-383.
26. Siwecki R., Liese W., 1991. Oak decline in Europe. Procee. of Intern. Symposium Kórnik, Poland, May 15-18, 1990. PWRiL – Oddz. Poznań, pp. 360.
27. Siwecki S., 1995. Syndrom zamierania dębów na Płycie Krotoszyńskiej. *Quercus* sp. Biologia. Gospodarka. Kultury. Wyd. spec. na otwarcie wystawy "Dąb". Gołuchów.
28. Suszka B., Muller C., Bonnet-Masimbert M., 1994. Nasiona leśnych drzew liściastych od zbioru do siewu. PWN, Warszawa, str. 261.
29. Tóth K., Haapala A., 1994. Alleviation of browning in oak explants by chemical pretreatments. Biologia Plantarum 36 (4): 511-517.
30. Van Doorselaere J., Van der Mijnsbrugge K., Baucher M. i in., 1993. Genetic engineering in forest trees. Agro-Food-Industry Hi-Tech.,: 15-19.
31. Vieitez A.M., San-Jose C., Vieitez E., 1985. *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L., Journal of Horticultural Science 60 (1): 99-106.
32. Vieitez A.M., Sanchez C., San-Jose C., 1989. Prevention of shoot-tip necrosis in shoot cultures of chestnut and oak. Scientia Horticulturae, 41: 151-159.
33. Vieitez A.M., Pintos F., San-Jose M.C., Ballester A., 1993. *In vitro* shoot proliferation determined by explant orientation of juvenile and mature *Quercus rubra* L. Tree Physiology 12 (2): 107-117.
34. Zenkteler M., 1984. Hodowla komórek i tkanek roślinnych. PWN, Warszawa.

## **Summary**

### **New trends in silviculture – oak in in vitro cultures**

The increasing decline of forest environment, at continuing great concentration of pollution in the atmosphere, causes a considerable decrease of production functions of the forest, while its infrastructural functions become drastically limited. The restitution of forests on declined or destroyed sites as well as conservation of biological and genetic diversity for future generations compels us to a quick action toward conservation of disappearing populations.

Oaks belong to the most important species of forest-forming species of broadleaf trees in our country. The proper use of existing populations and genotypes of special value, as well as conservation of those that are especially threatened, like the Krotoszyn oak, may proceed through a more broad than up today use of in vitro culture techniques. Propagation through rooting of shoots, i.e. grafts is difficult, and it requires a large amount of mother material. The propagation in vitro creates however possibilities, potentially unlimited, for breeding oaks (of known genotype and resistant to diseases) in a relatively short time. At the same time this method can be implemented to the forest practice.