

EMBRIOGĒNO AUDU INICIĀCIJA PARASTAJAI EGLEI

M.Filipovičs, D.Auzenbaha, A.Gailis, LVMI „Silava”;

K. Szczygieł, Mežzinātnes institūts Varšavā

Kopsavilkums: Ilgtspējīgas mežsaimniecības attīstība nav iedomājama bez modernu augu fizioloģijas un bioķīmijas metožu pielietošanas dažādu problēmu risināšanā. Viena no šādām augu audu *in vitro* pavairošanas metodēm – salīdzinoši jauna, bet pēc daudzu zinātnieku domām augu biotehnoloģijas attīstībā perspektīva, - ir somatiskā embriogēnēze.

Parastās egles (*Picea abies* (L.) Krast) somatiskās embriogēnēzes inducēšanai tika izmantoti gan nobrieduši, gan nenobrieduši zigotiskie embriji. Nobriedušie embriji izdalīti no Polijā atlasītā sēklu audzē *Ustroń* ievāktām sēklām, bet nenobriedušie – no sēklu plantācijās *Stuposiany* un *Górny Sanok* ievāktām sēklām. Embriogēno kallusu veidoja 10,0–12,5% nobriedušo un 0–20,0% nenobriedušo zigotisko embriju eksplantu. Tika noteikti arī svarīgākie faktori, kas negatīvi ietekmēja rezultātus - nobriedušo zigotisko embriju ilgā uzglabāšana un nenobriedušo embriju vēlinā attīstības fāze.

Darbs veikts Polijas Mežzinātnes institūtā un ir daļa no pētījumiem, kas turpināsies LVMI „Silava” augu audu kultūru laboratorijā.

Nozīmīgākie vārdi: parastā egle, somatiskā embriogēnēze, *in vitro*, embriogēnais kalluss.

M. Filipovičs, D. Auzenbaha, A. Gailis, LFRI „Silava”, K. Szczygieł, FRI (Poland).
Norway spruce embryogenic tissue initiation.

Abstract: Development of sustainable forestry is impossible without modern methods of plant physiology and biochemistry to solve research requirements, propagation and related problems. Somatic embryogenesis is one of that kind of *in vitro* methods, which is quite new and intensively developed only last twenty years, but, in opinion of many scientists, has a big potential of development in plant biotechnology area.

To initiate somatic embryo culture of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Krast), two types of explants were used: immature zygotic embryos from seeds originated from seed orchards *Stuposiany* and *Górny Sanok* and mature zygotic embryos from seeds that were collected in selected seed stand Forest District *Ustroń* in Poland. Frequencies of embryogenic callus initiation was 10,0–12,5% for mature zygotic embryos and 0–20,0% for immature zygotic embryos. There were main factors determined, that negatively influenced results: late development stage of immature zygotic embryos and long storing time of mature zygotic embryos.

This work was realised in Forest Research Institute in Warsaw (Poland), Department of Genetic and Physiology of Woody Plants and will be continued in Latvian State Forest Research Institute „Silava”, plant tissue culture laboratory.

Key words: Norway spruce, somatic embryogenesis, *in vitro*, embryogenic callus.

М. Филипович, Д. Аузенбаха, А. Гайлис, ЛГИЛН „Силава”; К. Шигиель, Лесной институт (Польша). **Инициация культуры эмбрионных тканей простой ели.**

Резюме: Развитие лесоведения не возможно без использования современных методов физиологии и биохимии растений для решения различных проблем. Соматический эмбриогенез является одним из таких, сравнительно новых методов, который по мнению многих ученых в области биотехнологии является перспективным.

Для инициации культуры соматических эмбрионов простой ели (*Picea abies* (L.) Krast) использовались незрелые зиготические эмбрионы шишек, собранных в семенных плантациях *Stupsiany* и *Górny Sanok*, и зрелые зиготические эмбрионы из семян, собранных в отборных семенных лесонасаждениях *Ustroń* в Польше. Эмбрионный каллус из общего числа эксплантов образовали: 10,0–12,5% зрелых зиготических эмбрионов и 0–20,0% незрелых эмбрионов. Выявлены также основные факторы, негативно влияющие на результаты опыта: поздний этап развития незрелых и долгий период хранения зрелых эмбрионов.

Настоящая работа проводилась в Лесном институте Варшавы и является частью исследований, которые будут продолжены в лаборатории культуры тканей растений Латвийского государственного института Лесной науки «Силава».

Ievads

Somatiskā embriogēnēze ir perspektīva veģetatīvās pavairošanas metode, kurai salīdzinājumā ar ģeneratīvo un citiem veģetatīvās pavairošanas veidiem ir savas specifiskas priekšrocības. Somatiskās embriogēnēzes gaitā *in vitro* iegūst embriogēno kallusu un no tā somatiskajām (veģetatīvajām) šūnām veselus augus. Viena no metodes priekšrocībām ir augstais pavairošanas koeficients: no maza donora audu gabaliņa (eksplanta) iegūstami daudzi jauni, tam ģenētiski identiski, augi. Tāpat par priekšrocību uzskatāma arī pavairotā materiāla (embriogēnā kallusa vai somatisko embriju) kriosaglabāšanas iespēja.

Embriogēno audu (kallusa) iniciācija no eksplanta ir pirmais somatiskās embriogēnēzes pavairošanas etaps, bet nākamie etapi (fizioloģiskajā līmenī) ir: embriogēnā kallusa proliferācija, somatisko embriju nobriešana, embriju sakņu augšanas indukcija, jauno augu izstādīšana un aklimatizācija augšanai dabiskos apstākļos. Visi etapi ilgst no septiņiem mēnešiem līdz vienam gadam. Šī darba rezultāti atspoguļo tikai embriogēnā kallusa iniciācijas un proliferācijas etapus.

Pirmos rezultātīvos pētījumus par somatiskās embriogēnēzes lietošanu parastās egles pavairošanai publicēja Hakman et al. (1985) un Chalupa (1985). Šobrīd metode tiek pielietota ne tikai pētījumos, bet arī meža koku masveida pavairošanai (Szczygieł, 2005).

Materiāls un metodika

Par eksplantiem izmantoti nobrieduši un nenobrieduši zigotiskie embriji no parastās egles sēklām. Nenobriedušie embriji iegūti no sēklām, kas ievāktas 2006. gada augustā reģionālajā virsmežniecībā **Krosno** no sēklu plantācijām: *Stupsiany* (izveidota 1988.-1989.g.g.) un *Górny Sanok* (izveidota 1995.gadā). Čiekuri ar nobriedušām sēklām ievākti 2005. gadā no atlasītas sēklu audzes *Ustroń* virsmežniecībā **Wisła**, Polijā.

Nobriedušās sēklas 10 minūtes sterilizētas 36% ūdeņraža peroksīdā (H_2O_2), kam uz 100 ml šķīduma pievienots viens piliens virsmas aktīvās vielas *Tween 20*, pēc tam trīs reizes skalotas destilētā ūdenī. Pēc 12 un 48 stundu ekspozīcijas $4^{\circ}C$ (ledusskapī) no sēklām izdalīti nobriedušie zigotiskie embriji un pa desmit ievietoti *Petri* trauciņos ar barotni. Čiekuri ar nenobriedušajām sēklām un tajās esošajiem zigotiskajiem embrijiem 10–15 min. sterilizēti 96% etanolā, preparēti un eksplanti, tāpat kā nobriedušie zigotiskie embriji, ievietoti *Petri* trauciņos. Embriju atdalīšana no sēklām veikta, izmantojot stereo mikroskopu ar 2,4–4x palielinājumu.

Embriogēnā kallusa iniciācijai un pavairošanai izmantota *Gupta & Durzan 1986* barotne ar saharozi 30 g l^{-1} , fitohormoniem 2,4-D (2,4-dihlorfenoksietilskābi) 2 mg l^{-1} un BAP (6-benzilaminopurīnu) 1 mg l^{-1} , kā arī palielinātu kazeīna hidrolizāta daudzumu - 1000 mg l^{-1} . Lai panāktu nepieciešamo barotnes konsistenci, tai pievienots fitogels 4 g l^{-1} , pH $5,8 \pm 0,1$. Barotne autoklavēta 20 min. pie $121^{\circ}C$, vienas atmosfēras virsspiediena. Pēc tam laminārboksā caur bakterioloģisko filtru barotnei pievienots L-glutamīns (450 mg l^{-1}) un ieliets *Petri* trauciņos sacietēšanai.

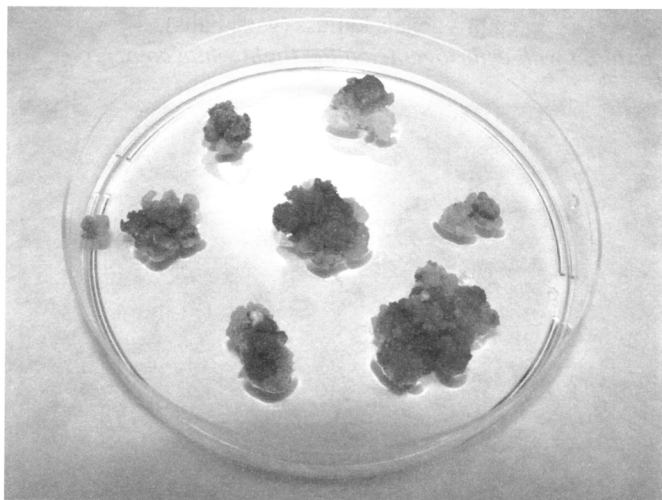
Pēc 4–6 nedēļu kultivēšanas eksplantus, kam bija attīstīties embriogēnais kalluss, pārvietoja tāda paša pamatsastāva pavairošanas barotnē kā iniciācijas barotnei, bet ar izmainītu saharozes (20 mg l^{-1}) un fitohormonu (2 mg l^{-1} 2,4-D un $0,5\text{ mg l}^{-1}$ BAP) daudzumu. Embriogēno kallusu ievietoja svaigā pavairošanas barotnē ik pēc divām nedēļām. Abos pavairošanas etapos eksplanti

un embriogēnais kalluss tika kultivēti tumsā klimatkamerā, 25 °C temperatūrā, relatīvais mitrums 70 %.

Lai pārbaudītu embriogēnā kallusa attīstību, kallusa paraugs tika iekrāsots ar acetokarmīnu (1 g izšķīdināts 45 % etiķskābē) un aplūkots stereomikroskopā 200x palielinājumā.

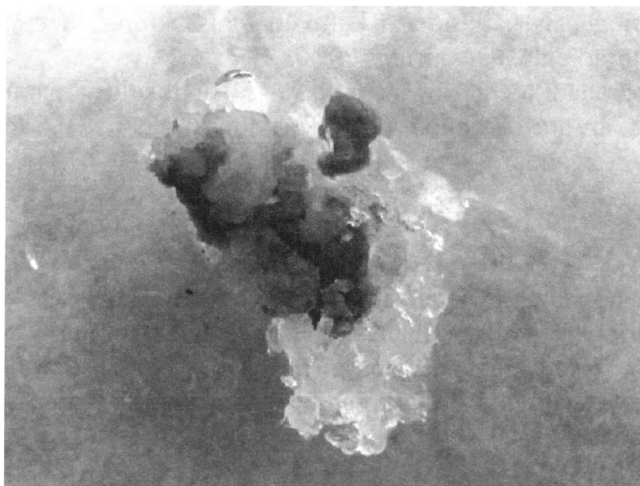
Rezultāti

Petri trauciņos ievietotos eksplantus regulāri novēroja (1.attēls) un embriogēnā kallusa daudzumu noteica pēc 4 un 6 nedēļām (2.attēls). Tika aprēķināta embriogēnā kallusa iniciācija no kopējā eksplantu skaita. Par eksplantiem izmantoja parastās egles nenobriedušus (nZE) un nobriedušus zigotiskos (ZE) embrijus (1.tabula).



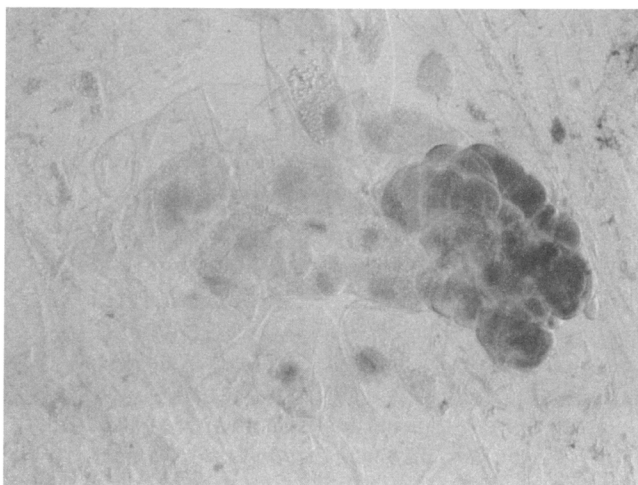
1. attēls. *Petri* trauciņš ar eksplantiem pēc 4 nedēļām.

Fig.1. Petri dish with explants after 4 weeks.



2. attēls. Astoņas nedēļas kultivēts eksplants, no kura attīstījies embriogēnais kalluss (gaiši balts).

Fig.2. Explant with embryogenic callus (light white color) after 8 weeks.



3. attēls. Somatiskais embrijs agrajā attīstības fāzē (200x palielināts).

Fig.3. Somatic embryo in early developmental stage (magnitude 200x).

Pēc 8 nedēļu kultivēšanas, mikroskopējot noteica, ka kalluss (3. attēls) atrodas agrajā embriogēnēzes attīstības stadijā, kurai raksturīga aktīva audu proliferācija (Von Arnold et al. 2002).

1. tabula, Table 1.

Embriogēnā kallusa iniciācija
*Frequency of embryogenic callus initiation from immature (nZE) and
 mature (ZE) zygotic embryos of Norway spruce*

Sēklu ieguves avots / koka numurs	Eksplanta tips	Iniciācijas datums	Eksplantu skaits	Embriogēnā kallusa iniciācija (%)	
				4. nedēļas	6. nedēļas
Sēklu plantācija <i>Górny Sanok/</i> 6062	nZE	18.08.2006.	40	2,50	2,50
Sēklu plantācija <i>Górny Sanok/</i> 6059	nZE		20	10,0	10,0
Sēklu plantācija <i>Stupsiany/</i> 4359	nZE	21.08.2006.	5	20,0	20,0
Sēklu plantācija <i>Górny Sanok/</i> 6075	nZE		28	3,57	3,57
Sēklu plantācija <i>Stupsiany/</i> 4193	nZE	22.08.2006.	27	0	0
Atlasīta sēklu audze <i>Ustroń</i>	ZE*	23.08.2006.	40	12,5	12,5
	ZE**		30	10,0	10,0

* - 12 stundu ekspozīcijas 4 °C (ledusskapī);

** - 48 stundu ekspozīcijas 4 °C (ledusskapī).

Diskusijas

Embriogēnā kallusa iniciācijas kvalitatīvā un kvantitatīvā attīstība ir atšķirīga, ko nosaka eksplanta genotips, zigotisko embriju iegūšanai preparēto sēklu ievākšanas laiks, to uzglabāšanas apstākļi, eksplantu (zigotisko embriju) attīstības pakāpe, *in vitro* kultivēšanas režīma nodrošināšana un ievērošana. **Von Arnold** (1987), strādājot ar egli, embriogēno kallusu ieguvis 50% gadījumu no kopējā *in vitro* ievadīto eksplantu – nobriedušu zigotisko embriju - skaita. **Gupta and Durzan** (1986) egles embriogēno kallusu ieguvuši 5–6% gadījumu, kā eksplantus izmantojot zigotiskos embrijus no 2 gadus uzglabātām sēklām. Savukārt **Mala** (1991) līdzīgā pētījumā embriogēno kallusu ieguvis 40–60% gadījumu, eksplantus izdalot no tikai sešus mēnešus uzglabātām sēklām. **Park et al.** (1998) veikuši detalizētu gēnu ekspresijas analīzi baltegles sēklu eksplantu embriogēnēzes sākuma etapos un secinājuši, ka eksplantu genotipa ietekme uz embriogēnā kallusa veidošanos vistiešāk izpaužas iniciācijas fāzē. Turpmākajos embriogēnēzes etapos genotipa ietekme būtiski samazinās. Sēklām pilnībā nogatavojoties, samazinās embriogēnā kallusa iniciācijas potenciāls (Park et al. 1998). Šie autori savā pētījumā visaugstāko embriogēnā kallusa iniciāciju (56 %) panākuši, par eksplantiem izmantojot nenobriedušus zigotiskos embrijus no svaigi ievāktām sēklām. Kad par eksplantiem izmantoti nogatavojušies embriji no ilgstoši uzglabātām sēklām, embriogēnā kallusa iniciācija bijusi tikai 16% no kopējā eksplantu skaita (Park et al. 1998). **K. Szczygieł** pētījumos ar nobriedušiem un nenobriedušiem embrijiem panākusi embriogēnā kallusa iniciāciju attiecīgi 31,4% un 23% līmenī (K Szczygieł, 2006).

Daudzi autori pētījumos izmantojuši nenobriedušus zigotiskos embrijus no pluskoku negatavu čiekuru sēklām. Bet šādu embriju izmantošana tikai procesu sarežģī, jo sēklu ar embrijiem vajadzīgajā attīstības fāzē iegūšanai čiekuri ievācamai atkārtoti. Taču vairākkārtēja negatavu čiekuru ievākšana ir dārga, to var kavēt nelabvēlīgi laika apstākļi. Tādēļ praksē ērtāk izmantot nobriedušas sēklas, kas ievāktas no sēklu plantācijām vai mežaudzēm un uzglabātas sēklu noliktavā.

Darba rezultāts – panāktā 10,0–12,5% embriogēnā kallusa iniciācija nobriedušiem zigotiskiem embrijiem - nav īpaši augsts rādītājs salīdzinājumā ar iepriekš minēto autoru veikumu, jo

izmantotie nobriedušie embriji bija iegūti no 10 mēnešus uzglabātām sēklām. Rezultātu negatīvi ietekmēja arī sēklu ievākšanas laiks – augusta otrā dekāde -, kad no tām atdalītie embriji atradās vēlīnā attīstības fāzē.

Literatūra

- Gupta P. K. and Durzan D. J. 1986. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis from subcultured callus of mature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 22: 685-688.
- Mala J. 1991. Organogenesis and somatic embryogenesis in spruce (*Picea abies* (L.) Krast.). *Comm. Inst. Forest Cech.* 17: 59-72.
- 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. *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant.* 34: 231-239.
- Szczygieł K. 2005. Somatyczna embriogeneza – alternatywny sposób uzyskania wyselekcjonowanego materiału sadzeniowego gatunków drzew iglastych. *Leśne Prace Badawcze.* 3: 71-92.
- Szczygieł K., Hazubska-Przybył T., Bojarczuk K. 2006. Somatic embryogenesis of selected coniferous tree species of genera *Picea*, *Abies* and *Larix*. *Acta Soc. Bot. Pol.*, in press.
- Von Arnolds S. 1987. Improved efficiency of somatic embryogenesis in mature embryos of *Picea abies* (L.) Krast. *J. Plant Physiol.* 128: 233-244.
- Von Arnolds S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J. And Filonova L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 69: 233-249.