

VYUŽITÍ SOMATICKÉ EMBRYOGENEZE
PRO REPRODUKCI CENNÝCH
GENOTYPŮ SMRKU ZTEPILÉHO
(*PICEA ABIES* (L.) KARST.)

LESNICKÝ PRŮVODCE



RNDr. JANA MALÁ, CSc.
RNDr. MILENA CVIKROVÁ
Ing. HELENA CVRČKOVÁ, Ph.D.
Ing. PAVLÍNA MÁCHOVÁ, Ph.D.

Certifikovaná metodika

6/2010

**VYUŽITÍ SOMATICKÉ EMBRYOGENEZE
PRO REPRODUKCI CENNÝCH GENOTYPŮ
SMRKU ZTEPILÉHO
(*PICEA ABIES* (L.) KARST.)**

Certifikovaná metodika

RNDr. Jana Malá, CSc.

RNDr. Milena Cvikrová

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Lesnický průvodce 6/2010

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.
Strnady 136, 252 02 Jíloviště
<http://www.vulhm.cz>

Odpovědný redaktor: Mgr. E. Krupičková
e-mail: krupickova@vulhm.cz

ISBN 978-80-7417-036-2
ISSN 0862-7657

SOMATIC EMBRYOGENESIS FOR REPRODUCTION OF VALUABLE GENOTYPES OF NORWAY SPRUCE (*PICEA ABIES* (L.) KARST.)

Abstract

This work presents methods for induction of somatic embryogenesis, maturation and conversion of somatic embryos. Due to hormones formed during somatic embryogenesis (asexual or adventive) induction, the bipolar embryos with growth apices and roots foundations differentiate from somatic cells of primary explant. There are no biochemical and morphological differences between somatic and zygotic embryos. For induction of somatic embryogenesis the medium E (GUPTA, DURZAN 1986) was used supported by BAP 0.5 mg.l⁻¹, kinetin 0.5 mg.l⁻¹, 2,4-D 1.0 mg.l⁻¹, putrescin 0.1 mg.l⁻¹. For somatic embryos maturation, 8.0 mg.l⁻¹ of ABA are necessary. After desiccation, the somatic embryos germinated in perlite. After acclimatization, the plantlets are planted into peat substrate.

Key words: somatic embryogenesis, Norway spruce, putrescin, micropropagation

Recenzenti: Ing. Lada Krnáčová
Ing. Josef Cafourek, Ph.D.

Adresa autorů:

RNDr. Jana Malá, CSc., Ing. Helena Cvrčková, Ph.D., Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.

Strnady 136, 252 02 Jíloviště

e-mail: mala@vulhm.cz; cvrckova@vulhm.cz; machova@vulhm.cz

RNDr. Milena Cvikrová

Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.

Rozvojová 263, 165 02 Lysolaje – Dejvice

e-mail: cvikrova@ueb.cas.cz

Obsah

CÍL METODIKY	7
ÚVOD	7
VLASTNÍ POPIS METODIKY	8
Standardní metodické postupy mikropropagace	8
1. Indukce embryogenních procesů v rostlinném pletivu	8
2. Indukce proliferace, diferenciaci a maturace embryonálních pletiv	9
3. Konverze somatického embrya v kompletní rostlinu	10
SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPU	11
POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	11
DEDIKACE	12
LITERATURA	12
Seznam použité související literatury	12
Seznam publikací, které předcházely metodice	14
SUMMARY	15

CÍL METODIKY

Cílem metodiky je využití somatické embryogeneze pro zachování a efektivní reprodukci cenných genotypů smrku ztepilého.

ÚVOD

Smrk ztepilý je hospodářsky i svým rozšířením nejvýznamnější dřevinou v České republice. U původních populací, které se u nás zachovaly, rozlišujeme 3 ekotypy: vysokohorský (8. LVS), horský (5. – 7. LVS) a chlumní (2. – 4. LVS). Reprodukce těchto vzácných populací je velmi obtížná vzhledem ke stáří stromů a prodlužujícím se intervalům kvetení. U jehličnanů obecně, a zejména pak u smrku, lze k reprodukci a konzervaci žádaných genotypů využít klonové množení, asexuální indukci embryí ze somatických buněk, neboli somatickou embryogenezi.

Somatická embryogeneze se definuje jako řada vzájemně provázaných procesů, při nichž se ze somatických buněk diferencují embryonální buňky vytvářející somatické embryo. Vývoj somatického a zygotického embrya je totožný a vzniklá somatická embryo se svými biochemickými a morfologickými vlastnostmi neodlišují od embryí vzniklých zygoticky (D'AMATO 1985, QUIROZ-FIGUEROA et al. 2006). Somatická embryo se přímo vytváří pod indukčním vlivem rostlinných hormonů přímo z jedné nebo více haploidních i diploidních somatických buněk generativních orgánů (nucelus, synergidní buňky) a somatických orgánů (listy). Nepřímo vznikají z nediferencovaných buněk embryogenního pletiva, z buněčných suspenzí, nebo protoplastových kultur.

První práce o somatické embryogenezi u lesních dřevin, které charakterizovaly růst, metabolismus a morfogenezi suspenzních buněčných kultur, kalusu a tzv. embryoidů (polarizovaných struktur připomínajících embryo) vyšly již v 70. letech minulého století, např. KONAR, OBEROI (1965), BANERJEE, RADFORTH (1969).

U smrku ztepilého je somatická embryogeneze popisována již od poloviny 80. let minulého století (HAKMAN et al. 1985, CHALUPA 1985, MO et al. 1989, MALÁ 1991). K indukci somatické embryogeneze v *in vitro* podmínkách se obvykle používají vysoké dávky fytohormonů, k navození konverze v kompletní rostlinu pak hlavně kyselina abscisová a proces desikace somatických embryí. Donedávna byla překážkou širší aplikace somatické embryogeneze nízká frekvence maturace a konver-

ze somatických embryí (ATTREE, FOWKE 1993). Díky intenzivnímu studiu vlivu exogenních a endogenních rostlinných hormonů (zejména auxinů a cytokininů) na diferenciaci a maturaci embryonálních pletiv v různých stádiích vývoje somatických embryí se podařilo metodu somatické embryogeneze standardizovat a optimalizovat tak, že se dá výhodně využít pro regeneraci konifer.

Uvedená standardizovaná metodika nově popisuje vliv diaminu putrescinu na zefektivnění procesu somatické embryogeneze.

VLASTNÍ POPIS METODIKY

Standardní metodické postupy mikropropagace

Proces somatické embryogeneze lze principiálně rozdělit do tří stádií podle vývoje a diferenciacie embryonálních pletiv:

- indukce embryogenních procesů v rostlinném pletivu
- indukce proliferace, diferenciacie a maturace embryonálních pletiv
- konverze somatického embrya v kompletní rostlinu

1. Indukce embryogenních procesů v rostlinném pletivu

Jako výchozí rostlinný materiál pro indukci embryogeneze lze použít zralá i nezralá extirpovaná zygotická embrya. Výtěžnost (počet získaných embryogenních linií) je vyšší, pokud se použijí pro založení embryogenních linií nezralá zygotická embrya. Doba sběru závisí i na klimatickém průběhu roku, nejvhodnější období je od poloviny července do poloviny srpna (CHALUPA 1985). Před zpracováním lze zdrojový materiál (nezralé šišky) uchovávat při 4 °C. Vyluštěná nezralá semena se sterilizují v 1% roztoku NaClO (Savo, Bochemie, a. s., ČR). Extirpovaná zygotická embrya se umístí na modifikované médium E s obsahem makroelementů, mikroelementů a vitamínů podle GUPTY a DURZANA (1986), viz tabulka 1. Živné médium je kompleťováno kasein hydrolyzátem v koncentraci 400 mg.l⁻¹, sacharózou v koncentraci 20 g.l⁻¹, fytohormony a diaminem o doporučených dávkách:

BAP (6-benzylaminopurin) 0,5 mg.l⁻¹

kinetin 0,5 mg.l⁻¹

2,4-D (2,4-dichlorfenoxyoctvá kyselina) 1,0 mg.l⁻¹

putrescin 1,5 g.l⁻¹

Pro zpevnění se do média přidává gelrit 2 g.l⁻¹ (Sigma – Aldrich), pH média se upravuje na 5,8. Živná média se sterilizují autoklávováním při 120 °C a tlaku 150 kPa po dobu 20 minut. Kultivace má probíhat v klimatizovaných podmínkách ve tmě, při teplotě 22 °C. Odvozené rostoucí embryogenní linie se evidují a pasážují každé 4 týdny na čerstvé médium stejného složení za účelem namnožení embryogenních kultur.

2. Indukce proliferace, diferenciaci a maturace embryonálních pletiv

Za účelem navození diferenciaci směřující k maturaci, tj. získání zralých somatických embryí, se embryogenní kultury přenášejí na maturační médium E (stejně složení jako iniciační médium, viz tab. 1), ve kterém se cytokininy a auxin nahrazují

Tab. 1: Složení modifikovaného živného média E (GUPTA, DURZAN 1982)

Médium E	mg l⁻¹
KNO ₃	2 340
NH ₄ NO ₃	225
CaCl ₂ .2H ₂ O	220
MgSO ₄ .7H ₂ O	185
KH ₂ PO ₄	85
Na ₂ EDTA	18,6
FeSO ₄ .7H ₂ O	13,9
H ₃ BO ₃	3,1
MnSO ₄ .H ₂ O	11,2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4,3
KJ	0,4
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,1
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,01
Myo - Inositol	1 000
Thiamin	1,0
Pyridoxin	0,5
Nicotinic acid	0,5
Glycin	2,0
L - glutamin	400

kyselinou abscisovou v koncentraci 8 mg.l^{-1} a pro stabilizaci osmotických poměrů se přidává 20 g.l^{-1} polyetylen glykolu. Roztok kyseliny abscisové je třeba vysterilizovat filtrací přes membránový filtr $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ (např. Anotop 10 Plus, Whatman) a přidat k médiu až po jeho sterilizaci autoklávováním. Embryogenní kultury se udržují ve stejných podmínkách (ve tmě) jako při předchozích fázích somatické embryogeneze (viz 1.). Po 14 dnech se doporučuje přesadit embryogenní masu na čerstvé médium stejného složení. Za 5 – 6 týdnů se kultury přesadí na stejné E médium, ve kterém se kyselina abscisová nahrazuje $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ kyselinou indolyl-3-máselnou (viz obr.). Kultivace v této fázi probíhá při 16hodinové fotoperodě, s osvětlením o intenzitě $30 \text{ }\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a při teplotě $24 \text{ }^\circ\text{C}$.

3. Konverze somatického embrya v kompletní rostlinu

Embryogenní kultury s vyvinutými somatickými embryi ve stadiu torpéda se kultivují 10 dní ve tmě a při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Následně se somatická embrya oddělí od embryogenního suspenzorového pletiva a přemístí do otevřených Petriho misek na filtrační papír navlhčený sterilní destilovanou vodou a vloží do exsikátoru. Veškerou manipulaci s embryi je nutné provádět ve sterilních boxech. Exsikátory se



Obr. Somatická embrya po kultivaci na maturačním médiu

umístí do klimatizované místnosti (22 °C a 16hodinová fotoperioda). Desikace probíhá 10 dní v přítomnosti nasyceného roztoku hydrofosforečnanu sodného (95% relativní vlhkost). Pro vyklíčení se embrya přemístí do vysterilizovaného jemného perlitu navlhčeného roztokem média E (poloviční koncentrace) s koncentrací IBA 0,1 mg.l⁻¹ a koncentrací sacharózy 30 g.l⁻¹. Vyklíčená embrya se přesazují do rašelinového substrátu k dopěstování.

SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPU

Novost postupu spočívá v aplikaci optimalizované somatické embryogeneze, která pro zvýšení účinnosti reprodukce smrku ztepilého využívá diamin putrescin. Jde o nízkomolekulární polykation, který se účastní regulačních pochodů v průběhu buněčné diferenciaci, morfogeneze a při konverzi somatických embryí (MINOCHA et al. 1999, MINOCHA et al. 2004, SILVEIRA et al. 2004).

POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Somatická (asexuální, adventivní) embryogeneze je velmi perspektivní metoda pro klonové množení jehličnanů využitelná i pro genetické manipulace. Umožňuje jednak uchování a reprodukci cenných genotypů původních populací jehličnatých lesních dřevin, jednak ji lze využít ve šlechtění. Lesní dřeviny, pro něž je charakteristická dlouhověkost, se vyznačují pozdním nástupem plodnosti, což je hlavní důvod, proč jsou klasické metody šlechtění pomalé. Pro urychlení šlechtitelských postupů se v podstatě jako jediná možnost nabízí využití metod genetického inženýrství. Získání vhodných genotypů geneticky modifikovaných dřevin by v blízké budoucnosti mohlo výrazně přispět především ke snížení zátěže životního prostředí. Geneticky ustavená rezistence vůči mikrobiálním patogenům, hmyzům a dalším škůdcům by podstatně omezila aplikaci pesticidů a insekticidů, které se zařazují do potravních řetězců, a tak negativně ovlivňují rovnováhu biocenózy. Navíc se předpokládá, že v příštích desetiletích silně vzroste poptávka po lesních dřevinách, a to nejen pro potřeby průmyslu (výroba papíru a celulózy, výroba nábytku, apod.), ale i pro ekologické požadavky (znovuzalesňování a pro přelesňování současných monokultur). Nadějně je rovněž využití genetických manipulací pro úpravy morfologie stromů a jejich částí, změny dormance (MCAFFEE et al. 1993, TUOMINEN et al. 1995, FLADUNG et al. 1997) a zvýšení kvality dřevní hmoty (pro

přehled WHETTEN et al. 1998, DWIVEDI et al. 1994, FEUILLET et al. 1995, MACKAY et al. 1997). Genetické inženýrství rovněž umožňuje získat vysoké počty vyšlechtěných, rychle rostoucích stromů se zkrácenou vegetační dobou a s vysokým stupněm schopnosti přímo vázat vzdušný dusík a zlepšenými fytořediačními vlastnostmi (STOMP 1994). Očekává se rovněž vyšlechtění odrůd, které se budou vhodně přizpůsobovat extrémním změnám prostředí (včetně jeho znečištění) a dokonce podmínkám v jiných klimatických pásmech.

DEDIKACE

Vypracování metodiky bylo podporováno: výzkumnými projekty Národní agentury pro zemědělský výzkum MZe projekty č. QH 82303 a č. QH71290.

LITERATURA

Seznam použité související literatury

- ATTREE S. M., FOWKE L. C. 1993. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 35: 1-35.
- BANERJEE S. N., RADFORTH N. W. 1969. *In vitro* studies on the developing embryos of *Pinus resinosa*. *Bot. Mag. Tokyo*, 82: 329-340.
- D'AMATO F. 1985. Cytogenetics of Plant Cells Tissue Cultures and their Regenerates. *The CBC Critical Reviews in Plant Sciences, Lee.*, 3: 73-112.
- DWIVEDI U. N., CAMPBELL W. H., YU J., DATLA R. S., BUGOS R. C., CHIANG V. L., PODILA G. K. 1994. Modification of lignin biosynthesis in transgenic *Nicotiana* through expression of an antisense O-methyltransferase gene from *Populus*. *Plant Mol. Biol.*, 26: 61-71.
- FEUILLET C., LAUVERGEAT V., DESWARTE C., PILATE G., BOUDET A., GRIMA-PETTENATI J. 1995. Tissue- and cell-specific expression of a cinnamyl alcohol dehydrogenase promoter in transgenic poplar plants. *Plant Mol. Biol.*, 27/4: 651-667.

- FLADUNG M., GROSSMANN K., AHUJA M. R. 1997. Alterations in hormonal and developmental characteristics in transgenic *Populus* conditioned by the rolC gene from *Agrobacterium rhizogenes*. J. Plant Physiol., 150/4: 420-427.
- GUPTA P. K., DURZAN D. J. 1986. Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos. Bio/technology, 4: 643-645.
- HAKMAN I., FOWKE L. C., VON ARNOLD S., ERIKSSON T. 1985. The development of somatic embryos of *Picea abies* (Norway spruce). Plant Science, 38: 53-59.
- CHALUPA V. 1985. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies*/L./KARST. Comm. Inst. For. Czechoslovaca, 14: 65-90.
- KONAR R. N., OBEROI Y. P. 1965. *In vitro* development of embryoids on the cotyledons of *Biota orientalis*. Phytomorphology, 15: 137-140.
- MCALFEE B. J., WHITE E. E., PELCHER L. E., LAPP M. S. 1993. Root induction in pine (*Pinus*) and larch (*Larix*) spp. using *Agrobacterium rhizogenes*. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture, 34: 53-62.
- MACKEY J. J., O'MALLEY D. M., PRESNELL T., BOOKER F. L., CAMPBELL M. M., WHETTEN R. W., SEDEROFF R. R. 1997. Inheritance, gene expression, and lignin characterization in a mutant pine deficient in cinnamyl alcohol dehydrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94/15: 8255-8260.
- MALÁ J. 1991. Organogenesis and somatic embryogenesis in Norway spruce. Comm. Inst. Forest. Czechoslov., 17: 23-27.
- MINOCHA R., SMITH D. R., REEVES C., STEELE K. D. MINOCHA S. C. 1999. Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. Physiologia Plantarum, 105: 155-164.
- MINOCHA R., MINOCHA S. C., LONG S. 2004. Polyamines and their biosynthetic enzymes during somatic embryo development in red spruce (*Picea rubens* SARG.). *In vitro* Cellular & Developmental Biology – Plant, 40: 572-580.
- MO L. H., VON ARNOLD S., LAGERCRANTZ U. 1989. Morphogenic and genetic stability in long-term embryogenic cultures and somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* /L./ KARST.). Plant Cell Reports, 8: 375 – 378.
- QUIROZ-FIGUEROA F. R., ROJAS-HERRERA R., GALAZ-AVALOS R. M., LOYOLA-VARGAS V. M. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell Tissue Organ Cult., 86: 285-301.
- SILVEIRA V., FLOH E. I. S., HANDRO W., GUERRA M. P. 2004. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular proteins, starch and

- polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76: 53-60.
- STOMP A. M. 1994. Genetic strategies for enhancing phytoremediation. *Ann. NY Acad. Sci.*, 721: 481-491.
- TUOMINEN H., SITBON F., JACOBSSON C., SANDGERG G., OLSSON O., SUNDBERG B. 1995. Altered growth and wood characteristics in transgenic hybrid aspen expressing *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA indolacetic acid – biosynthetic genes. *Plant Physiol*, 109: 1179-1189.
- WHETTEN R. W., MACKAY J. J., SEDEROFF R. R. 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.*, 49: 585-609.

Seznam publikací, které předcházely metodice

- MALÁ J. 1991. Organogenesis and somatic embryogenesis in Norway spruce. *Comm. Inst. For. Cechoslov.*, 17: 59-72.
- MALÁ J., DUJÍČKOVÁ M., KÁLAL J. 1995. The development of encapsulated somatic embryos of Norway Spruce (*Picea abies* /L./KARST.). *Comm. Inst. For. Bohemicae*, 18: 59-73.
- CVIKROVÁ M., MALÁ J., HRUBCOVÁ M., FORETOVÁ S. 2008. Induced changes in phenolic acids and stilbenes in embryonic cell cultures of Norway spruce by culture filtrate of *Ascocalyx abietina*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115/2: 57-62.
- MALÁ J., PAVINGEROVÁ H., CVRČKOVÁ H., BŘÍZA J., DOSTÁL J., ŠÍMA P. 2009. Tolerance of Norway spruce (*Picea abies* (L.) KARST.) embryogenic tissue to penicillin, carbapenem and aminoglycoside antibiotics. *Journal of Forest Science*, 55/4: 156-161.
- GEMPERLOVÁ L., FISHEROVÁ L., CVIKROVÁ M., MALÁ J., VONDRÁKOVÁ Z., MARTINCOVÁ O., VÁGNER M. 2009. Polyamine profiles and biosynthesis in somatic embryo development and comparison of germinating somatic and zygotic embryos of Norway spruce. *Tree Physiology*, 29/10: 1287-1298.
- MALÁ J., CVIKROVÁ M., MÁCHOVÁ P., MARTINCOVÁ O. 2009. Polyamines during somatic embryo development in Norway spruce (*Picea abies* (L.) KARST.). *Journal of Forest Science*, 55/2: 75-80.

SOMATIC EMBRYOGENESIS FOR REPRODUCTION

OF VALUABLE GENOTYPES OF NORWAY SPRUCE (*PICEA ABIES* (L.) KARST.)

Summary

Somatic embryogenesis represents a perspective method for reproduction of rare or bred plant genotypes. Process of somatic embryogenesis can be divided according to the development of embryonic tissues into three stages: induction of embryogenic processes in the plant tissues, induction of proliferation, differentiation and maturation of embryonic tissues, and conversion of somatic embryo into complete plant. For induction of embryonic lineages from immature zygotic embryos the medium E with BAP 6-benzylaminopurine 0.5 mg.l⁻¹, kinetin 0.5 mg.l⁻¹, 2,4-D (2,4-dichlorphenoxyacetic acid) 1.0 mg.l⁻¹, putrescine 1.5 g.l⁻¹ was approved (GUPTA, DURZAN 1986). Then the cultures are transferred onto maturation medium E with the same composition of ingredients but in which instead of cytokinins and auxin the abscisid acid - 8 mg.l⁻¹ - was used, and for osmotic stability the 20 g.l⁻¹ of polyethylenglycol was added. Embryogenic cultures with developed somatic embryos in torpedo stage are cultured 10 days at 4 °C in the dark. Desiccation could be proceeded for 10 days by means of saturated NaHPO₄ solution (95% of relative humidity). Desiccating vessels with cultures are placed into air-conditioned room (22 °C, 16h photoperiod). For germination, the embryos are transferred into sterilized fine perlite moistened by E medium diluted 1 : 2 by distilled water with IBA 0.1 mg . l⁻¹ and saccharose 30 g . l⁻¹. Germinated embryos could be transferred into peat substrate for further growing.

LESNICKÝ PRŮVODCE



Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v.v.i.
www.vulhm.cz