

Krystyna SZCZYGIEL, Jolanta BIENIEK\*

## **KRIOKONSERWACJA KULTUR TKANKOWYCH DRZEW IGLASTYCH – UZUPEŁNIAJĄCA METODA ZACHOWANIA ZASOBÓW GENOWYCH DRZEW LEŚNYCH *EX SITU***

**CRYOPRESERVATION OF CONIFEROUS TREES TISSUE CULTURES –  
THE ADDITIONAL METHOD OF FOREST TREES (*EX SITU*) GENE RESOURCES  
CONSERVATION**

***Abstract.** Cryopreservation of somatic embryos and tissue offers long-term storage of forest trees genetic resources. This additional method is useful for forest trees (*ex situ*) gene resources conservation. It offers genetic stability of stored germplasm and high level of regeneration. The most appropriate for this purpose are: embryogenic callus and somatic embryos. The applied procedure make possible to obtain high survival of spruce, larch and silver fir embryogenic callus (66.7–100%) and germination of somatic embryos (20–73.3%) after thawing from liquid nitrogen.*

***Key words:** cryopreservation, somatic embryogenesis, embryogenic tissue (callus), somatic embryos, DMSO-dimethylsulfoxide.*

---

\*Instytut Badawczy Leśnictwa, Zakład Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych, 05-090 Raszyn, Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3, e-mail: [szczygik@ibles.waw.pl](mailto:szczygik@ibles.waw.pl)

## 1. WSTĘP

Podstawową zaletą somatycznej embriogenezy, obok uzyskiwania dużej liczby osobników potomnych w krótkim okresie czasu, jest możliwość wykorzystania kriokonserwacji kultur tkankowych, tj. długoterminowego przechowywania ich w temperaturze ciekłego azotu ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Kriokonserwacja to osiągnięcie kriobiologii – nauki badającej wpływ superniskich temperatur na organizmy żywe. Przedmiotem jej badań jest minimalizowanie uszkodzeń komórkowych powstających w wyniku zamrażania materiału żywego. Kartha (1981, za Chmielarz 1998) definiuje kriokonserwację jako przechowywanie materiału żywego w temperaturze między  $-79^{\circ}\text{C}$  i  $-196^{\circ}\text{C}$ , w której procesy metaboliczne komórek ulegają spowolnieniu, a uszkodzenia biologiczne zamrażanego materiału – zminimalizowaniu lub w ogóle nie zachodzą.

Długoterminowe przechowywanie materiału roślinnego zapewnia jego genetyczną stabilność, a także możliwość przechowywania go w praktycznie nieograniczonym czasie, gdyż procesy biochemiczne ustają w temperaturze  $-130^{\circ}\text{C}$ , a metaboliczne – przy  $-196^{\circ}\text{C}$ . Daje to podstawę do wykorzystania kriokonserwacji w celu długoterminowego przechowywania zasobów genowych drzew leśnych (Matras i in. 1993, Blakesley i in. 1996). Może być ona stosowana jako metoda uzupełniająca zachowania zasobów genowych drzew leśnych *ex situ*, szczególnie tych gatunków, których nasiona trudno lub w ogóle nie można przechowywać w chłodni przez długi okres.

Z danych literaturowych wynika, że kalus embriogeny i somatyczne zarodki wykształcone podczas somatycznej embriogenezy są doskonałym materiałem do tego typu przechowywania. Celem przedstawionych doświadczeń\* było określenie możliwości i sposobów długoterminowego przechowywania tkanki embriogennej i somatycznych zarodków: świerka pospolitego (*Picea abies* Karst.), modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.) i jodły pospolitej (*Abies alba* Mill.).

## 2. METODYKA BADAŃ

Do badań nad możliwością przechowywania tkanek roślinnych w temperaturze ciekłego azotu ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) wykorzystano kalus embriogeny świerka pospolitego, modrzewia europejskiego i jodły pospolitej oraz somatyczne zarodki w stadium liścieniowym wytworzone z tych kalusów. Materiał ten uzyskano stosując metodykę opracowaną wcześniej w Zakładzie Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych, IBL (Szczygieł 2003).

---

\* Pracę wykonano w ramach tematu BLP-814 finansowanego przez Dyрекcję Generalną Lasów Państwowych

### *Metoda kriokonserwacji kalusa embriogenego*

W celu przygotowania kalusa embriogenego badanych gatunków drzew leśnych do umieszczenia w ciekłym azocie zastosowano, wprowadzając własne modyfikacje, procedurę stosowaną w laboratorium w Kanadzie (Canadian Forest Service) i we Francji (INRA, Orlean) (Klimaszewska i in. 1992, Lelu – informacja ustna).

Odważoną masę kalusa embriogenego (kalus jednotygodniowy) umieszczano w płynnej pożywce do jego namnażania, o zwiększonym w stosunku do pożywki podstawowej stężeniu sacharozy (0,4 M) lub sorbitolu (0,4 M). Dla każdego gatunku stosowano odpowiednią pożywkę. W doświadczeniach zastosowano pożywki do namnażania kalusa embriogenego, dojrzewania somatycznych zarodków oraz ich kiełkowania opisane w publikacji Szczygieł (2003). Następnie zawieszinę kalusa pozostawiano na wytrząsarce przez okres 24 godziny (w ciemności, w temp. 25°C). Po tym czasie kolby z materiałem przenoszono do lodu i uzupełniano wcześniej przygotowanym i schłodzonym roztworem składającym się z: 5% DMSO (krioprotektant – dwumetylowy tlenek siarki) i płynnej pożywki do namnażania. Tak przygotowany i schłodzony roztwór dodawano przez 30 min. (0,5 ml/5min.) do zawiesiny kalusa. Następnie materiał roślinny z roztworem krioprotektantu schładzano w lodzie przez okres 1,5 godz., po czym przenoszono do wcześniej schłodzonych krioprobówek. Krioprobówki umieszczano w wypełnionym alkoholem izopropylowym naczyniu firmy NALGENE™ z USA (tzw. Mr Frosty), które zapewnia powolne obniżanie temperatury o 1°C/min., i umieszczano je w zamrażarce o temperaturze –70°C na okres 1,5 godz. Krioprobówki następnie przenoszono do naczynia z płynnym azotem, na okres od 1 godz. do 2 dni, zależnie od próby.

Materiał po wyjęciu z ciekłego azotu rozmrażano przez okres 2–5 min. w łaźni wodnej o temp. 37°C, po czym zawieszinę kalusa przenoszono na filtr papierowy umieszczony w lejku Büchnera i za pomocą pompy próżniowej odsysano pożywkę. Kalus na filtrze papierowym umieszczano w szalkach na stałej, utwardzanej phytagelem pożywce do jego namnażania.

W doświadczeniach przeprowadzonych w 6–10 powtórzeniach wykonano następujące badania i obserwacje:

- określano przeżywalność rozmrożonego kalusa embriogenego świerka pospolitego, jodły pospolitej oraz modrzewia europejskiego (pochodzenia linii podano w tabeli 1, rozdz. 3). Po 2–3 dniach po rozmrożeniu obserwowano pod binokulem przyrost masy kalusa (rozwój nowych komórek), a po tygodniu stwierdzano obecność lub brak w tkance nowych prazarodków (tkankę embriogenną barwiono acetokarminem, który wybarwia jądra komórek na czerwono),

- oznaczano przyrost świeżej masy kalusa embriogenego świerka pospolitego (dwie linie: z Nadl. Wisła oraz pochodzenia sudeckiego), ważąc co dwa tygodnie kalus embriogeny (7 pasaży, po 30 szt. kalusów z każdego pochodzenia),

- badano pod binokulem dojrzewanie somatycznych zarodków wytworzonych z kalusa przechowywanego w ciekłym azocie: świerka pospolitego (linia

pochodząca z Nadl. Wisła) oraz modrzewia europejskiego (dwie linie pochodzące z Nadl. Młynary, po 30 szt. kalusa z każdego pochodzenia).

### *Zamrażanie somatycznych zarodków w ciekłym azocie*

Dojrzałe (z wyraźnymi liścieniami) somatyczne zarodki świerka i modrzewia bezpośrednio zanurzano w ciekłym azocie (1–2 godz.) lub przed tym stosowano zabieg częściowego podsuszania w warunkach wysokiej (ok. 95%) wilgotności powietrza (Roberts i in. 1990, 1991). Zarodki natychmiast po wyjęciu z ciekłego azotu rozmrażano w łaźni wodnej o temp. 37°C, po czym wykładano na pożywkę do kiełkowania. Doświadczenia przeprowadzono stosując somatyczne zarodki świerka pospolitego i modrzewia europejskiego rodzimych pochodzeń oraz wykształcone na kalusie zainicjowanym w INRA w Orleanie (C1 i H 18 – linie modrzewia europejskiego, F 80 linia zainicjowana na zarodku mieszańca *Larix leptoeuropaea* × *L. kaempferi* × *L. decidua*).

W doświadczeniach przeprowadzonych w 6–10 powtórzeniach wykonano następujące badania:

- obliczano (w procentach) zdolność kiełkowania somatycznych zarodków z dwóch linii modrzewia europejskiego pochodzącego z Nadl. Młynary, wytworzonych z kalusa po jego rozmrożeniu z ciekłego azotu (zbadano ogółem 1437 szt. zarodków),

- określano zdolność kiełkowania podsuszanych somatycznych zarodków, po przechowywaniu w ciekłym azocie: świerka pospolitego (105 szt. zarodków podsuszanych przez 2–3 tyg.), modrzewia linii francuskich (80 szt. podsuszanych przez 2 tyg.) oraz modrzewia europejskiego (75 szt. podsuszanych przez 2 dni),

- wykonano pomiary wielkości 2-miesięcznych somatycznych siewek modrzewia europejskiego pochodzącego z Nadl. Młynary, wyhodowanych z somatycznych zarodków wykształconych z kalusa zamrożonego w ciekłym azocie (zmierzone 176 szt. siewek).

W tabelach podano średnią ± błąd standardowy obliczoną przy użyciu programu Statistica 6.1.

## **3. WYNIKI BADAŃ**

### **3.1. Wpływ kriokonserwacji na przeżywalność kalusa embriogenego badanych gatunków drzew leśnych**

W przeprowadzonych doświadczeniach nad możliwością przechowywania w ciekłym azocie kalusa embriogenego świerka, jodły i modrzewia uzyskano wysoką przeżywalność badanego materiału po rozmrożeniu (tab. 1).

Gdy zawiesinę tkanki uzupełniano 0,4 M sacharozy, zależnie od próby, dla różnych linii pochodzenia kalusa embriogenego przeżywalność kalusa po roz-

**Tabela 1. Przeżywalność kalusa embriogenego po rozmrożeniu z ciekłego azotu (krioprotektant: 5% roztwór DMSO)**

Table 1. The embryogenic callus survival after thawing from liquid nitrogen (5% DMSO as cryoprotectant)

Gatunek/pochodzenie/numer linii Species/origin/line number	Liczba kalusów w ciekłym azocie (szt.) Callus number in liquid nitrogen (pieces)	Przeżywalność kalusa embriogenego Embryogenic callus survival (%)
<b>Świerk pospolity</b> Norway spruce		
Sudety – 1254/2	7	85,7
Sudety – 550/4	7	85,7
Sudety – 5/21/2	9	66,7
Sudety – 552/5	9	88,9
Wisła – 4	9	88,8
Wisła – 4	5	100,0
<b>Jodła pospolita</b> Silver fir		
Piwniczna – 8228	9	50,0
Stary Sącz – 7128	9	50,0
<b>Modrzew europejski</b> European larch		
Młynary – 2920/II/7	10	70,0
Młynary – 2920/II/1	10	100,0
Młynary – 2920/II/5*	6	66,7
Dobrocin – 3079/I/8*	6	83,3
Dobrocin – 3080/III/4*	6	83,3

\* zastosowano 0,4 M sorbitol zamiast sacharozy

0.4 M sorbitol was applied instead of sucrose

mrożeniu wynosiła: dla świerka pospolitego 67,7–100%, dla jodły pospolitej – 50%, a modrzewia europejskiego – 70–100%. Zastosowanie zamiast 0,4 M sacharozy roztworu sorbitolu o tym samym stężeniu spowodowało również wysoką przeżywalność badanych linii kalusa modrzewia europejskiego (66,7–83,3%), lecz w dalszej hodowli obserwowano znacznie mniejsze przyrosty jego świeżej masy po rozmrożeniu.

Już po 3 dniach po rozmrożeniu w kulturach obserwowano żywe prazarodki (fot. 1), a po 2–4 tygodniach hodowli na pożywce do namnażania – wyraźny przyrost kalusa. Przyrost świeżej masy kalusa embriogenego świerka pospolitego po rozmrożeniu z ciekłego azotu przedstawiono na rycinie 1.

Kalus po rozmrożeniu i częstych pasażach na świeże pożywki do namnażania charakteryzował się bardzo dobrym przyrostem świeżej masy (średni przyrost świeżej masy kalusa obu pochodzeń świerka po pierwszym pasażu, tj. po 2



**Fot. 1. Żywe prazarodki modrzewia europejskiego po rozmrożeniu kalusa embriogennego z ciekłego azotu**

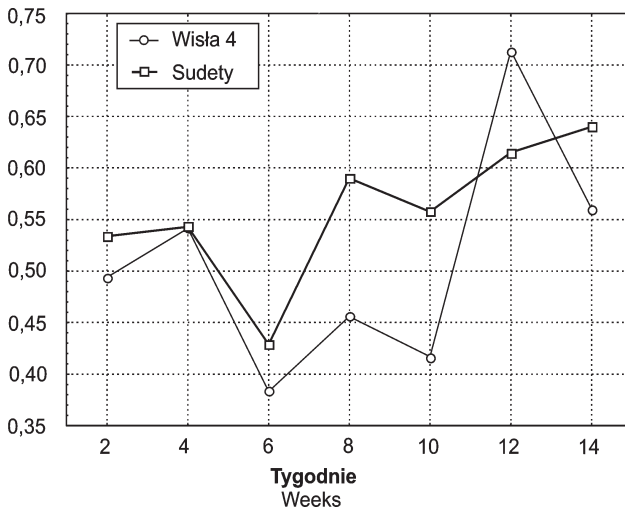
Photo 1. Living proembryos of European larch after embryogenic callus thawing from liquid nitrogen



**Fot. 2. Kalus embriogeny świerka po rozmrożeniu z ciekłego azotu (2 miesiące hodowli)**

Photo 2. Spruce embryogenic callus after thawing from liquid nitrogen (2 months of cultivation)

**Przyrost świeżej masy kalusa embriogennego (g)**  
Fresh mass increment of embryogenic callus (g)



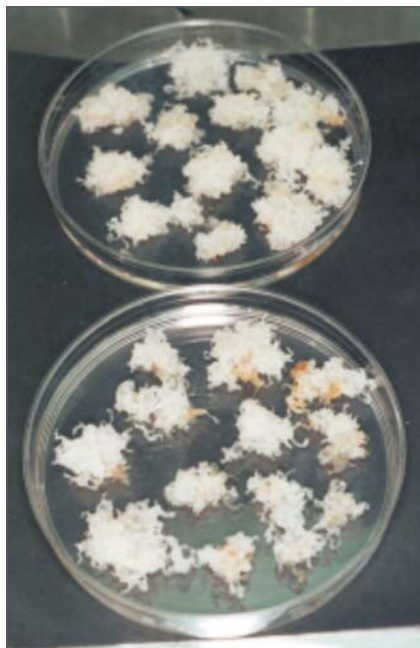
**Ryc. 1. Przyrost kalusa embriogennego świerka pospolitego (pochodzenie z Nadl. Wisły i z Sudetów) po rozmrożeniu z ciekłego azotu**

Fig. 1. Norway spruce (two lines: Wisła Forest District – origin, and Sudety Mts.) callus embryogenic increment after thawing from liquid nitrogen

tygodniach hodowli, wynosił 0,50 do 0,55 g). Podobnie reagowały pozostałe linie świerka pospolitego (fot. 2), jodły pospolitej (fot. 3), a także modrzewia europejskiego.

Kalus embriogeny po rozmrożeniu z ciekłego azotu wyłożono na pożywki do dojrzewania somatycznych zarodków, które składają się z pożywki podstawowej uzupełnionej kwasem abscysynowym (ABA).

Jak wynika z liczby somatycznych zarodków wytworzonych z kalusa po rozmrożeniu, średnia liczba somatycznych zarodków w stadium liścieniowym z 1 grama świeżej masy kalusa dla linii modrzewia europejskiego przewyższa wartość uzyskaną z kalusa kontrolnego (bez zamrażania) (tab. 2). Obserwowano jednoczesny rozwój zarodków ze stadium globularnego w liścieniowe. Podobnie zregenerowały zarodki liścieniowe z kalusa świerka pospolitego pochodzącego z Nadleśnictwa Wisła (fot. 4), chociaż w mniejszej liczbie niż w kontroli (bez zamrażania). U świerka obserwowano natomiast dużą liczbę zarodków w stadium globularnym (średnio 314,0 szt. z grama świeżej masy kalusa embriogenego).



**Fot. 3. Dwumiesięczny kalus embriogeny jodły pospolitej po rozmrożeniu z ciekłego azotu – na dole, u góry kalus namrażany w warunkach optymalnych (kalus niezamrażany)**

Photo 3. Two months old silver fir embryogenic callus after thawing from liquid nitrogen – lower dish, callus growing under optimal condition (callus not frozen in liquid nitrogen) – upper dish

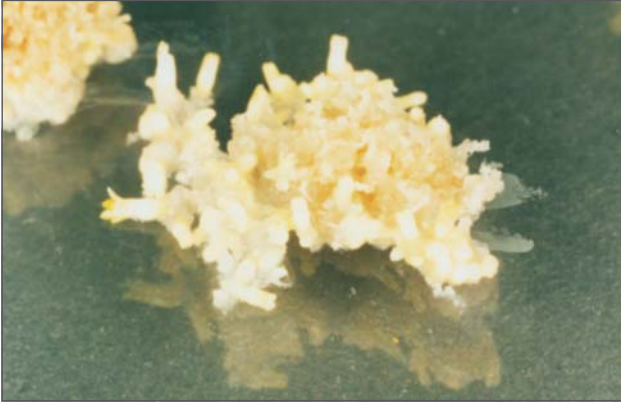
**Tabela 2. Dojrzewanie somatycznych zarodków modrzewia europejskiego z kalusa przechowywanego w ciekłym azocie (pochodzenie Nadl. Młynary) oraz świerka pospolitego (linia Wisła 4)**

Table 2. European larch somatic embryos maturation developed from callus stored in liquid nitrogen (origin Młynary Forest District) and Norway spruce (origin Wisła 4 line)

Gatunek Species	Liczba somatycznych zarodków liścieniowych/gram świeżej masy kalusa Cotyledonary somatic embryos number/gram of fresh mass of callus	
	*kontrola *control	kalus przechowywany w ciekłym azocie callus stored in liquid nitrogen
<b>Modrzew europejski</b> European larch	115,3±17,7	170,3±43,2
<b>Świerk pospolity</b> Norway spruce	64,6 ±6,49	14,1±3,0

\*Kontrola – kalus nie przechowywany w ciekłym azocie

\*Control – callus not stored in liquid nitrogen



**Fot. 4. Somatyczne zarodki świerka pospolitego wytworzone z kalusa przechowywanego ciekłym azocie**

Photo 4. Spruce somatic embryos developed from embryogenic callus stored in liquid nitrogen

### **3.2. Wpływ kriokonserwacji na przeżywalność somatycznych zarodków badanych gatunków drzew leśnych**

Somatyczne zarodki świerka pospolitego linii pochodzących z Nadl. Wisła podsuszano przez 3 tygodnie przed zamrożeniem w ciekłym azocie, a po rozmrożeniu wykładano na pożywkę do kiełkowania. Z trzech przeprowadzonych prób tylko w jednej 80% zarodków wykształciło liścienie, a 20% korzenie (fot. 5). W innej próbie po rozmrożeniu uzyskano zdolność kiełkowania zarodków w 60%. Część wyłożonych na pożywkę zarodków zbrązowiała i nie kiełkowała. W badanych próbach zdolność kiełkowania kształtowała się w zakresie od 0 do 60% (tab. 3).

Przeżywalność po rozmrożeniu somatycznych zarodków z kalusa modrzewia linii francuskich (podsuszanych przez 2 tygodnie) była stosunkowo niska: od 0 do 6,7% (tab. 4).

Znacznie wyższą wartość przeżywalności somatycznych zarodków modrzewia europejskiego uzyskano, gdy do kiełkowania zastosowano zarodki podsuszane tylko przez dwa dni, zależnie od próby od 0 do 73,3% (tab. 5, fot. 6).



**Fot. 5. Kielkujące somatyczne zarodki świerka pospolitego uzyskane z kalusa przechowywanego w ciekłym azocie**

Photo 5. Norway spruce germinating somatic embryos from embryogenic callus stored in liquid nitrogen



**Tabela 3. Kielkowanie somatycznych zarodków świerka pospolitego podsuszanych przez 2 i 3 tygodnie, a następnie przechowywanych w ciekłym azocie przez 1 godz.**  
 Table 3. Spruce somatic embryos germination that have been dried for 2–3 weeks, then stored an hour in liquid nitrogen

Pochodzenie linii kalusa Callus line origin	Liczba somatycznych zarodków wyłożonych na pożywkę do kielkowania (szt.) Somatic embryos number on germination medium (pieces)	Zdolność kielkowania zarodków Embryos germination capacity (%)
Nadl. Wisła Wisła Forest District	25	20,0
	25	0,0
	25	0,0
	10	60,0
	10	50,0
	15	0,0
	30*	55,0
Sudety Sudety Mts	17	43,0

\* zarodki podsuszane przez 2 tygodnie  
embryos dried for 2 weeks

**Tabela 4. Kielkowanie somatycznych zarodków modrzewia linii francuskich oraz pochodzących z Nadl. Młynary, podsuszanych przez 2 tygodnie i przechowywanych przez 1 godz w ciekłym azocie**

Table 4. Somatic embryos germination of larch from French lines and of Młynary Forest District origin, dried for 2 weeks and stored an hour in liquid nitrogen

Pochodzenie linii Line origin	Liczba somatycznych zarodków wyłożonych na pożywkę do kielkowania (szt.) Somatic embryos number on germination medium (pieces)	Zdolność kielkowania zarodków Embryos germination capacity (%)
Linie z Francji French lines	30	3,3
	20	5,0
	15	0,0
	15	6,7
Nadl. Młynary Młynary Forest District	100	0,0
	100*	0,0

\* zarodki bez podsuszania  
embryos without drying

Zarodki somatyczne modrzewia europejskiego wytworzone z kalusa przechowywanego wcześniej w ciekłym azocie kielkowały w stosunkowo wysokim procencie od 63,0 do 85,5% (tab. 6).

**Tabela 5. Kielkowanie somatycznych zarodków modrzewia europejskiego pochodzącego z Nadl. Młynary, podsuszanych przez 2 dni i przechowywanych w ciekłym azocie przez 1 godz.**

Table 5. Somatic embryos germination of European larch of Młynary Forest District origin, dried for 2 days and stored an hour in liquid nitrogen

Liczba somatycznych zarodków wyłożonych na pożywkę do kielkowania (szt.) Somatic embryos number on germination medium (pieces)	Liczba zarodków z liścieniami Number of embryos with cotyledones	Liczba zarodków z korzeniami Number of embryos with roots	Zdolność kielkowania zarodków Embryos germination capacity (%)
15	1	0,0	0,0
15	0	0,0	0,0
15	12	5,0	33,3
15	14	11,0	73,3
15	7	0,0	0,0

**Tabela 6. Kielkowanie somatycznych zarodków modrzewia europejskiego pochodzącego z Nadl. Młynary (uzyskane z kalusa przechowywanego w ciekłym azocie)**

Table 6. Somatic embryos germination of European larch of Młynary Forest District origin (developed from callus stored in liquid nitrogen)

Kalus embriogenny Embryogenic callus	Pożywka do dojrzewania somatycznych zarodków Somatic embryos maturation medium	Liczba somatycznych zarodków wyłożonych na pożywkę do kielkowania (szt.) Somatic embryos number on germination medium (pieces)	Zdolność kielkowania zarodków Embryos germination capacity (%)
*Kontrola *Control	MSG** z 60 $\mu$ M ABA i 1 $\mu$ M IBA MSG** from 60 $\mu$ M ABA and 1 $\mu$ M IBA	60	88,33 $\pm$ 4,4
Kalus zamrażany w ciekłym azocie Callus frozen in liquid nitrogen	MSG z 60 $\mu$ M ABA MSG from 60 $\mu$ M ABA	140	85,50 $\pm$ 9,3
	MSG z 60 $\mu$ M ABA i 1 $\mu$ M IBA MSG from 60 $\mu$ M ABA and 1 $\mu$ M IBA	1297	63,00 $\pm$ 4,2

\* Kontrola – kalus niezamrażany

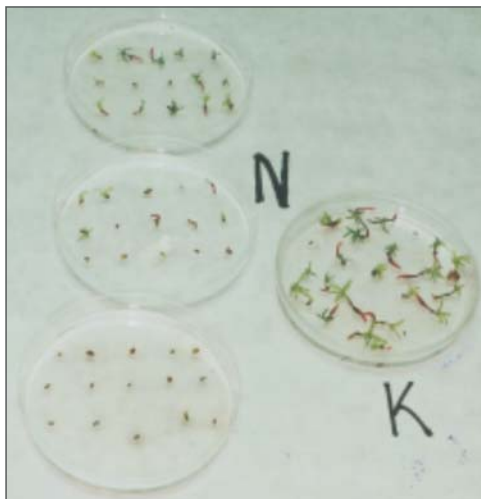
Control – callus not stored in liquid nitrogen

\*\* MSG – pożywka podstawowa (Becwar i in. 1990)

MSG – basal medium (Becwar i in. 1990)

**Fot. 6. Kielkowanie somatycznych zarodków modrzewia europejskiego przechowywanych w ciekłym azocie (1 godz.) – N oraz niezamrażanych – K (kontrola)**

Photo 6. European larch germination of somatic embryos stored in liquid nitrogen (1 h) – N, and non frozen – K (control)



Z wykształconych z kalusa embriogennego (przechowywanego wcześniej w ciekłym azocie) somatycznych zarodków wyrosły siewki o podobnych parametrach wzrostowych co siewki somatyczne kontrolne (z kalusa niezamrażanego). Siewki wysadzono do doniczek i po dwóch miesiącach adaptacji do warunków naturalnych w fitotronie hodowano je w szklarni IBL w Sękocinie.

#### 4. DYSKUSJA

Pierwsze doniesienia o możliwości kriokonserwacji kultur embriogennych świerka pospolitego pochodzą z 1987 r. (Galerie i Dereuddre 1987, Gupta i in. 1987). Również Kartha i inni (1988), stosując kultury zawieszinowe świerka białego [*Picea glauca* (Moench) Voss.], uzyskali wysoką przeżywalność zamrożonego materiału. Opisana przez nich metoda składała się z następujących podstawowych etapów: najpierw przygotowywano do zamrażania zawiesinę kalusa z 0,4 M sorbitolu, następnie dodawano do niej krioprotektant – 5% DMSO, po czym stopniowo zamrażano (0,3°C/min) do temperatury –35°C i szybko zanurzano w ciekłym azocie. Materiał ten rozmrażano w temp. 35–40°C. Metoda ta stała się podstawą dla późniejszych badań nad kriokonserwacją kalusa embriogennego drzew z rodzaju: *Picea* spp. (Bercetche i in. 1990, Klimaszewska i in. 1992, Cyr i in. 1994, Hogberg i in. 1998, DeVerno i in. 1999), *Pinus* spp. (Laine i in. 1992, Ford i in. 2000), *Larix* (Klimaszewska i in. 1992) i *Abies* (Norgaard i in. 1993). Cytowani autorzy uzyskali wysoką przeżywalność kalusa oraz regenerację z niego roślin.

Jak wynika z przeprowadzonych doświadczeń przeżywalność kalusa embriogennego badanych gatunków drzew iglastych jest wysoka (tab. 1). Zastosowana metoda uwzględniała również powolne zamrażanie zawiesiny kalusa (1°C/min), dzięki naczyniom Mr Frosty, wypełnionych alkoholem izopropylowym. Jest ona stosowana na skalę gospodarczą w Kanadzie, gdzie została opra-

cowana i wprowadzona do badań nad hodowlą drzew przez dr Krystynę Klimaszewską z Laurentian Canadian Forest Service (Cyr 1999), a także do badań we Francji przez dr Marie Anne Lelu z INRA, Orlean (informacja ustna). Zastosowanie w przedstawionych badaniach sacharozy zamiast sorbitolu okazało się bardziej korzystne, mimo, że dotychczas najczęściej stosowano dla większości gatunków drzew iglastych sorbitol. Sacharozę dla *Picea abies* stosowała wcześniej Bercetche z zespołem (1990). Z kolei Haggman z zespołem (1998), stosując jako krioprotektant mieszaninę 10% PEG (6000), 10% glukozy i 10% DMSO, uzyskali 78% regenerację kalusa embriogenego sosny zwyczajnej. Nie wszystkie genotypy drzew iglastych reagują jednak w ten sam sposób przy zastosowaniu temperatury  $-196^{\circ}\text{C}$ , część z nich nie regeneruje po rozmrożeniu z ciekłego azotu, a czasami kultury wymagają dłuższego okresu hodowli po rozmrożeniu, aby mogły zacząć się procesy wzrostowe (Galerie i Dereuddre 1987, Norgaard i in. 1993, Cyr i in. 1994). Park i współpracownicy (1998), po przebadaniu 551 genotypów świerka białego doszli do wniosku, że to jakość kultur (dobry przyrost i czystość kultur kalusa) a nie genotyp ma wpływ na przeżywalność kalusa embriogenego po kriokonserwacji.

Uzyskane wyniki badań – duża liczba dojrzałych somatycznych zarodków wytworzonych na rozmnożonych kalusach modrzewia europejskiego – są podobne do rezultatów otrzymanych przez Bercetche i współpracowników (1990), którzy również obserwowali zwiększenie zdolności do regeneracji somatycznych zarodków z kalusa świerka pospolitego po przechowywaniu w ciekłym azocie i po jego rozmrożeniu. W badaniach innych autorów (Klimaszewska i in. 1992, Laine i in. 1992, Gupta i in. 1993, Park i in. 1998), a także w prezentowanych doświadczeniach, otrzymano wysoką regenerację siewek z zarodków wykształconych z kalusa po rozmrożeniu. Uzyskane wyniki, zarówno zdolności kiełkowania, jak i wielkości siewek modrzewia europejskiego otrzymanych z kalusa mrożonego, są podobne do rezultatów uzyskanych dla zarodków i siewek kontrolnych z kalusa nie zamrażanego.

Kalus embriogeny stanowi bardzo efektywny materiał (do przechowania wystarczy mała jego ilość – krioprobówka, o objętości 1–2 ml), który cechuje się dużą przeżywalnością i szybką regeneracją po rozmrożeniu. Dlatego też z powodzeniem może być wykorzystany do tworzenia banków genów w celu długoterminowego przechowywania zasobów genowych drzew leśnych *ex situ* (jako metoda uzupełniająca).

W Kanadzie, Francji, Nowej Zelandii, Szwecji, USA, Chile, Finlandii i Południowej Afryce powstał w latach 90. XX w. program zakładania banków klonów linii elitarnych na bazie zamrażanego kalusa embriogenego. Materiał ten przechowywany jest głównie dla celów handlowych. W 1998 r. przechowywano tam ogółem ok. 8000–10 000 genotypów, głównie odmian świerka i sosny (Cyr 1999, Cyr i Klimaszewska 2002). Obecnie kriokonserwacją objęte są kultury embriogenne 26 gatunków drzew leśnych z rodzajów: *Abies* (1 gatunek), *Picea* (8), *Larix* (6), *Pinus* (10) i *Pseudotsuga* (1). Długoterminowym przechowywaniem tkanek

różnych gatunków drzew zajmowało się wielu badaczy: jedlicy – Gupta i in. (1993), sosny – Bercetche i Paques (1995), Aitken-Christie i in. (1994, za Cyr 1999), świerka czarnego – Adams i in. (1994), świerka pospolitego – Norgaard i inni (1993), von Arnold i inni (1996), Charest i Klimaszewska (1995). Szczegółowe dane na ten temat znajdują się w opracowaniu przedstawionym przez Cyr (1999).

Kriokonserwacja kalusa embriogenego na skalę produkcyjną z zastosowaniem krioprotektantów jest kosztowna i pracochłonna. Od lat trwają badania nad długoterminowym przechowywaniem w niskiej temperaturze nasion i ich fragmentów, np. osi zarodkowych czy zygotycznych i somatycznych zarodków gatunków drzew i krzewów liściastych (Jorgensen 1990, Bajaj 1995, Chmielarz 1998). Ostatnio przeprowadzono również badania nad możliwością przechowywania podsuszanych somatycznych zarodków niektórych gatunków drzew iglastych (Bomal i Tremblay 2000, Percy i in. 2000, 2001).

Podczas naturalnego rozwoju zygotycznych zarodków w nasieniu zachodzi proces utraty wody. Somatyczne zarodki liścieniowe (wytworzone na pożywce z kwasem abscysynowym) nie przechodzą tego procesu. W celu obniżenia zawartości wody w somatycznych zarodkach stosuje się zabiegi częściowego podsuszania w warunkach wysokiej (95–97%) wilgotności powietrza (Roberts i in. 1990, Roberts i in. 1991, Attree i in. 1992, 1995, Beardmore i Charest 1995 a, b) lub suszenie z zastosowaniem wysyconych roztworów soli (Roberts i in. 1990, Bomal i Tremblay 1999, 2000, Percy i in. 2000, 2001). Zastosowanie podsuszania somatycznych zarodków ma wpływ na ich jakość poprzez zwiększenie akumulacji substancji zapasowych, zdolności kiełkowania oraz synchronicznego rozwoju korzeni i hipokotyli z liścieniami, a także skrócenie czasu kiełkowania zarodków oraz polepszenie rozwoju wyhodowanych z nich siewek (Roberts i in. 1990, 1991, Bomal i Tremblay 1999, 2000).

Podsuszane somatyczne zarodki gatunków drzew iglastych wykorzystano do długoterminowego przechowywania ich w temperaturze ciekłego azotu. Zarodki przed zanurzeniem w ciekłym azocie wymagają redukcji zawartości wody w tkankach, aby zapobiec wewnątrzkomórkowej krystalizacji wody, która mogłaby uszkodzić komórki. Dojrzałe somatyczne zarodki (po powolnym suszeniu w wilgotności względnej powietrza 95–97%) przeżywają zamrażanie bez konieczności stosowania krioprotektantów i kiełkują po rozmrożeniu. Somatyczne zarodki *Picea mariana* suszone w warunkach wilgotności powietrza 88 i 97% przed kriokonserwacją, kiełkowały po rozmrożeniu w 96,7–100%. Po 1–4 miesiącach od rozmrożenia somatyczne zarodki regenerowały tkankę embriogeną (*Picea mariana* w 10–100% i *Picea glauca* w 60%). Zarodki bez suszenia, bezpośrednio zanurzone w ciekłym azocie nie kiełkowały (Bomal i Tremblay 2000). Podobne wyniki uzyskali Percy i in. (2001), którzy do kriokonserwacji wykorzystywali somatyczne zarodki świerka (*Picea glauca* × *engelmannii* complex) suszone roztworami soli (NaCl) o znanym potencjale wodnym. Częściowo wysuszone zarodki po rozmrożeniu z ciekłego azotu (bez zastosowania krioprotektantów) kiełkowały w 80%.

Na kriokonserwację somatycznych zarodków wpływa wiele czynników: genotyp, ich stan fizjologiczny, etap rozwoju, zawartość wody, sposób suszenia, metody zamrażania, przechowywania oraz temperatura i tempo ich rozmrażania (Florin i in. 1993 za Cyr 1999, Bajaj 1995). Przechowywanie w temperaturze ciekłego azotu podsuszanych somatycznych zarodków stanowi bardzo efektywną metodę, która dodatkowo nie wymaga stosowania krioprotektantów. Są to bowiem związki często toksyczne i niekorzystne dla metabolizmu komórek, np. najczęściej stosowany DMSO, w stężeniach 2–10% może wywoływać zmiany genetyczne (Finkle i in. 1985).

Przeprowadzone w IBL badania potwierdzają wyniki uzyskane przez cytowanych wcześniej autorów. Wynika z nich możliwość zarówno długoterminowego przechowywania podsuszanych somatycznych zarodków, jak i późniejsza ich regeneracja w siewki.

**Wniosek.** Przeprowadzone badania wskazują na możliwość wykorzystania kriokonserwacji kalusa embriogennego oraz podsuszanych somatycznych zarodków świerka pospolitego, jodły pospolitej i modrzewia europejskiego jako metody uzupełniającej w zachowaniu zasobów genowych drzew leśnych *ex situ*.

Praca została złożona 12.02.2007 r. i przyjęta przez Komitet Redakcyjny 6.09.2007 r.

## CRYOPRESERVATION OF CONIFEROUS TREES TISSUE CULTURES – THE ADDITIONAL METHOD OF FOREST TREES (EX SITU) GENE RESOURCES CONSERVATION

### Summary

The aim of this study was to apply the method of conifer tissue culture cryopreservation and to estimate the survival of stored plant material, after thawing from liquid nitrogen. Norway spruce, larch and silver fir embryogenic callus and somatic embryos were stored in liquid nitrogen (1h–2 days). Embryogenic callus was preconditioned in sorbitol or sucrose at 0.4 M concentration. DMSO (5%) as a cryoprotectant and controlled freezing (1°C per minute) to final temperature of –70°C were applied. Immediately after freezing the tubes were immersed in liquid nitrogen. The thawing process was conducted at 37°C, in water bath. Somatic embryos of spruce and larch were partly dried for 2–3 weeks and 2 days respectively, then directly immersed in liquid nitrogen. The efficiency of tissue regeneration after thawing was 66.7–100% for embryogenic callus of spruce, 50% for silver fir and 66.7–100% for larch. The capacity of somatic embryos germination after thawing was 60% for spruce and was up to 73% for larch. These results indicate the possible application of forest trees tissue cultures cryopreservation method for additional forest tree (*ex situ*) gene resources conservation.

(transl. K. Sz.)

## LITERATURA

- Adams G. W., Doiron M. G., Park Y. S., Bonga J. M., Charest P. J. 1994. Commercialization potential of somatic embryogenesis in black spruce tree improvement. *For. Chron.* 70. 5: 593–598.
- Atree S. M., Pomeroy M. K., Fowke L. C. 1992. Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance. *Planta*. 187: 395–404.
- Atree S. M., Pomeroy M. K., Fowke L. C. 1995. Development of white spruce (*Picea glauca* (Moench.) Voss) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmoticum, and their tolerance to drying and frozen storage. *J. Exp. Bot.* 46: 433–439.
- Bajaj Y. P. S. 1995. Cryopreservation of somatic embryos. W: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed*. Springer-Verlag, New York. Bajaj Y. P. S. (Red.) Vol. 30. 221–229.
- Beardmore T., Charest P. 1995a. Black spruce somatic embryo germination and desiccation tolerance. I. Effects of abscisic acid, cold, and heat treatments on germinability of mature black spruce somatic embryo. *Can. J. Res.* 25: 1763–1772.
- Beardmore T., Charest P. 1995b. Black spruce somatic embryo germination and desiccation tolerance. II. Effect of an abscisic acid treatment on protein synthesis. *Can. J. Res.*, 25: 1773–1782.
- Becwar M. R., Nagmani R., Wann S. R. 1990. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Can. J. For. Res.*, 20: 810–817.
- Bercetche J., Galerne M., Dereuddre J. 1990. Efficient regeneration of plantlets from embryogenic callus of *Picea abies* (L.) Karst after freezing in liquid nitrogen. *C.R. Acad. Sci. Paris*. Vol., 30. 310. III. 357–363.
- Bercetche J., Paques M. 1995. Somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*). W: *Somatic Embryogenesis in Woody Plants* (S. M. Jain, P. K. Gupta, R. J. Newton red.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 3: 221–242.
- Blakesley D., Pask N., Henshaw G. G., Fay M. F. 1996. Biotechnology and the conservation of forest genetic resources: *in vitro* strategies and cryopreservation. *Plant Growth Regul.*, 20. 1: 11–16.
- Bomal C., Tremblay F. M. 1999. Effect of desiccation to low moisture content on germination, synchronization of root emergence, and plantlet regeneration of black spruce somatic embryos. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.*, 56: 193–200.
- Bomal C., Tremblay F. M. 2000. Dried cryopreserved somatic embryos of two *Picea* species provide suitable material for direct plant regeneration and germplasm storage. *Ann. Bot.*, 86. (1): 177–183.
- Charest P. J., Klimaszewska K. 1995. Cryopreservation of germplasm of *Larix* and *Picea* species. [W:] *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed* (Y. P. S. Bajaj red.). Springer – Verlag. New York, 30: 191–203.
- Chmielarz P. 1998. Reakcja roślin na niskie temperatury. *Metody kriokonserwacji komórek i organów roślin w ciekłym azocie*. Instytut Dendrologii PAN. Wydawnictwo Z. Bartkowiak. Poznań.
- Cyr D. R. 1999. Cryopreservation of embryogenic cultures of conifers and its application to clonal forestry. [W:] *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. (S. M. Jain, P. K. Gupta, R. J. Newton red.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands, 4: 239–261.
- Cyr D. R. i Klimaszewska K. 2002. Conifer somatic embryogenesis: II. Applications. *Dendrobiology*, 48: 41–49.
- Cyr D. R., Lazaroff W. R., Grimes S. M. A., Quan G. Q., Bethune T. D., Dunstan D. I., Roberts D. R. 1994. Cryopreservation of interior spruce (*Picea engelmannii* complex) embryogenic cultures. *Plant Cell Rep.*, 13: 574–577.
- DeVerno L. L., Park Y. S., Bonga J. M., Barrett J. D. 1999. Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clones of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss). *Plant Cell Rep.*, 18: 948–953.

- Finkle B. J., Zavala M. E., Ulrich J. M. 1985. Cryoprotective compounds in the viable freezing of plant tissues. [W:] Cryopreservation of Plant Cells and Organs. (K. K. Kartha red.) New York. CRC Press, 75–113.
- Ford C. S., Jones N. B., Van Staden J. 2000. Cryopreservation and plant regeneration from somatic embryos of *Pinus patula*. Plant Cell Rep., 19: 610–615.
- Galerne M., Dereuddre J. 1987. Effect of sucrose and DMSO concentration on embryogenic callus of *Picea abies* after freezing at  $-196^{\circ}\text{C}$ . Ann. Afocel., 174: 7–31.
- Gupta P. K., Durzan D. J., Finkle B. J. 1987. Somatic polyembryogenesis in embryogenic cell masses of *Picea abies* (Norway spruce) and *Pinus taeda* (loblolly pine) after thawing from liquid nitrogen. Can. J. Forest. Res., 17: 1130–1134.
- Gupta P. K., Pullman G., Timmis R., Kreitinger M., Carlson W. C., Grob J., Welty E. 1993. Forestry in the 21<sup>st</sup> century. The biotechnology of somatic embryogenesis. Biotech., 11: 454–459.
- Hogberg K. A., Ekberg I., Norell L., Von Arnold S. 1998. Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programme: a case study with *Picea abies*. Can. J. For. Res., 28: 1536–1545.
- Haggman H. M., Ryyananen L., Aronen T. S., Krajnakova J. 1998. Cryopreservation of embryogenic cultures of Scots pine. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 54. (1): 45–53.
- Jorgensen J. 1990. Conservation of valuable gene resources by cryopresevation in some forest tree species. J. Plant Physiol., 136: 373–376.
- Kartha K. K., Fowke L. C., Leung N. L., Caswell K. L., Hakman I. 1988. Induction of somatic embryogenesis and plantlets from cryopreserved cell cultures of white spruce (*Picea glauca*). J. Plant. Physiol., 132: 529–539.
- Klimaszewska K., Ward C., Cheliak W. M. 1992. Cryopreservation and plant regeneration from embryogenic cultures of larch (*Larix x eurolepis*) and black spruce (*Picea mariana*). J. Exp. Bot., 43: 73–79.
- Laine E., Bade B., David A. 1992. Recovery of plants from cryopreserved embryogenic cell suspensions of *Pinus caribaea*. Plant Cell Rep., 11: 259–298.
- Matras J., Burzyński G., Czart J., Fonder W., Korczyk A., Puchniarski T., Tomczyk A., Załęski A. 1993. Program zachowania leśnych zasobów genowych i hodowli selekcyjnej drzew leśnych w Polsce na lata 1991–2010. DGLP, IBL. Warszawa.
- Norgaard J. V., Duran V., Johnsen O., Krogstrup P., Baldursson S. 1993. Variations in cryotolerance of embryogenic *Picea abies* cell lines and the association to genetic, morphological and physiological factors. Can. J. Res., 23: 2560–2567.
- Park Y. S., Barrett J. D., Bonga J. M. 1998. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones of white spruce (*Picea glauca*). In Vitro Cell. Develop. Bio. Plant., 34. (3): 231–239.
- Percy R. E. L., Klimaszewska K., Cyr D. R. 2000. Evaluation of somatic embryogenesis for clonal propagation of western white pine. Can. J. For. Res., 30: 1867–1876.
- Percy R. E. L., Livingston N. J., Moran J. A., Von Aderkas P. 2001. Desiccation, cryopreservation and water relations parameters of white spruce (*Picea glauca*) and interior spruce (*Picea glauca* × *engelmannii* complex) somatic embryos. Tree Physiol., 2: 1303–1310.
- Roberts D. R., Sutton B. C. S., Flinn B. S. 1990. Synchronous and high frequency germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity. Can. J. Bot., 68: 1086–1090.
- Roberts D. R., Lazarof W. R., Webster F. B. 1991. Interaction between maturation and high relative humidity treatments and their effects on germination of Sitka spruce somatic embryos. J. Plant. Physiol., 138: 1–6.
- Szczygieł 2003. Somatyczna embriogeneza świerka pospolitego (*Picea abies* Karst.), jodły pospolitej (*Abies alba* Mill.) oraz modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.). Praca doktorska. Biblioteka IBL, Sękocin Stary.
- Von Arnold S., Clapham D., Egertsdotter U., Mo L. H. 1996. Somatic embryogenesis in conifers – A case study of induction and development of somatic embryos in *Picea abies*. Plant Growth Regul., 20: 3–9.