



**prof. dr hab.
Paweł Chmielarz**

Zajmuje się biologią nasion i hodowlą *in vitro* gatunków drzew leśnych, kriokonserwacją oraz ochroną *ex situ* roślin w bankach genów.

Jego badania przyczyniają się do opracowania metody klonowania pomnikowych, 800-letnich dębów z wykorzystaniem kultur *in vitro*.

pach@man.poznan.pl

GENETYCZNE KOPIE NAJSTARSZYCH POLSKICH DĘBÓW

Kopię genotypu rośliny macierzystej otrzymujemy, zwykle rozmnażając ją wegetatywnie. Dęby jednak nie rozmnażają się w ten sposób. Co zrobić, żeby zachować wielowiekowe genotypy pomnikowych dębów, które giną?

Paweł Chmielarz

Instytut Dendrologii PAN z siedzibą w Kórniku

Sędziwe dęby rosnące w Polsce dożywają około 800 lat. Niestety, z wiekiem nastaje ich kres. Na przykład dąb Napoleon, rosnący jeszcze niedawno w Lubuskiem, którego obwód mierzony na wysokości 1,3 m wynosił 1052 cm, obumarł w wyniku podpalenia w 2010 roku. O szybkim zamieraniu wiekowych dębów mogliśmy się przekonać, kiedy podczas realizacji pięcioletniego projektu badawczego nad możliwością sklonowania pomnikowych dębów (*Quercus robur* L.) z wykorzystaniem metody mikrorozmnazania pobieraliśmy materiał z drzew matecznych. W krótkim czasie trwania projektu lub tuż po jego zakończeniu kilka z tych wiekowych drzew zamarło. Na przykład pomnikowy dąb Chrobry z Nadleśnictwa Szprotawa, liczący około 800 lat, z którego materiał zebraliśmy w 2013 roku, padł ofiarą podpalaczy w następnym roku. Po podpaleniu żył jeszcze sześć lat, aż ostatecznie zamarł w 2020 roku. Inny, około 400-letni dąb Bolesław, rosnący w miejscowości Bagicz w gminie Ustronie Morskie, został powalony przez wicher w 2016 roku. W czerwcu 2019 roku został podpalony dąb Mieszko I, najstarszy z dębów w województwie mazowieckim, którego wiek szacowano na blisko 600 lat. Spośród trzech najstarszych dębów w Rogalińskim Parku Krajobrazowym – który posiada

największe skupisko wielowiekowych dębów szypułkowych w Europie, liczące łącznie około 1400 drzew – dąb Czech jest obecnie martwy, a w przypadku dębu Lech obserwujemy rozpadanie się głównego pnia.

Stare dęby są narażone w większym stopniu niż młodsze drzewa na akty wandalizmu. Jednak są też inne przyczyny powodujące zamieranie dębów. Są nimi zmiany klimatu, pogarszanie się stosunków wodnych, występowanie szkodników owadzych, grzybów patogennych, a także prowadzenie niewłaściwych prac konserwatorskich. Ponadto stare drzewa, ponieważ mają ogromną, rozłożystą koronę, spękany i pusty pień, a jednocześnie bardzo małą masę korzeni w stosunku do części nadziemnej – łatwo się przewracają.

Kopowanie genotypu

Pomnikowe dęby szypułkowe rosnące w Polsce posiadają wiele cennych cech związanych z odpornością na zmieniające się czynniki środowiskowe, ukształtowane przez setki lat. Ponadto dla lokalnych społeczności wiekowe drzewa są czymś więcej niż ważnym elementem krajobrazu. Pojawia się więc chęć ochrony tych drzew lub ich genów i pytanie, czy można wyhodować sadzonkę metodą wegetatywną, która pod względem genetycznym w całości posiadałaby genotyp identyczny z tym macierzystego drzewa. Jednocześnie ochrona genotypów pomnikowych dębów przez ich sklonowanie jest jedną z form zachowania różnorodności biologicznej.

Wegetatywne rozmnażanie, możliwe w przypadku wielu gatunków roślin ogrodniczych, a także drzew



KRZYSZTOF BORKOWSKI

leśnych, topoli czy wierzb, zapewnia zachowanie wszystkich cech (genotypu) rośliny matecznej. Nie jest jednak ono możliwe w przypadku dębów. Niestety, niezdrewniałe pędy tych roślin nie ukorzeniają się. Podobnie też się dzieje ze zdrewniałymi zrzecami, odkładami czy żywokołami dębowymi. Dodatkowo proces ukorzenia pędów dębów jest szczególnie nieskuteczny w przypadku wiekowych drzew, które badaliśmy. Z kolei uzyskanie sadzonki dębu przez szczepienie nie zapewnia uzyskania pełnej kopii drzewa matecznego, ponieważ w przypadku szczepień korzeni (podkładka) pochodzi z innej rośliny tego samego gatunku. Dlatego żeby uzyskać kopię całej rośliny, niezbędne było sięgnięcie po techniki mikronamnażania *in vitro*. W naszych badaniach chcieliśmy odpowiedzieć na pytanie, czy możliwe jest zapoczątkowanie kultur *in vitro* pędów około 800-letnich dębów, ich

utrzymanie przez namnażanie pędów w sterylnych słoikach, a następnie ukorzenie również w kulturach *in vitro*.

Mikronamnażania w szkle

Metoda hodowli tkanki roślinnej w sterylnych kulturach *in vitro* wykorzystuje zjawisko totipotencji komórek roślinnych, czyli predyspozycji pojedynczej komórki do odtworzenia nowej, kompletnej rośliny z pędem i korzeniem. Materiałem wyjściowym takiej hodowli, pobieranym z rośliny matecznej, czyli eksplantatem, może być fragment nasienia zawierający merystem wzrostu albo fragment liścia czy pędu z pąkiem. Żeby komórka nadała swojemu wzrostowi pożądaną kierunek, należy dostarczyć jej odpowiednich bodźców w postaci regulatorów wzrostu, cytokinin lub

auksyn, a także makro- i mikroelementów, witamin oraz cukru, który w normalnych warunkach jest produkowany w całości podczas fotosyntezy.

Ukierunkowanie wzrostu w kolejnych etapach hodowli *in vitro* to ukorzenianie ulistnionych pędów. Umieszcza się je na pożywce z dodatkiem regulatorów wzrostu w odpowiednich stężeniach, w obecności aktywnego węgla, na świetle i w temperaturze pokojowej. Ostatnim, trudnym etapem jest aklimatyzacja sadzonek z kultur *in vitro* do wzrostu w warunkach *ex vitro*.

Proces aklimatyzacji do warunków *ex vitro* powinien przebiegać stopniowo, ponieważ pęd i korzeń znajdują się w szoku związanym z nagłą zmianą dotychczasowego środowiska. Liście muszą „nauczyć się” zamykać i otwierać swoje aparaty szparkowe, a korzenie prawidłowo rozwijać w podłożu stałym. Dowiedziono, że w przypadku roślin hodowanych w warunkach *in vitro* aparaty szparkowe wykazują niezdolność do zamykania się. Podczas aklimatyzacji do warunków *ex vitro* dochodzi do nadmiernej transpiracji przez stale otwarte szparki delikatnej struktury liścia, wykształconej jeszcze w sterylnym słoiku. Ponadto zaobserwowano, że liście mają inny kształt u roślin wyhodowanych w kulturach tkankowych w porównaniu z okazami rosnącymi w szklarni. Ogólnie u roślin z kultur *in vitro* liście są cieńsze, mają słabo rozwiniętą warstwę miększu palisadowego, duże przestrzenie powietrzne w mezofilu oraz mniej wiązek przewodzących. Ponadto hodowla w kulturach *in vitro* zaburza syntezę substancji ochronnych (takich jak wosk), których intensywne wytwarzanie zachodzi dopiero podczas procesu aklimatyzacji. W jego trakcie ważnym aspektem jest zmiana strategii odżywiania z miksotroficznej (cukier jest pobierany z pożywki agarowej oraz wytwarzany podczas fotosyntezy) na autotroficzną, kiedy cukier pochodzi w całości z fotosyntezy.

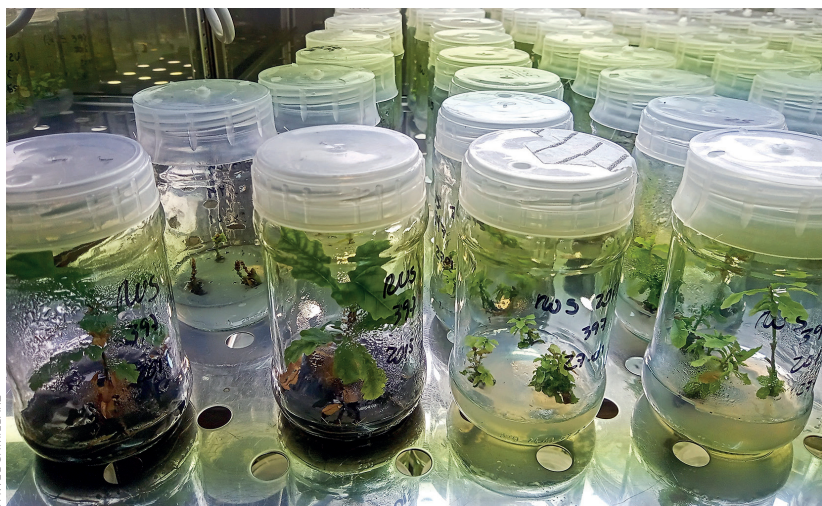
Wszystko to sprawia, że podczas aklimatyzacji roślina szybko musi wykształcić nowe liście lub li-

ście powstałe jeszcze w kulturach *in vitro* muszą zdążyć z przebudową struktury miększu tkanki, zanim nie ulegną wysuszeniu z powodu niewystarczającej warstwy wosku kutykuli komórek epidermy. Z kolei korzenie zmieniają środowisko z miękkiego agaru na twardą rzeczywistość stałego podłoża doniczki. Skuteczny proces aklimatyzacji musi przebiegać stopniowo przez odpowiednio długi czas, co pozwala mikrosadzonkom dostosować się do naturalnych warunków atmosferycznych i cofnąć zmiany spowodowane hodowlą w warunkach *in vitro*. Jest to niezwykle trudny okres w życiu roślin, ale jeśli jest on podzielony na etapy, podczas których wilgotność powietrza maleje stopniowo, podłoże i pojemniki są odpowiednio dobrane, a kondycja fizjologiczna roślin dobra, przeżywa około 80–90 proc. z nich.

Zachowanie najstarszych okazów

W naszych badaniach materiałem do zapoczątkowania najpierw hodowli wazonowej, a następnie kultur *in vitro* były zdrewniałe pędy dębu szypułkowego, które pozyskano z 21 najokazalszych i najstarszych dębów rosnących w Polsce o statusie drzew pomnikowych. Pierśnica drzew wynosiła od 470 do 1036 cm, a ich przybliżony wiek, określony na podstawie badań dendrochronologicznych, mieścił się w zakresie 300–800 lat. Wiek większości badanych drzew pomnikowych jest wartością przybliżoną do mniej więcej 50 lat. Zdrewniałe pędy umieszczono w hodowli wazonowej przy wysokiej wilgotności powietrza i w temperaturze 20 st. C. Przez cztery tygodnie z pąków podkorowych (śpiących) zdrewniałych pędów wyrastały pędy odrosłowe o długości od kilku do kilkunastu centymetrów (pierwszy etap odmłodzenia tkanki – rejuwenalizacja). To właśnie niewielkie fragmenty tych pędów, długości około 2 cm, zawierające jeden lub dwa pąki, posłużyły do zapoczątkowania hodowli *in vitro*. Zapoczątkowanie sterylnych kultur *in vitro* przed umieszczeniem eksplantatów na sterylnej pożywce agarowej wymaga eliminacji drobnoustrojów (zarodników grzybów, bakterii), znajdujących się na powierzchni lub we wnętrzu eksplantatów. W naszych badaniach zastosowano odpowiednio dobrane stężenie chlorku rtęci, po czym eksplantaty były płukane czterokrotnie w sterylnej wodzie. Wzrost pędów w warunkach *in vitro* z cyklicznymi pasażami pędów na świeżą pożywkę o tym samym składzie (drugi etap rejuwenalizacji) był możliwy dzięki zastosowaniu pożywki Woody Plant Medium (WPM), która jest mieszaniną związków chemicznych zawierających niezbędne makro- i mikroelementy, potrzebne roślinie do wzrostu. Do pożywki dodawano też witaminy, aminokwasy, cukier (jako źródło energii) oraz regulatory wzrostu, głównie 6-benzylaminopurynę (BAP). Indukcja wzrostu korzeni z odpowiednio wyrośniętych, ulistnionych pędów odbywała się na pożywce

Dęby w kulturach *in vitro*



z dodatkiem hormonów wzrostu, głównie auksyny i cytokininy, oraz węgla aktywnego. W przypadku dębu szypułkowego dobrze ukorzenione rośliny z hodowli *in vitro*, które osiągnęły wysokość około 8 cm i długość korzenia 10–15 cm, wysadzono do wysokich pojemników, prostując korzeń skreślony podczas wzrostu w słoiku, w odpowiednio przygotowane podłoże stałe. Sadzonki umieszczono w temperaturze zbliżonej do tej, która panowała w warunkach *in vitro*, czyli około 20 st. C, na świetle i w wysokiej wilgotności powietrza, którą następnie stopniowo redukowano.

W naszych badaniach obok głównego celu, sklonowania około 800-letnich dębów metodą *in vitro*, staraliśmy się odpowiedzieć na pytanie: od czego zależała przeżywalność pędów w pierwszym miesiącu hodowli *in vitro* oraz ich utrzymanie w kolejnych miesiącach? Czy był to wiek tych sędziwych dębów, czy w większym stopniu odpowiedź indywidualnego genotypu drzewa? Efekt badań był w pewnym stopniu zaskoczeniem, ponieważ pokazały one, że dla drzew w różnym wieku decydował genotyp matecznego drzewa. Przy czym i te najstarsze badane przez nas rośliny również wykazywały najwyższe predyspozycje do mikrorozmnażania. Stwierdziliśmy też, że nie wszystkie wiekowe dęby można było rozmnożyć z wykorzystaniem metody *in vitro*. Opracowana metoda pozwoliła jednak rozmnożyć (uzyskać kompletną sadzonkę z pędem i korzeniem) połowę z testowanych drzew pomnikowych.

Happy end

Klony pomnikowych dębów, które dobrze się namnażały i ukorzeniały w kulturach *in vitro*, tak że mogliśmy wyhodować kompletną sadzonkę jako dwumetrowej wielkości drzewka, posadzono przy drzewach matecznych lub w innych miejscach w Polsce, by zachować dla przyszłych pokoleń ich oryginalny genotyp, ukształtowany przed kilkuset laty.

I tak 12 kwietnia w 2019 roku posadzono pierwszy klon pomnikowego dębu, otrzymany metodą *in vitro*. Była to czteroletnia sadzonka jednego z dębów rogałińskich i jednego z najstarszych dębów w Polsce, liczącego około 800 lat, która znalazła swoje miejsce przy Muzeum Pałac w Rogalinie, dawnej siedzibie rodu Raczyńskich, a obecnie oddziale Muzeum Narodowego w Poznaniu. Następne drzewko – klon dębu Chrobry (dąb macierzysty jest już martwy) z genotypem ukształtowanym około 1 tys. lat temu, czyli blisko 1025 roku, kiedy odbyła się koronacja Bolesława Chrobrego – posadzono 7 października 2022 roku przy Muzeum Pierwszych Piastów na Lednicy niedaleko Gniezna.

Z kolei klony dębu Wybickiego, liczącego około 500 lat, który rośnie na terenie dawnej rodzinnej posiadłości Józefa Wybickiego w Będominie, miejscu urodzin w 1747 roku autora słów *Pieśni Legionów Polskich we Włoszech*, posadzono w kilku miejscach w Polsce.



PAMEŁ CHMIELARZ

Sadzonka z 800-letniego dębu Rus, sklonowana w kulturach *in vitro*

Najpierw dwa z nich w Będominie przy drzewie macierzystym, w 2019 i w 2020 roku. W Manieczkach, gdzie zmarł Józef Wybicki w 1822 roku – w 2022 roku. Rok później w Brodnicy, gdzie przez 100 lat, do 1923 roku, znajdował się grób Józefa Wybickiego, którego prochy przeniesiono potem do Krypty Zasłużonych Wielkopolan w kościele św. Wojciecha w Poznaniu. W 2022 roku klon dębu Wybickiego posadzono też przy Muzeum Ziemiaństwa w Dobrzycy, w zespole pałacowo-parkowym, dawnej posiadłości Augustyna Gorzeńskiego, przyjaciela Józefa Wybickiego. Kolejne duplikaty dębu Wybickiego posadzono w 2023 roku przy Muzeum Śremskim i przy Zespole Szkół Rolniczych w Grzybnie im. Józefa Wybickiego.

Dzięki zebranemu materiałowi oraz metodzie mikrorozmnażania klony pomnikowych dębów rosną też na terenie Instytutu Dendrologii Polskiej Akademii Nauk w Kórniku oraz w Arboretum Leśnego Banku Genów „Kostrzyca”. Autorzy projektu dziękują właścicielom obiektów, przy których mogli posadzić te dęby, będące nośnikami cennego dziedzictwa genetycznego. ■

Metodę mikrorozmnażania dębów opracowano w Instytucie Dendrologii Polskiej Akademii Nauk, badania finansowane ze środków Dyrekcji Generalnej Lasów Państwowych w Warszawie (numer projektu: EO-2717-4/13).

Chcesz wiedzieć więcej?

Chmielarz P., Kotlarski S., Kalemba E.M., Martins J.P.R., Michalak M., *Successful In Vitro Shoot Multiplication of Quercus robur L. Trees Aged up to 800 Years*, „Plants” 12/2023, doi: 10.3390/plants12122320

Kotlarski S., Michalak M., Chmielarz P., *Klonowanie najstarszych dębów pomnikowych rosnących w Polsce z wykorzystaniem metody in vitro*, „Rocznik Polskiego Towarzystwa Dendrologicznego” 2019.

Martins J.P.R., Wawrzyniak M.K., Kalemba E.M., Ley-López J.M., Mendes M.M., Chmielarz P., *Calcium silicate mitigates the physiological stress induced by 6-benzylaminopurine during the in vitro multiplication of Quercus robur*, „Industrial Crops and Products” 2023, doi: 10.1016/j.indcrop.2023.116377