

## INDUKOWANIE EMBRIOGENEZY SOMATYCZNEJ W KULTURACH *in vitro* GATUNKÓW RODZAJU *Trifolium* ORAZ ANALIZA MOLEKULARNA UZYSKANYCH REGENERANTÓW POKOLENIA R<sub>1</sub> Z WYKORZYSTANIEM MARKERÓW RAPD

Zbigniew Broda, Leokadia Torz, Katarzyna Florek

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin,  
Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu

### Wstęp

Rośliny z rodzaju *Trifolium* ze względu na naturalne współzycie z bakteriami brodawkowymi, które umożliwiają wiązanie azotu atmosferycznego oraz ich cenne właściwości paszowe, szczególnie dużą zawartość białka w częściach wegetatywnych stanowią cenny obiekt badań ukierunkowanych na dalsze ich doskonalenie. Dzięki zastosowaniu metod biotechnologicznych poszerza się zakres ich zmienności genetycznej, a także przeprowadza się genetyczne transformacje. Szczególnie przydatne w tych pracach są techniki kultur *in vitro* wykorzystujące zdolności komórek somatycznych do regeneracji płodnej rośliny. Prace z zakresu kultur *in vitro* w rodzaju *Trifolium* zapoczątkowane zostały przez GRAHAM [1968], który uzyskał u *Trifolium subterraneum* L., pierwszą tkankę kalusową. W następnych latach badania dotyczyły wpływu rodzaju zastosowanych eksplantatów, genotypu i składników pożywki na proces regeneracji. Stwierdzono m. in. [WEEB i in. 1987; MYERS i in. 1989], że proces regeneracji roślin w rodzaju *Trifolium* zachodzi głównie drogą organogenezy, natomiast rzadziej drogą embriogenezy somatycznej jak to obserwowano w gatunku *Trifolium fragiferum* L. [RYBCZYŃSKI 1991]. W przeprowadzonym doświadczeniu podjęto próbę indukcji somatycznej embriogenezy u 8 odmian koniczyny pochodzących z trzech gatunków *Trifolium pratense* L., *Trifolium incarnatum* L. i *Trifolium resupinatum* L.

Celem badań była ocena wpływu genotypu w gatunkach z rodzaju *Trifolium* na proces embriogenezy somatycznej oraz analiza molekularna otrzymanych klonów.

### Materiał i metody

Indukcję embriogenezy somatycznej w rodzaju *Trifolium* przeprowadzono u 8 odmian pochodzących z trzech gatunków: *Trifolium pratense* – odmiany: 'Hru-

szowska', 'Nike', 'Dajana', 'Jubilatka', 'Ulka', 'Karo'; *Trifolium resupinatum* – odmiana: 'Tra'; *Trifolium incarnatum* – odmiana 'Opolska'. Efektywność somatycznej embriogenezy oceniano dla dwóch rodzajów eksplantatów: liścieniach i hypokotylach, które pobierano z 5–6-cio dniowych siewek pozyskiwanych ze sterylnych hodowli prowadzonych na 0,8% agarze. Eksplantaty hodowano na trzech pożywkach zestalonych 0,8% agarem:

- pożywka indukująca kalusowanie (PCL-1), oparta na składzie podstawowym PHILLIPS, COLLINS [1979] z modyfikacjami wg RYBCZYŃSKIEGO [1991] zawierająca 2,4-D 2 mg·dm<sup>-3</sup>, 0,1 mg BAP·dm<sup>-3</sup>, picloramu 0,06 mg·dm<sup>-3</sup>, 2iP 2 mg·dm<sup>-3</sup>;
- pożywka różnicująca (PCL-2), zawierająca taki sam skład jak pożywka indukująca za wyjątkiem 2iP, który zastąpiono zeatyną 0,2 mg·dm<sup>-3</sup>;
- pożywka regeneracyjna MURASHIGE, SKOOG [1962].

Hodowlę eksplantatów prowadzono przez 20 tygodni w pokoju hodowlanym przy zmiennym fotoperiodzie 16/8 godz. o natężeniu 4500 lux oraz stałej temperaturze 26°C. W trakcie trwania kultury prowadzono obserwacje dotyczące udziału kalusujących eksplantatów, rodzaju i barwy kalusa oraz formujących się struktur morfologicznych.

W celu oceny podobieństwa i dystansu genetycznego pomiędzy odmianą kontrolną, a zregenerowanymi klonami posłużono się analizą molekularną wykorzystującą łańcuchową reakcję polimerazy PCR oraz markery RAPD oparte o polimorfizm DNA. Izolację DNA z tkanek młodych liści o powierzchni 2 mm<sup>2</sup> wykonano zmodyfikowaną metodą THOMPSON, HENRY [1995] z zastosowaniem buforu TPS. Amplifikacja DNA przebiegała wg następującego programu: denaturacja wstępna 94°C/60 s, następnie 10 cykli ( 94°C/5 s, 37°C/30 s, 72°C/30 s) oraz 35 cykli ( 94°C/5 s, 37°C/30 s, 72°C/60 s). Mieszanina reakcyjna o objętości 12,5 µl zawierała 10 ng genomowego DNA, 0,94 u Taq polimerazy z BSA (firma MBI Fermentas ), 1,25 pmol startera, 2 mmol dNTP, 1,25 µg BSA, 25 mmol MgCl<sub>2</sub>, 1 mol Tris HCl. Rozdział produktów amplifikacji następował w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem 10 µg bromku etydyny. Elektroforeza przebiegała w buforze TBE 1 x przy napięciu 100 V. Zastosowano 6 oligonukleotydowych starterów firmy Operon o następujących sekwencjach: OPF – 06 5' GGGAATTCGG 3'; OPF – 08 5' GGGATATCGG 3'; OPF – 10 5' GGAAGCTTGG 3'; OPF – 16 5' GGAGTACTGG 3'; OPG – 02 5' GGCCTGAGG 3'; OPI – 02 5' GGAGGAGAGG 3'. Analizę uzyskanych wyników przeprowadzono za pomocą programu UVIMAP v. 99. Podobieństwo genetyczne (GS) oceniano przy użyciu algorytmu NEI i LI [1979] obliczonego wg wzoru:  $GS_{ij} = 2n_{ij} / (n_i + n_j)$ , w którym „n<sub>i</sub>” oznacza liczbę prążków w „i” genotypie, „n<sub>j</sub>” to liczba prążków w „j” genotypie natomiast „n<sub>ij</sub>” określa liczbę prążków wspólnych dla badanych genotypów. Dystans genetyczny obliczono jako:  $D = 1 - GS_{ij}$ .

## Wyniki i dyskusja

Przeprowadzone obserwacje po 4 tygodniach hodowli na pożywce PCL-1 wykazały, że rozwój tkanki kalusowej zaindukowany został zarówno na eksplantatach liścieniowych jak i hypokotylowych u wszystkich badanych gatunków i

odmian rodzaju *Trifolium*. Najlepsze wyniki uzyskano u odmiany Nike z gatunku *Trifolium pratense*, której oba rodzaje eksplantatów kalusowały w wysokim procencie: liścienie w 100%, hypokotyle w 99%. Pozostałe odmiany wytwarzały kalus w granicach od 97% do 81% w przypadku eksplantatów liścieniowych oraz od 90% do 79% w odniesieniu do hypokotyli (tab. 1). Zaobserwowano również, że proliferujący kalus miał zróżnicowaną barwę od kremowej poprzez zieloną do brunatnej oraz niejednorodną konsystencję i strukturę. Z tego względu podzielono go na dwa typy: gładki – o szklistej miękkiej konsystencji, bez pofałdowań oraz ziarnisty – twardy, kruchy, silnie pofałdowany. Po 4 tygodniach hodowli na pożywce PCL-2 stwierdzono, że na eksplantatach liścieniowych wszystkich badanych odmian dominował kalus mieszany, tj. zarówno gładki jak i ziarnisty, 35,9% eksplantatów wytworzyło ten rodzaj tkanki. W przypadku eksplantatów hypokotyliowych przeważał typ kalusa ziarnistego, wytwarzało go ogółem 53,7% eksplantatów pochodzących z wszystkich badanych odmian (tab. 2).

Tabela 1; Table 1

Indukcja tkanki kalusowej z eksplantatów liścieniowych i hypokotyliowych na pożywce indukującej PCL-1

Induction of callus tissue from cotyledon and hypocotyl explants on induction medium PCL-1

Gatunek i odmiana Species and cultivars		Kalusujące eksplantaty (%) Callus from explants (%)	
		rodzaj eksplantatu; explant type	
		liścienie; cotyledons	hypokotyle; hypocotyls
<i>Trifolium pratense</i> L.	Hruszowska	92	91
	Dajana	88	97
	Karo	95	96
	Nike	100	99
	Jubilatka	86	77
	Ulka	83	77
<i>Trifolium resupinatum</i> L.	Ira	81	79
<i>Trifolium incarnatum</i> L.	Opolska	97	90

W trakcie trwania hodowli na pożywce PCL-2 prowadzono obserwacje dotyczące różnicowania się struktur morfologicznych w wykształconej tkance kalusa. Stwierdzono, że w 8 tygodniu na obu typach kalusa u wszystkich badanych odmian zaczęły formować się korzenie. Proces rizogenezy przebiegał z różną intensywnością. Zaobserwowano, że większą rizogenezę uzyskano z eksplantatów hypokotyliowych – 5,2%, natomiast w przypadku liścieni tylko u 4,3%. Wykształcone korzenie bardzo intensywnie rozrastały się pokrywając w końcowym etapie hodowli cały eksplantat.

Na pożywce różnicującej zaobserwowano również wykształcające się zarodki somatyczne (fot. 1, 2). Formowały się tylko u odmiany 'Opolska' z gatunku *Trifolium incarnatum* w kalusie typu ziarnistego o barwie kremowej z białym nalotem wykształconym zarówno z eksplantatów liścieniowych jak i hypokotyliowych. W ciągu całego cyklu hodowlanego trwającego 20 tygodni 33% eksplantatów odmiany 'Opolska' wykazywało zdolności do somatycznej embriogenezy. Lepsze wyniki

wykazywały eksplantaty liścieniowe w porównaniu z hypokotylowymi. W grupie eksplantatów liścieniowych 33 wykazywały zdolności embriogenne wytwarzając 665 zarodków somatycznych, natomiast w przypadku hypokotyli tylko 11, z których uzyskano 220 zarodków. Średnio z jednego embriogennego eksplantatu zarówno liściowego jak i hypokotylowego otrzymano 20 zarodków (rys. 1). Zarodki somatyczne w stadium torpedy po pasażu na pożywkę regeneracyjną (MS) rozwijały się w rośliny lub zamierały. Ogółem uzyskano 63 rośliny (57 z eksplantatów liścieniowych i 6 z hypokotyli), które po przesadzeniu do doniczek ze sterylną ziemią przenoszono do szklarni (fot. 3, 4). W końcowym efekcie zaaklimatyzowało się, rozwinęło i zakwitło tylko 11 roślin (8 pochodzących z eksplantatów liścieni i 3 z eksplantatów hypokotyli), (rys. 1).



Fot. 1; Photo 1



Fot. 2; Photo 2

Fot. 1, 2. Różnicujące się zarodki somatyczne w embriogennej tkance kalusowej pochodzenia liścieniowego u odm. Opolska z gatunku *Trifolium incarnatum* L.

Photo 1, 2. Differentiation of somatic embryos in embryogenic cotyledon callus of *Trifolium incarnatum* L., 'Opolska' cultivar



Fot. 3; Photo 3



Fot. 4; Photo 4

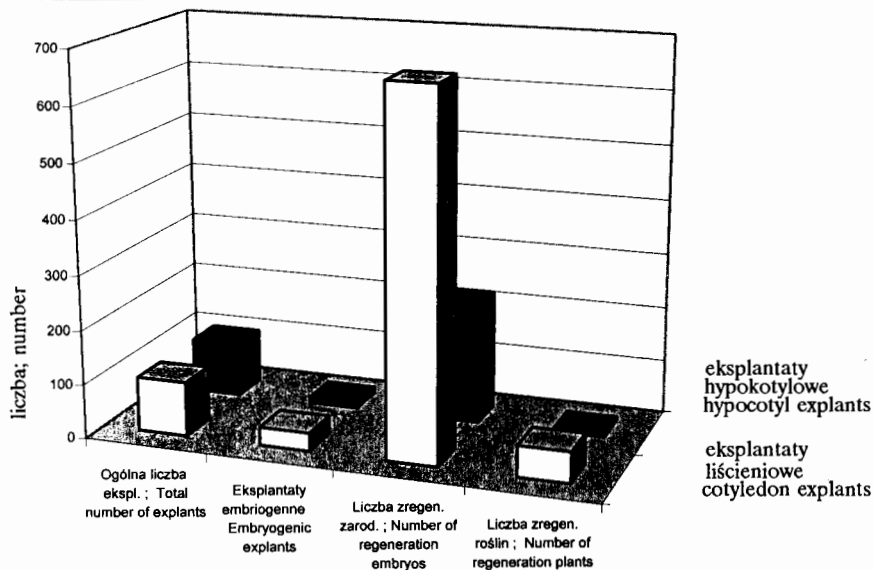
Fot. 3, 4. Zregenerowane rośliny odm. 'Opolska, z gatunku *Trifolium incarnatum* L.  
Photo 3, 4. Regenerated plants of 'Opolska' cultivar, *Trifolium incarnatum* L. species

Tabela 2; Table 2

Typy tkanki kalusowej rozwijającej się na eksplantatach liścieniowych i hypokotylowych po zastosowaniu pożywki różnicującej PCL-2

Types of callus originated from cotyledon and hypocotyl explants developed on differentiating PCL-2 medium

Gatunek i odmiana Species and cultivars	Kalusujące eksplantaty; Callus from explants (%)					
	liścienie; cotyledons			hypokotyle; hypocotyls		
	typ tkanki kalusowej; type of callus tissue					
	ziarnisty granular	gładki smooth	mieszany mix	ziarnisty granular	gładki smooth	mieszany mix
<i>Trifolium pratense</i> L.						
Hruszowska	35,7	11,4	52,8	57,9	17,4	24,6
Dajana	40,4	25,0	34,5	72,9	8,2	18,8
Karo	35,1	22,3	42,5	75,2	12,9	11,8
Nike	31,0	40,0	28,0	59,1	32,6	8,1
Jubilatka	23,4	11,1	65,4	47,8	9,8	42,2
Ulka	4,3	31,5	25,0	52,3	15,8	31,7
<i>Trifolium resupinatum</i> L.						
Ira	38,2	33,3	28,3	25,3	41,3	33,3
<i>Trifolium incarnatum</i> L.						
Opolska	6,0	81,9	12,0	29,3	64,0	6,6
Ogółem; Total	31,5	32,6	35,9	53,7	25,3	21,0

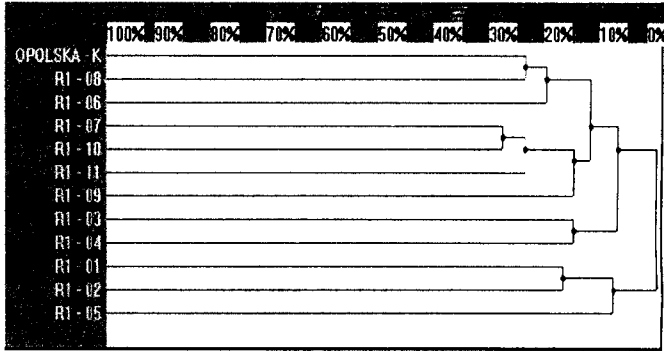


Rys. 1. Proces regeneracji roślin z gatunku *Trifolium incarnatum* L. odm. 'Opolska'

Fig. 1. Regeneration process of plants of *Trifolium incarnatum* L. species, 'Opolska', cultivars

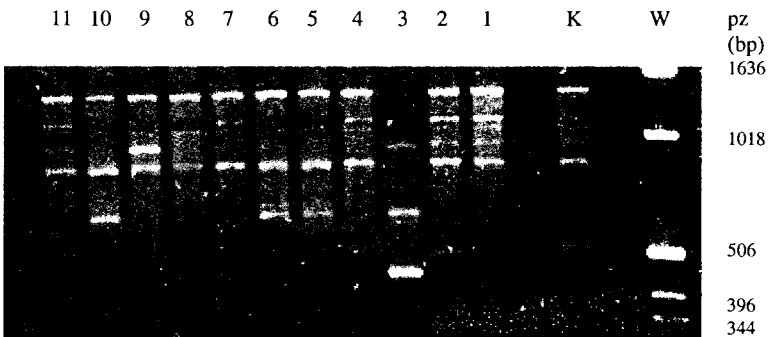
Analiza molekularna mająca na celu stwierdzenie poziomu podobieństwa i dystansu genetycznego pomiędzy odmianą kontrolną 'Opolska' a jej somatycz-

nymi klonami wykonana technika PCR-RAPD z zastosowaniem 6 oligonukleotydowych starterów wykazała bardzo małe podobieństwo genetyczne między analizowanymi formami (rys. 2). Uzyskane elektroforogramy przy zastosowaniu poszczególnych starterów wykazują wysoki stopień polimorfizmu produktów amplifikacji genomowego DNA, co wskazuje na istotne różnice dotyczące badanych obiektów (fot. 5). Potwierdzają to również wysokie współczynniki dystansu genetycznego (tab. 3). Zaobserwowano, że najniższy współczynnik (0,75) odnosi się do odmiany kontrolnej i klonu R<sub>1</sub>-08, natomiast najwyższy (1,00) do klonu R<sub>1</sub>-01, 05, 10. Należy zwrócić uwagę także na wysokie wartości współczynników dystansu genetycznego w obrębie zregenerowanych klonów (od 0,71 do 0,95). Jest to prawdopodobnie wynik ich zmienności somaklonalnej.



Rys. 2. Dendrogram przedstawiający podobieństwo genetyczne pomiędzy odmianą kontrolną 'Opolska' z gatunku *Trifolium incarnatum* L., a jej 11 somatycznymi klonami w pokoleniu R<sub>1</sub> przy zastosowaniu wszystkich analizowanych starterów

Fig. 2. Dendrogram showing genetic similarity between control 'Opolska' cultivar of *Trifolium incarnatum* L. species and its 11 somatic clones in R<sub>1</sub> generation, at using of all analysed starters



Fot. 5. Żel agarozowy obrazujący polimorfizm produktów amplifikacji genomowego DNA pomiędzy odmianą kontrolną 'Opolska' (K) z gatunku *Trifolium incarnatum* L. a jej 11 somatycznymi klonami w pokoleniu R<sub>1</sub>, generowany starterem OPF 06 o sekwencji: 5' GGAATTCGG3'; W - wzorzec, marker 1Kb DNA Ladder

Photo 5. Agarose gel depicting polymorphism of products of amplification of genomic DNA between control 'Opolska' cultivar (K) of *Trifolium incarnatum* L. and 11 somatic clones in R<sub>1</sub> generated with OPF 06 starter with the sequence 5'GGAATTCGG3'; W - DNA marker, 1Kb DNA Ladder

Prace z zakresu kultur *in vitro* w rodzaju *Trifolium* zapoczątkowane zostały w 1968 roku przez GRAHAMA [1968], który uzyskał u *Trifolium subteraneum* pierwszą tkankę kalusową. OSWALD i in. [1977] opisali proces regeneracji roślin koniczyny białej z kalusa uzyskanego z siewek oraz podali warunki prowadzenia kultury. W następnych latach badania dotyczyły wpływu rodzaju zastosowanych eksplantatów, genotypu i składników pożywki na proces regeneracji. BEACH i SMITH [1979] badając proces regeneracji u *Trifolium pratense* i *Trifolium incarnatum* stwierdzili wysoką interakcję pomiędzy genotypem *Trifolium pratense* a warunkami kultury. PEDERSON [1986] wykazał większe zdolności embriogenne tkanki kalusowej pochodzącej z hypokotyli gatunku *Trifolium incarnatum* i *Trifolium vesiculosum* niż kalusa z tego samego rodzaju eksplantatu u gatunków *Trifolium ambigum* i *Trifolium repens*. Procesy regeneracji roślin w rodzaju *Trifolium* zachodzą głównie drogą organogenezy, natomiast rzadziej drogą embriogenezy somatycznej [WEEB i in. 1987; MYERS i in. 1989].

Tabela 3; Table 3

Współczynniki dystansu genetycznego pomiędzy odmianą kontrolną 'Opolska' z gatunku *Trifolium incarnatum* L. a jej somatycznymi klonami w pokoleniu R<sub>1</sub>

Coefficients of genetic distance between control 'Opolska' cultivar of *Trifolium incarnatum* L. species and somatic clones in R<sub>1</sub> generation

Odmiana Klon Cultivar Clones	Opolska	R <sub>1</sub> -01	R <sub>1</sub> -02	R <sub>1</sub> -03	R <sub>1</sub> -04	R <sub>1</sub> -05	R <sub>1</sub> -06	R <sub>1</sub> -07	R <sub>1</sub> -08	R <sub>1</sub> -09	R <sub>1</sub> -10	R <sub>1</sub> -11
Opolska	X											
R <sub>1</sub> -01	1,00	X										
R <sub>1</sub> -02	0,95	0,82	X									
R <sub>1</sub> -03	0,94	0,90	0,81	X								
R <sub>1</sub> -04	0,87	0,95	0,95	0,84	X							
R <sub>1</sub> -05	1,00	0,91	0,87	0,91	0,95	X						
R <sub>1</sub> -06	0,78	0,95	0,91	0,90	0,85	0,87	X					
R <sub>1</sub> -07	0,77	0,95	0,86	0,85	0,84	0,86	0,81	X				
R <sub>1</sub> -08	0,75	0,95	0,95	0,95	0,82	0,80	0,79	0,84	X			
R <sub>1</sub> -09	0,87	0,95	0,85	0,89	0,94	0,95	0,84	0,83	0,82	X		
R <sub>1</sub> -10	1,00	0,90	0,92	0,85	0,89	0,86	0,91	0,71	0,89	0,84	X	
R <sub>1</sub> -11	0,83	0,95	0,91	0,85	0,84	0,86	0,86	0,75	0,84	0,89	0,71	X

Wykonane badania potwierdzają wpływ genotypu na proces embriogenezy somatycznej. Zarodki somatyczne i w efekcie regenerację roślin uzyskano przy zastosowanym poziomie regulatorów wzrostu i rozwoju tylko w gatunku *Trifolium incarnatum*. W przeprowadzonych badaniach proces regeneracji zachodził we wszystkich eksplantatach tylko poprzez embriogenezę somatyczną, natomiast nie obserwowano regeneracji na drodze organogenezy.

## Wnioski

Przeprowadzone badania wykazały istotny wpływ genotypu na proces embriogenezy somatycznej w gatunku *Trifolium incarnatum*.

Pożywka indukująca PCL-1 [PHILLIPS, COLLINS 1979 z modyfikacjami] inicjowała rozwój tkanki kalusowej zarówno na eksplantatach liścieniowych i hypokotylowych wszystkich badanych gatunków i odmian.

Pożywka różnicująca PCL-2 [PHILLIPS, COLLINS 1979 z modyfikacjami] indukowała rizogenezę w tkance kalusowej pochodzenia liścieniowego i hypokotylowego wszystkich badanych odmian z rodzaju *Trifolium* oraz embriogenezę u gatunku *Trifolium incarnatum*.

Właściwości embriogenne wykazywał tylko kalus o strukturze ziarnistej, koloru kremowego z białym nalotem wykształcony na eksplantatach liścieniowych i hypokotylowych odmiany 'Opolska' z gatunku *Trifolium incarnatum*.

Analiza molekularna wykazała niski stopień podobieństwa genetycznego pomiędzy embriogennymi genotypami odmiany 'Opolska' z gatunku *Trifolium incarnatum*, a jej somatycznymi klonami pokolenia R<sub>1</sub>.

## Literatura

- BEACH K.H., SMITH R.S. 1979. *Plant regeneration from callus of red and crimson clover*. Plant Sci. Lett. 16: 231–237.
- GRAHAM P.H. 1968. *Growth of Medicago sativa and Trifolium subterraneum in callus and suspension culture*. Phytton 25: 159–162.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. 15: 473–497.
- MYERS J.R., GROSSER J.W., TAYLOR N.L., COLLINS N.L. 1989. *Genotype-dependent whole plant regeneration from protoplasts of red clover (T. pratense L.)*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 19: 113–127.
- NEI M., LI W.H. 1979. *Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases*. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 5269–5273.
- PEDERSON G.A. 1986. *In vitro culture and somatic embryogenesis of four Trifolium species*. Plant Sci. 45: 101–104.
- PHILLIPS G.C., COLLINS G.B. 1979. *In vitro tissue culture of selected Legumes and plant regeneration from callus culture of red clover*. Crop Sci. 19: 59–64.
- PHILLIPS G.C., COLLINS G.B. 1979. *Virus symptom – free plants of red clover using meristem culture*. Crop Sci. 16: 213–216.
- RYBCZYŃSKI J.J. 1991. *Regeneracja roślin w kulturach in vitro niektórych gatunków z rodziny Fabaceae*. Rozprawy Naukowe i Monografie, Wydawnictwo SGGW Warszawa: 7–50.
- THOMPSON D., HENRY R. 1995. *Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR*. Biotechniques 19: 394–400.
- OSWALD K.J., SMITH A.H., PHILLIPS D.V. 1977. *Callus and plant regeneration from cell cultures of ladino clover and soybean*. Physiol. Plant. 39: 129–134.



WEEB K.J., FAY M.F., DALLE P. J. 1987. *An investigation of morphogenesis within the genus Trifolium*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 11: 37–46.

**Słowa kluczowe:** *Trifolium*, *in vitro*, somatyczna embriogeneza, PCR-RAPD

### Streszczenie

Indukcję somatycznej embriogenezy w rodzaju *Trifolium* przeprowadzono u 8 odmian pochodzących z trzech gatunków: *Trifolium pratense* – odmiany: 'Hruszowska', 'Nike', 'Dajana', 'Jubilatka', 'Ulka', 'Karo'; *Trifolium resupinatum* odmiana 'Ira' oraz *Trifolium incarnatum* odmiana 'Opolska'. Kalus indukowano na pożywce PHILLIPS, COLLINS [1979] z modyfikacjami wg RYBCZYŃSKIEGO [1991] zawierającej 2 mg·dm<sup>-3</sup> 2,4-D, 0,1 mg·dm<sup>-3</sup> BAP, 0,06 mg·dm<sup>-3</sup> picloramu oraz 2 mg·dm<sup>-3</sup> 2iP. Efektywność somatycznej embriogenezy oceniano na dwóch rodzajach eksplantatów: liścieniach i hypokotylach pobieranych z 5–6 dniowych sterylnych siewek. Namnażanie kalusa i formowanie się w nim zarodków przebiegało na pożywce różnicującej, zawierającej ten sam skład jak pożywka indukująca za wyjątkiem 2iP, który zastąpiono 0,2 mg·dm<sup>-3</sup> zeatyny. Pasażowanie zarodków somatycznych na pożywkę regeneracyjną MURASHIGE, SKOOG [1962] przyspieszało ich rozwój i doprowadzało do wzrostu roślin. Embriogeny kalus uzyskano tylko u odmiany 'Opolska' z gatunku *Trifolium incarnatum* z obu rodzajów eksplantatów. Analiza molekularna wykonana techniką PCR z wykorzystaniem markerów RAPD wskazuje na niski stopień podobieństwa genetycznego pomiędzy odmianą wyjściową 'Opolska', a jej klonami uzyskanymi na drodze somatycznej embriogenezy.

### INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *in vitro* CULTURES OF *Trifolium* GENUS SPECIES AND MOLECULAR ANALYSIS OF REGENERATION PLANTS OF R<sub>1</sub> PROGENY USING RAPD MARKERS

Zbigniew Broda, Leokadia Torz, Katarzyna Florek  
Department of Genetics and Plant Breeding,  
Agricultural University, Poznań

**Key words:** *Trifolium*, *in vitro*, somatic embryogenesis, PCR-RAPD

### Summary

Induction of somatic embryogenesis in *Trifolium* genus was been carried out on eight varieties from three species: *Trifolium pratense* ('Hruszowska', 'Nike', 'Dajana', 'Jubilatka', 'Ulka', 'Karo' cvs.); *Trifolium resupinatum* (cv. 'Ira') and *Trifolium incarnatum* (cv. 'Opolska'). The callus was obtained on PHILLIPS, COLLINS [1979] medium with modifications by RYBCZYŃSKI [1991]. Somatic embryogenesis was induced on two of explants: cotyledons and hypocotyls. The medium contained 2.0 mg·dm<sup>-3</sup> 2,4-D, 0.1 mg·dm<sup>-3</sup> BAP, 0.06 mg·dm<sup>-3</sup> picloram and 2.0

mg·dm<sup>-3</sup> 2iP. Proliferation of callus and formation of embryos were carried out on differentiating medium with composition the same as induction medium, except of 2iP, that was replaced by 0.2 mg·dm<sup>-3</sup> zeatin. Transfer of somatic embryos on regeneration medium MURASHIGE, SKOOG [1962] accelerated their development and affected plant growth. Embryogenic callus was obtained only from 'Opolska' cv. of *Trifolium incarnatum* from both types of explants. Molecular analysis performed with PCR technique using RAPD markers, indicated low level of genetic similarity between 'Opolska' cultivar and clones obtained by somatic embryogenesis.

Prof. dr hab. Zbigniew Broda  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego  
ul. Wojska Polskiego 71c  
60-625 POZNAŃ  
e-mail: zbroda@au.poznan.pl