

LASY Z PROBÓWKI. CZY TO MOŻLIWE?

Test-tube forests. Is it possible?

Teresa Hazubska-Przybył (Kórnik)

Streszczenie

Odkrycie zjawiska totipotencji komórek roślinnych niemal półtora wieku temu doprowadziło do rozwoju efektywnych technik mikrorozmnażania licznych gatunków roślin. Obecnie wiele z nich stosuje się na skalę przemysłową, głównie w hodowli roślin ozdobnych, warzywniczych i sadowniczych. W ostatnich dziesięcioleciach nastąpił również znaczący postęp w rozwoju technik rozmnażania gatunków drzew leśnych w kulturach *in vitro*. Szczególnego potencjału upatruje się w metodzie somatycznej embriogenezy, która od pewnego czasu jest włączana do leśnych programów hodowlanych w niektórych krajach świata. W obliczu nadmiernej eksploatacji lasów przez człowieka i w konsekwencji postępujących zmian klimatycznych, nowatorskie techniki mikrorozmnażania będą coraz powszechniej stosowane jako narzędzie wspierające produkcję drewna na plantacjach leśnych, opartych na rozmnażaniu klonalnym.

Abstract

The discovery of the phenomenon of plant cell totipotency, almost a century and a half ago, has led to the development of the effective techniques for the multiplication of numerous plant species. Currently, many of them are used on an industrial scale, mainly in the cultivation of ornamental, vegetable and fruit plants. In recent decades, there has been significant progress in the development of the techniques for propagation of forest tree species in *in vitro* cultures. Particular potential is seen in the method of somatic embryogenesis, which has been included in the forest breeding programs in some countries of the world for some time. In the face of the excessive human exploitation of forests and as a consequence of the progressing climate change, the innovative micropropagation techniques will be increasingly used as a tool supporting the production of wood in forest plantations based on the clonal reproduction.

Od totipotencji po techniki *in vitro*

Na przełomie XIX i XX wieku za sprawą austriackiego botanika Haberlandta zrodziła się idea „uprawy” roślin w sztucznych warunkach. Uczony ten jako pierwszy podjął próbę hodowli komórek i tkanek roślinnych w sztucznych warunkach na pożywece, w oparciu o teorię totipotencji. Teorię tę wysnuli już w I połowie XIX wieku trzej niemieccy przyrodnicy: Schleiden, Schwann i Virchow. Zakładała ona, że komórki roślinne mają szczególną właściwość, polegającą na nieograniczonej zdolności dzielenia się i odtwarzania określonych organów, a nawet całego organizmu. Ostatecznie koncepcja totipotencji roślin została potwierdzona dopiero po 125 latach od jej

ogłoszenia, kiedy to w sztucznych warunkach uzyskano pierwsze kompletne rośliny z komórek marchwi i tytoniu [10]. Od tego czasu nastąpił intensywny rozwój badań nad mikrorozmnażaniem różnych gatunków roślin i dzisiaj dysponujemy już szeroką gamą metod, które stosowane są na skalę komercyjną. Kultury *in vitro* zostały wykorzystane przede wszystkim w masowej produkcji roślin ozdobnych, warzywniczych i sadowniczych. U drzew pierwszy sukces w zakresie mikrorozmnażania odniesiono w 1970 roku dla osiki (*Populus tremula*), kiedy to pierwsza kompletna roślina wyrosła w sztucznych warunkach z liścia [11]. Pozytywne wyniki skłoniły uczonych na całym świecie do podjęcia zaawansowanych badań nad możliwością rozmnażania różnych gatunków

drzew leśnych w oparciu o technologię kultur *in vitro*. Celem jakim im przeświecał w dalszej perspektywie było wdrożenie tego ważnego narzędzia biotechnologicznego do gospodarki leśnej.

Co warunkuje sukces mikrorozmnażania?

Wieloletnie badania prowadzone na różnych gatunkach roślin wykazały, że ich rozmnażanie w sztucznych warunkach to bardzo skomplikowane przedsięwzięcie. Powodzenie metody *in vitro* jest ściśle powiązane z bardzo licznymi czynnikami, decydującymi o odpowiedzi roślin na zadane im bodźce. Kluczowe jest przede wszystkim zapewnienie optymalnych fizyko-chemicznych warunków kultury, które muszą być odpowiednio dostosowane do wymagań konkretnego gatunku, odmiany czy wręcz klonu rośliny. Prawidłowy wzrost roślin w kulturze *in vitro* zależy od jakości, natężenia i obecności lub braku światła, od poziomu wilgotności powietrza w sterylnych naczyniach hodowlanych oraz od temperatury otoczenia. Kolejnym, bardzo ważnym czynnikiem jest rodzaj i skład pożywek (sztucznych podłoży), który zmienia się w zależności od etapu rozwoju roślin. Pożywki skomponowane są z makro- i mikroelementów, witamin, aminokwasów, węglowodanów i regulatorów wzrostu, podanych w ściśle określonych dawkach. Kultury drzew leśnych najczęściej utrzymywane są na pożywce MS, B5, NN, GD lub WPM [2]. W czasie trwania tego typu hodowli rozwijające się rośliny stopniowo zużywają składniki zawarte w podłożu. W związku z tym konieczne jest cykliczne przenoszenie materiału roślinnego na świeże pożywki. Wymiana pożywek odbywa się dość często, co 2 do 6 tygodni, w zależności od gatunku. Efekty mikrorozmnażania roślin uzależnione są w znacznej mierze od zastosowania odpowiednich regulatorów wzrostu i rozwoju do pożywek. W kulturach *in vitro* najważniejszą rolę pełnią związki należące do grupy auksyn i cytokinin. Związki z grupy auksyn wykorzystywane są przykładowo do ukorzeniania mikropędów i do zapoczątkowania rozwoju zarodków w kulturze *in vitro*. Z kolei związki z grupy cytokinin stosowane są do pobudzenia regeneracji i zwiększenia liczby pędów produkowanych z pąków. Ważnym regulatorem wzrostu i rozwoju w hodowli drzew gatunków iglastych jest także kwas abscysynowy, regulujący proces rozwoju zarodków wegetatywnych.

Skuteczność metody mikrorozmnażania różnych gatunków drzew leśnych jest na ogół ściśle skorelowana z genotypem, stanem fizjologicznym fragmentu tkanki pobieranej do założenia kultury oraz ogólną kondycją rośliny matecznej. W przypadku drzew

czynniki te mają szczególne znaczenie. Drzewa w przeciwieństwie do roślin zielnych trudniej jest rozmnożyć w sztucznych warunkach, chociażby z tego względu, że ich tkanki są starsze i zainfekowane w większym stopniu patogenami (grzyby, bakterie, wirusy). Jednakże mimo tych ograniczeń wieloletnie badania podejmowane przez naukowców na całym świecie zaowocowały opracowaniem efektywnych protokołów mikrorozmnażania niektórych gatunków drzew leśnych, umożliwiając tym samym ich zastosowanie na szerszą skalę. Przykładowo w latach 90. ubiegłego wieku w Indyjskim Instytucie Nauki w Bangalore (Indie) uzyskano obiecujące wyniki dla niektórych gatunków o znaczeniu ekonomicznym. Opracowane procedury mikrorozmnażania sandałowca białego (*Santalum album*), kostrzyczyny szerokolistnej (*Dalbergia latifolia*) oraz trzech gatunków z rodzaju eukaliptus (*Eucalyptus*) pozwoliły na przeniesienie roślin z warunków *in vitro* do gleby. Było to jednym z pierwszych sygnałów wskazujących na potencjalne możliwości zastosowania kultur *in vitro* drzew w celach komercyjnych [9]. Znaczące sukcesy, które odnosili naukowcy w poszczególnych ośrodkach badawczych w kolejnych latach, przyczyniły się do wzrostu zainteresowania technologią kultur *in vitro* i do włączenia jej jako obiecującej metody rozmnażania wegetatywnego do gospodarki leśnej w niektórych krajach świata.

Rozmnażanie wegetatywne w gospodarce leśnej

Lasy są jednym z najbardziej złożonych ekosystemów roślinnych na kuli ziemskiej. Ich powierzchnia obejmuje obecnie niemal 4 mld ha naszego globu, a na jednego mieszkańca Ziemi przypada średnio około 0,62 ha lasu. Niestety w ostatnich dziesięcioleciach powierzchnie lasów sukcesywnie zmniejszają się. Jedną z ważniejszych przyczyn jest rabunkowa eksploatacja zasobów leśnych przez człowieka. W konsekwencji dochodzi do znacznego zubożenia bądź utraty całych drzewostanów wraz z unikatowymi gatunkami flory i fauny. Co więcej, coraz bardziej widocznym i odczuwalnym rezultatem tej niepożądanego, ludzkiej działalności są poważne zmiany klimatyczne, rejestrowane w dzisiejszej dobie w różnych regionach świata. Sytuację tę mogą po części zrekomensować działania podejmowane w niektórych krajach przez sektor leśnictwa w ramach tzw. zrównoważonej wielofunkcyjnej gospodarki leśnej, które zakładają oparcie znacznej części produkcji surowca drzewnego na plantacjach leśnych przy zastosowaniu rozmnażania wegetatywnego (*clonal forest plantations*). W tym miejscu należy uświadomić

sobie, że rozmnażanie wegetatywne jest bardzo korzystne w kontekście rentowności plantacji leśnych. Pozwala ono bowiem skuteczniej w porównaniu z rozmnażaniem generatywnym zachować pożądane cechy hodowlane u potomstwa oraz ułatwia szybkie wprowadzenie do praktyki leśnej wyników selekcji drzew. Podczas gdy potomstwo na drodze generatywnej uzyskuje się po kilkudziesięciu latach, sadzonki wegetatywne można wyprodukować w ciągu 1–2 lat, w zależności od zastosowanej metody. Plantacje leśne wspierane przez uprawę sklonowanych, ściśle wyselekcjonowanych osobników wartościowych drzew umożliwiają wygenerowanie znacznego zysku genetycznego i produkcję wyrównanego fenotypowo materiału roślinnego. Są one bowiem zakładane na bazie tego samego materiału rodzicielskiego i składają się z drzew identycznych genetycznie, czyli cechują się dużą jednolitością [14]. Plantacje oparte na rozmnażaniu klonalnym funkcjonują w USA, Nowej Zelandii, Australii, Brazylii i Chinach. Rozmnażanie klonalne odgrywa ważną rolę zarówno w zachowaniu zasobów genowych, jak i mnożeniu rzadkich i zagrożonych gatunków drzew leśnych. Zysk ekonomiczny płynący z kontrolowanych plantacji jest ściśle powiązany z identyfikacją osobników o pożądanych dla gospodarki leśnej cechach wzrostowych i jakościowych oraz z wysoką wydajnością technik ich rozmnażania. Na przestrzeni dziesiątek lat propagacja drzew leśnych z użyciem rozmnażania wegetatywnego podlegała i nadal podlega ciągłemu doskonaleniu poprzez wprowadzanie nowych technik i koncepcji na różnych etapach tego procesu. Rozmnażanie klonalne staje się coraz bardziej rzeczywistością w światowej gospodarce leśnej, głównie dzięki wcześniejszym sukcesom odniesionym w ukorzenianiu sadzonek wegetatywnych, a w obecnej dobie w badaniach nad somatyczną embriogenezą.

Już w II połowie XX wieku koncepcja włączenia rozmnażania wegetatywnego jako narzędzia do zakładania produktywnych plantacji miała przyczynić się do głębokiej ewolucji systemów służących do mnożenia gatunków drzew leśnych. Zakładała ona propagowanie najbardziej wartościowych drzew oraz pozytywny wpływ klonowania na zwiększenie zasobów przemysłowych i jakości produktu. Na początku lat 70. XX zapowiedzią tego rozwoju było rozmnażanie gatunków drzew liściastych na drodze ukorzeniania zrzędów pędowych na skalę przemysłową [16]. W krajach o umiarkowanym klimacie satysfakcjonujące efekty uzyskano dla kilku przedstawicieli z rodzaju topola (*Populus*), wierzb (*Salix*) czy robinia (*Robinia*), natomiast w krajach o klimacie tropikalnym lub subtropikalnym – z rodzaju eukaliptus

(*Eucalyptus*). Te pozytywne rezultaty wynikały głównie z faktu, że drzewa liściaste odznaczają się doskonałą zdolnością do rozmnażania wegetatywnego oraz relatywnie krótką rotacją. Ukorzenianie zrzędów pędowych nie było jednak wystarczająco efektywne w przypadku wielu ważnych ekonomicznie gatunków drzew leśnych, a zwłaszcza tych, których surowiec stanowiłby doskonałe źródło energii i paliwa. Większość z tych problemów wynikała z przyspieszonych procesów dojrzewania uzyskanego materiału roślinnego, a w konsekwencji z szybkiej utraty jego predyspozycji do ukorzeniania. Bariery te dotyczyły przede wszystkim gatunków drzew iglastych, w przypadku których zrzędy do ukorzeniania mogły być pozyskiwane z sadzonek nie starszych niż 5-letnie [8]. Taki stan rzeczy w znacznym stopniu przyczyniał się do ograniczenia liczby roślin dostępnych do uprawy na plantacjach. W rezultacie ograniczenia związane z tradycyjnymi metodami mnożenia wegetatywnego wymusiły konieczność poszukiwania alternatywnych metod klonowania gatunków drzew w celach komercyjnych.

Alternatywne metody rozmnażania wegetatywnego wspomagają gospodarkę leśną

Na początku lat 90. XX wieku w Brazylii opracowano technikę rozmnażania drzew z mikrosadzonek. Źródłem materiału wegetatywnego były niedojrzałe lub odmłodzone w kontrolowanych warunkach rośliny, z których pobierano końcówki pędów i ukorzeniano je w szklarni, przy zapewnieniu odpowiedniej dla rozwoju temperatury i wilgotności powietrza. Warunkiem niezbędnym w tej technice była obecność wierzchołka wzrostu, który gwarantował rozwój dobrej jakości systemu korzeniowego. Mikropniaki po zbiorze pędów szybko regenerowały nowy materiał, który można było zbierać cyklicznie w określonym odcinku czasu (co 20 dni latem i co 30 dni zimą) [7]. Tymczasem dynamiczny rozwój kultur *in vitro* drzew przyczynił się do powstania nowego, alternatywnego źródła sadzonek, zapewniając stały i cykliczny dostęp do materiału gotowego do ukorzeniania. Obecnie dwiema podstawowymi metodami, których efektem jest uzyskanie sadzonek drzew leśnych są: organogeneza i somatyczna embriogeneza. W kulturach *in vitro*, w warunkach sterylnych, rośliny potomne uzyskuje się z fragmentu rośliny, zredukowanego najczęściej do małego pąka, wycinka tkanki lub nawet pojedynczej komórki, zwanym eksplantatem. Eksplantant jest pobierany z osobnika matecznego, odkazany w odpowiednio dobranych roztworach dezynfekujących i umieszczany na pożywkach

uzupełnionych składnikami odżywczymi. W pierwszej z przytoczonych wyżej metod mikrorozmnażania nowe rośliny tworzą się bezpośrednio na eksplantacie (organogeneza bezpośrednia) bądź z centrów komórek merystematycznych obecnych w kalusie, którego obecność poprzedza tworzenie organów roślinnych (organogeneza pośrednia). W laboratorium produkcyjnym potencjalnie z jednego wyłożonego na odpowiednio dobraną pożywkę eksplantatu możliwe jest wyprodukowanie w ciągu roku nawet kilku milionów roślin potomnych, niezależnie od warunków klimatycznych i pogodowych (Ryc. 1). Dla potrzeb leśnictwa z wykorzystaniem organogenezy produkuje się przykładowo brzozę brodawkowatą (*Betula*

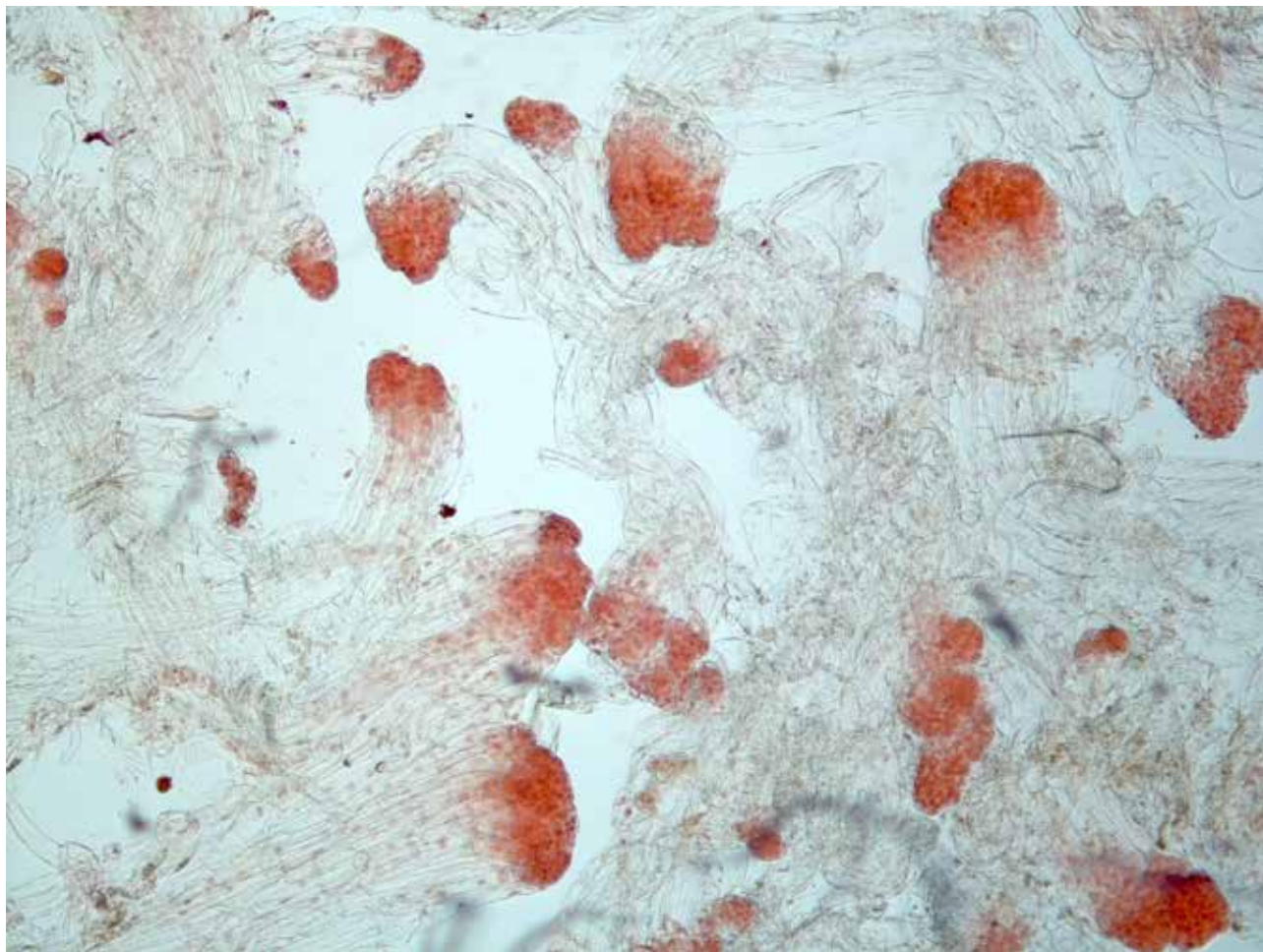
pendula), mieszańca topoli osiki i topoli osikowej (*Populus tremula* x *P. tremuloides*), robinie akacjową (*Robinia pseudoacacia*), czereśnię ptasią (*Prunus fruticosa*), świerk pospolity (*Picea abies*) i modrzew europejski (*Larix decidua*). Natomiast w ostatnim czasie w wielu krajach, włączając Polskę, metodą tą produkowane są też liczne sadzonki drzewa tlenowego Oxytree, czyli *Paulownia Clon in Vitro* 112, w celach komercyjnych. Klon ten został uzyskany w przez jedną z firm biotechnologicznych w Hiszpanii i obecnie stosowany jest w hodowli plantacyjnej zoriantowanej na produkcję biomasy oraz bioetanolu. Technika organogenezy jest szeroko stosowana w bankach genów celem zabezpieczenia rezerw genetycznych



Ryc. 1. Liczne pędy wegetatywne topoli szarej (*Populus x canescens*), uzyskane *in vitro* metodą organogenezy, namnażane na pożywce agarowej. Fot. Teresa Hazubska-Przybył.

np. dębu czy innych gatunków drzew produkujących nasiona typu *recalcitrant* (o dużej zawartości wody, wrażliwe na jej utratę). Stanowi również doskonały

wykazywać nieprawidłowy dalszy rozwój, dlatego tak niezwykle ważne jest zapewnienie im odpowiednich warunków w kulturze *in vitro*. W techni-



Ryc. 2. Prazarodki świerka pospolitego (*Picea abies*) widziane po wybarwieniu acetokarminem. Komórki merystematyczne zebrane w region embriogeny, z którego formułowany jest zarodek somatyczny (zabarwiony na czerwono) oraz wydłużone komórki wieszadełka (bezbarwne, z widocznymi jądrami komórkowymi). Fot. Teresa Hazubska-Przybył.

sposób zachowania *in vitro* gatunków rzadkich i ginących.

Znacznie wyższym potencjałem mnożenia cechuje się jednak druga wymieniona metoda mikrorozmnażania – metoda somatycznej embriogenezy, która ze względu na takie dodatkowe atuty, jak możliwość krioprzechowowania i transformacji genetycznych kultur oraz automatyzacji procesu, znalazła szczególne zainteresowanie w leśnictwie światowym, stając się metodą pożądaną w realizowanych programach hodowlanych. Stosując tę metodę rośliny potomne uzyskuje się z zarodków zaindukowanych z komórek somatycznych (wegetatywnych), z pominięciem procesu fuzji gamet. Powstałe zarodki somatyczne są podobne do zarodków zygotycznych; wykazują dwubiegunową budowę (wierzchołek pędu - korzeń) i takie same stadia rozwojowe [12]. Są one jednak pozbawione odżywczego bielma i w rezultacie mogą

ce somatycznej embriogenezy wyróżnia się dwie charakterystyczne fazy. Pierwsza z nich obejmuje tworzenie się i namnażanie niezorganizowanych agregatów komórkowych, zwanych masą proembryogeniczną (*PEM, proembryogenic mass*) lub tkanką embriogeniczną (*embryogenic tissue*). Mogą one być utrzymywane w kulturze przez długi czas w obecności auksyny, w ciemności. Faza ta nazywana jest cyklem auksynowym. W agregatach komórkowych powstają pierwsze stadia rozwojowe zarodków. U gatunków drzew iglastych są to charakterystyczne struktury, tzw. prazarodki (*proembryos*), składające się z regionu embriogenego uformowanego z komórek merystematycznych i komórek wieszadełka (Ryc. 2). Faza druga, która zachodzi na świetle po usunięciu z pożywki auksyny (i cytokininy), obejmuje tworzenie się z prazarodków poszczególnych stadiów rozwojowych zarodka od globularnego po

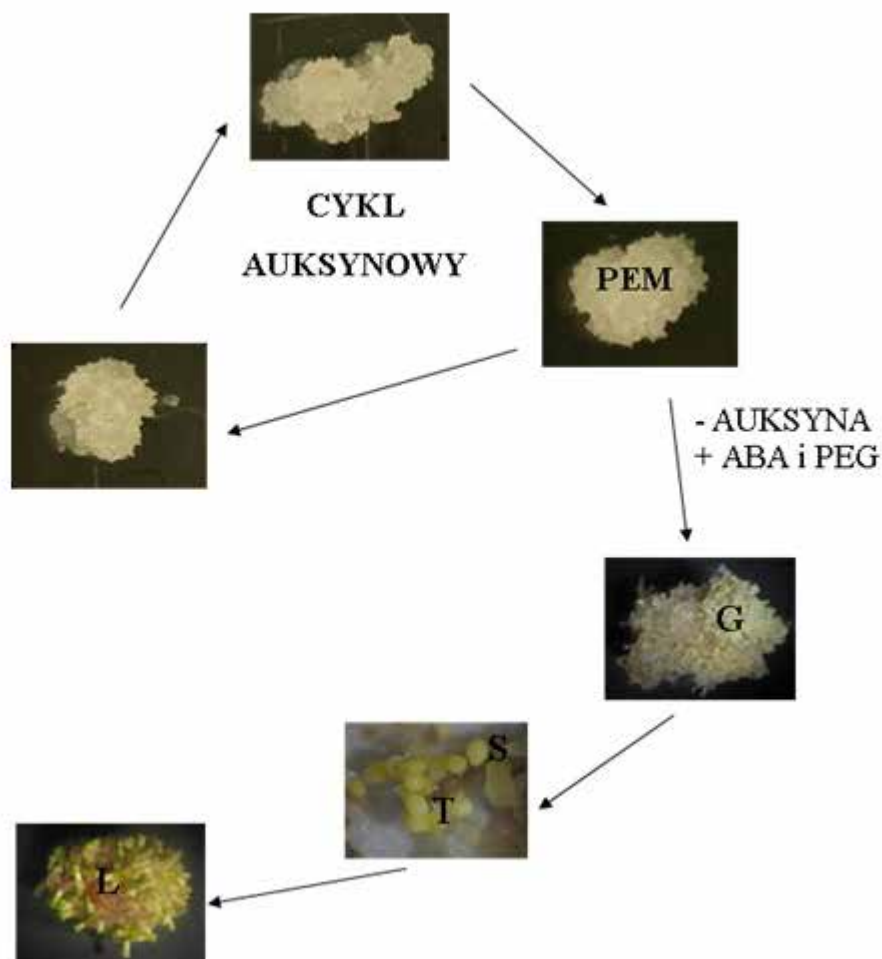


Ryc. 3. Somatyczny zarodek świerka pospolitego (*P. abies*) z wyraźnie wykształconymi liścieniami. Fot. Teresa Hazubska-Przybył.

liścieniowe (Ryc. 3). Zarodki somatyczne gatunków drzew iglastych wymagają do pełnego rozwoju obecności kwasu abscysynowego (*ABA*) oraz podwyższonego ciśnienia osmotycznego pożywki (poprzez dodanie zwiększonego stężenia sacharozy i glikolu polietylenowego *PEG*). Wzrost i różnicowanie somatycznych zarodków u gatunków drzew iglastych przedstawia Ryc. 4. Po osiągnięciu stadium liścieniowego zarodki przechodzą etap kiełkowania i ulegają konwersji w somatyczną roślinę (*somatic emblings*). Mikrosadzonki uzyskane w wyniku somatycznej embriogenezy są znacznie silniejsze niż mikropędy regenerujące na drodze organogenezy i nie wymagają ukorzeniania, co znacznej mierze ułatwia adaptację roślin somatycznych do warunków naturalnych. Od końca ubiegłego wieku wykazano możliwość mnożenia na drodze somatycznej embriogenezy zarówno gatunków drzew liściastych (z rodzaju *Eucalyptus*, *Quercus*), jak i iglastych (z rodzaju *Pinus*, *Picea*, *Abies*, *Larix*). Dla kilku gatunków drzew leśnych metoda ta przynosi obecnie na tyle dobre rezultaty, że mogłaby być wdrożona na skalę przemysłową [5].

Somatyczna embriogeneza źródłem dodatkowych korzyści dla hodowli lasów

W obliczu zachodzących dzisiaj zmian klimatycznych leśnictwo zmuszone będzie stawić czoła nowym zagrożeniom ekologicznym, które będą wpływały na rozmieszczenie drzew. Niezbędne wówczas będzie zwiększenie ochrony zasobów genowych, co będzie się wiązało z wykorzystaniem możliwości tkwiących w krioprezechowywaniu, czyli deponowaniu materiału roślinnego w ultraniskiej temperaturze ciekłego azotu (-196°C). Krioprezechowywanie jest bardzo ważną metodą, wspierającą mikrorozmnażanie drzew z wykorzystaniem potencjału somatycznej embriogenezy. Tkanki embriogenne uzyskane w wyniku somatycznej embriogenezy mogą zmieniać się w czasie lub mogą zostać utracone po kilku miesiącach przenoszenia na świeże pożywki. Ich przechowywanie *in vitro* obarczone jest ryzykiem zmian somaklonalnych i utratą materiału na skutek kontaminacji. Jednakże wypracowane procedury krioprezechowywania dają możliwość zabezpieczenia wyselekcjonowanych wartościowych genotypów, zarówno w formie



Ryc. 4. Wzrost i różnicowanie w kulturach tkankowych gatunków drzew iglastych; tkanka embriogenna namnażana w obecności auksyny (i cytokininy), powstają z niej prazarodki, które po usunięciu auksyny i dodaniu kwasu abscysynowego (ABA) i glikolu polietylenowego (PEG), przechodzą dalszy rozwój: PEM – masa proembriogenna, G – stadium globularne zarodka, S – stadium sercowate zarodka, T – stadium torpedy, L – dojrzały zarodek w stadium liścieniowym. Fot. Teresa Hazubska-Przybył.

tkanek embriogennych, jak i somatycznych zarodków, nawet przez wiele lat. Strategia ta umożliwia bezpieczne zachowanie materiału hodowlanego w bankach genów podczas badań potomstwa w testach polowych. W ciekłym azocie możliwe jest też deponowanie genotypów łatwych do transformacji genetycznej lub genetycznie zmodyfikowanych drzew. Fakt ten nie pozostaje obojętny dla gospodarki leśnej w perspektywie możliwości uzyskania ulepszonych materiałów do realizacji przyszłych programów hodowlanych. Dla drzew GMO, ze względów prawnych, bezpieczne przechowywanie przez dłuższy czas w bankach genów może być jedyną opcją. Technika somatycznej embriogenezy jest doskonałym narzędziem biotechnologicznym, które w leśnictwie może być stosowane do tworzenia drzew transgeniczných, czyli drzew

o zmienionych genomach. Dzięki tej technice możliwe jest uzyskanie osobników o pożądanych, korzystnych dla leśnictwa cechach jakościowych. Tym bardziej, że generalnie istotą klonowania drzew leśnych jest polepszenie ich jakości poprzez identyfikację niewielkiej liczby osobników o zestawie cech najbardziej pożądanych dla hodowli leśnej. Należą do nich m.in.: forma drzewa, jakość i produkcja drewna, zdolność wzrostu, tolerancja na różne trudne warunki środowiskowe oraz podatność na rozmnażanie wegetatywne [13]. Transformacje genetyczne w znacznej mierze ułatwiają osiągnięcie tego celu. Geny kodujące określone cechy, np. odporności na patogeny grzybowe, szkodniki owadzie czy herbicydy, integrują się z DNA gospodarza i powstają w ten sposób drzewa GMO łatwiejsze w uprawie plantacyjnej.

Obecnie najczęściej modyfikowanym gatunkiem drzewa w warunkach laboratoryjnych jest topola, która posiada najprostszą budowę DNA i łatwo regeneruje się *in vitro*. Z kolei gatunki drzew iglastych, takie jak np. sosna czy świerk, posiadają bardziej skomplikowany genom, w związku z czym trudniej jest uzyskać odmiany transgeniczne w przypadku tych drzew. Niemniej jednak dla takich gatunków jak: *Picea glauca*, *Pinus radiata*, *Abies nordmanniana*, *Castanea sativa*, *Quercus robur* wykazano pozytywne wyniki transformacji genetycznej, wykorzystując do tego celu kultury embriogenne bądź somatyczne zarodki [3]. Mimo sukcesów obecnie prace nad transgenicznymi drzewami leśnymi są na etapie doświadczalnym i nie będą szybko wprowadzane do praktyki leśnej. Testowanie uzyskanych roślin transgenicznych w warunkach polowych wymaga specjalnych zezwoleń, wydawanych przez rządy krajowe. I choć testy tego typu prowadzone są na całym świecie, jak dotąd komercyjne plantacje transgenicznych drzew nie zostały założone. Wyjątkiem są Chiny, gdzie komercyjnie uprawiane są transgeniczne topole odporne na owady. Jednakże z punktu widzenia gospodarki leśnej badania nad transgenicznymi drzewami wydają się uzasadnione ze względu na perspektywę zysku ekonomicznego po ich wprowadzeniu do upraw plantacyjnych. Oszacowano, że jeszcze do niedawna około 1/3 przemysłowej produkcji drewna okrągłego pochodziło z plantacji leśnych. Prognozuje się, że do 2050 roku produkcja ta wzrośnie do 75%. Aby była ona opłacalna, wymagana jest bardzo dobra jakość materiału, którą z pewnością można uzyskać włączając do hodowli leśnej technologię kultur *in vitro* (zwłaszcza metodę somatycznej embriogenezy) i genetycznie ulepszone sadzonki. Opłacalność produkcji roślin tą drogą można zwiększyć sięgając po nowatorskie osiągnięcia techniczne. Przykładem jest automatyzacja procesu mikrorozmnażania drzew poprzez zastosowanie do produkcji somatycznych zarodków tzw. bioreaktorów, czyli naczyń z pożywkami płynnymi, które są cyklicznie mieszane i dobrze napowietrzane (Ryc. 5). Badania podejmowane w ostatnim dziesięcioleciu przez różne ośrodki naukowe dla gatunków drzew leśnych wskazują na pozytywny wpływ tego rozwiązania, zarówno w aspekcie poprawienia liczby i jakości produkowanych zarodków, jak i obniżenia kosztów pracy laboratoryjnej. Dowodem są chociażby wyniki doświadczeń hiszpańskich naukowców z Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia w Santiago de Compostella, które wykazały, że zastosowanie systemu tymczasowego zanurzenia hodowli w pożywkach płynnych (TIS, *temporary immersion system*) pozwoliło na zwiększenie

produktywności somatycznych zarodków dębu szypułkowego (*Quercus robur*) do 85 000/m² w porównaniu z tradycyjnie prowadzoną hodowlą, gdzie wydajność ta wynosiła 12 000/m² [6]. Zastosowanie tego systemu prowadzenia hodowli przyczyniło się w znaczący sposób do zwiększenia nie tylko poziomu synchronizacji rozwoju zarodków, ale także do poprawienia liczby prawidłowo rozwiniętych zarodków liścieniowych, co finalnie przekładało się na znaczne obniżenie tak kosztów robocizny, jak i kosztów produkcji siewek. W przypadku gatunków drzew iglastych opracowanie metody produkcji somatycznych siewek z wykorzystaniem bioreaktorów wymaga jeszcze poszukiwań takich rozwiązań technicznych, które uwzględniałyby specyfikę wymagań procesu somatycznej embriogenezy u tej grupy roślin [15]. Obniżenie kosztów produkcji somatycznych siewek gatunków drzew leśnych jest obecnie największą przeszkodą uniemożliwiającą włączenie tej technologii do programów hodowlanych. Będzie to niemożliwe tak długo, jak długo koszty produkcji roślin somatycznych będą znacznie przewyższać koszty produkcji roślin bazującej na tradycyjnych metodach mnożenia wegetatywnego [11].

Somatyczna embriogeneza w światowym leśnictwie

Rozwój techniki somatycznej embriogenezy wraz z postępem technologicznym pozwolił na założenie plantacji opartych na klonowaniu wybranych gatunków drzew iglastych z rodzaju *Pinus* i *Picea* w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie, Nowej Zelandii czy Australii [4]. Już ponad ćwierć wieku temu w kanadyjskiej prowincji New Brunswick utworzono pierwsze plantacje sosny wejmutki (*Pinus strobus*), sosny Banksa (*Pinus banksiana*), świerka białego (*Picea glauca*) i czarnego (*Picea mariana*) [8]. W latach dwutysięcznych w Stanach Zjednoczonych firma komercyjna CellFor Inc. (obecnie Arborgen) produkowała somatyczne sadzonki sosny taeda (*Pinus taeda*). Działania te są nadal podejmowane, ponieważ w ostatnich latach firma JDI, zajmująca się produkcją sadzonek drzew leśnych, wykazywała zainteresowanie produkcją sadzonek wegetatywnych z wykorzystaniem technologii opartej na somatycznej embriogenezie [1]. W Nowej Zelandii w celu obniżenia kosztów produkcji ukorzeniania zrzesów pędowych niektóre organizacje wykorzystują do tego celu somatyczne sadzonki, z których pozyskuje się pędy [5]. W niektórych krajach europejskich (Szwecja, Francja, Finlandia, Dania czy Hiszpania) podejmowane są działania zmierzające ku obniżeniu kosztów produkcji somatycznych sadzonek gatunków drzew

leśnych do poziomu pozwalającego na wdrożenie somatycznej embriogenezy w europejskiej gospodarce leśnej [5]. Odpowiedź na pytanie, czy będzie możliwa masowa produkcja somatycznych sadzonek

drzew, tak by tworzyć z nich plantacje leśne, które zaspokajałyby w znacznej mierze rosnący w dzisiejszym świecie popyt na surowiec drzewny, pozostaje już tylko kwestią czasu.



Ryc. 5. System służący do automatyzacji produkcji roślin w kulturze *in vitro* na przykładzie bioreaktora 'RITA'. Fot. Teresa Hazubska-Przybył.

Bibliografia

1. Adams GW, Kunze HA, McCartney A, Millican S, Park YS. (2016). An industrial perspective on the use of advanced reforestation stock technologies. In: Vegetative Propagation of Forest Trees (Eds. Y.S. Park, J.M. Bonga & H.K. Moon). National Institute of Forest Science, pp. 323–334.
2. Hauke M., Wesoły W. (2010). Mikrorozmnażanie drzew leśnych. W: Elementy genetyki i hodowli selekcyjnej drzew leśnych. (Red.) Sabor J. CILP, Warszawa: 407–415.
3. Hazubska-Przybył T, Bojarczuk K. (2016). Tree somatic embryogenesis in science and forestry. Dendrobiology 76: 105–116.
4. Lane A. (2004). Attack of the clones: somatic embryogenesis in forestry. BioTech Journal 2: 13–17.
5. Lelu-Walter MA, Thompson D, Harvengt L, Sanchez L, Toribio M, Pâques LE. (2013). Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. Tree Genetics & Genomes 9: 883–899.
6. Mallón R, Covelo P, Vieitez AM. (2012). Improving secondary embryogenesis in *Quercus robur*: Application of temporary immersion for mass propagation. Trees – Structure and Function 26: 731–741.

7. Mushtaq T, Banyal R, Mugloo J, Mushtaq T, Aziz MA. (2017). Clonal forestry: An effective technique for increasing the productivity of plantations. *SKAUT Journal of Research* 19(1): 22–28.
8. Park YS. (2002). Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Annals of Forest Science* 59: 651–656.
9. Sita G.L. (1992). Forest Tree Tissue Culture: Current Status and Future Prospects. In: *Tissue Culture of Forest Tree Species: Recent Researches in India*. (Eds) Dhawan V, Ganapathy PM, Khurana DK. IDRC-TIFNET, New Dehli :18–30.
10. Skucińska B. (2001). Metoda kultury *in vitro*. W: *Biotechnologia roślin*. (Red.) Malepszy S.: 19–33.
11. South DB. (2009). Economics of clonal forestry: Vegetative propagation and deployment of varieties – the scope for Europe. *Treebreedex*, 21-23 April, Liverpool, England.
12. Szczygiał K. (2005). Somatyczna embriogeneza – alternatywny sposób uzyskania wyselekcjonowanego materiału sadzeniowego gatunków drzew iglastych. *Leśne Prace Badawcze* 3: 71–92.
13. Wagner CO, Miranda T, Xavier A. (2006). Clonal propagation of *Eucalyptus grandis* using the mini cutting and micro cutting techniques. *Scientia Forestalis* 71: 109–117.
14. White TL, Adams WT, Neale DB. (2007). *Forest Genetics*, CAB International, Oxfordshire, U.K.: 466–477.
15. Välimäki S, Paavilainen L, Tikkinen M, Salonen F, Varis S, Aronen T. (2020). Production of Norway spruce embryos in a temporary immersion systems (TIS). In *Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*.
16. Zobel B, Ikemora YK, Campinhos E. (1983). Clonal forestry: its impact on tree improvement and our future forests. *Journal of Silvicultura* 8: 226.