

Krystyna SZCZYGIEŁ*

SOMATYCZNA EMBRIOGENEZA – ALTERNATYWNY SPOSÓB UZYSKANIA WYSELEKCJONOWANEGO MATERIAŁU SADZENIOWEGO GATUNKÓW DRZEW IGLASTYCH

SOMATIC EMBRYOGENESIS – AN ALTERNATIVE WAY TO PRODUCE IMPROVED PLANTING STOCK OF CONIFEROUS TREE SPECIES

Abstract. *Somatic embryogenesis in conifers as an effective vegetative propagation method, offers a great multiplicative potential in a short time as well as the possibility of cryopreservation the embryogenic tissue. Mass vegetative propagation via tissue culture (micropropagation, clonal propagation) of selected, improved material give many advantages over conventional methods (cutting, grafting). Plants can be produced by tissue culture through one of two different pathways: organogenesis or somatic embryogenesis. Organogenesis is developmental process where organ primordia are initiated on a explant (for ex. bud, leaf), after exogenously applied hormones. After organ initiation several steps – shoot elongation, rooting and acclimatization are required to obtain plant. Somatic embryogenesis – is the process of formation and development of somatic embryos from vegetative (somatic) tissue. This process can be divided into different steps: 1) initiation of embryogenic tissue from the primary explant (mature or immature zygotic embryo, cotyledon, needle), 2) multiplication of embryogenic tissue, 3) maturation of somatic embryos, 4) germination of somatic embryos, 5) plant regeneration. A short historical aspects of somatic embryogenesis in woody plants and its application for forest regeneration is presented. Vegetatively propagated material via somatic embryogenesis offers many advantages over seed material and can be used for forest tree breeding and reforestation programmes.*

Key words: *explant, organogenesis, somatic embryogenesis, somatic embryo, embryogenic tissue (callus).*

* Instytut Badawczy Leśnictwa, Zakład Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych, Sękocin Las, 05-090 Raszyn, e-mail: szczygik@ibles.waw.pl

1. WPROWADZENIE

Wegetatywne rozmnażanie drzew, polegające na uzyskiwaniu nowych osobników drogą regeneracji z części organizmu macierzystego, pozwala skuteczniej niż rozmnażanie generatywne zachować pożądane cechy hodowlane u potomstwa. W leśnictwie ułatwia ono szybkie wprowadzenie do praktyki wyników selekcji drzew. Metody wegetatywnego rozmnażania znajdują zastosowanie w leśnictwie głównie ze względu na późne osiągnięcie przez drzewa wieku dojrzałości generatywnej, okresowość kwitnienia i obradzania nasion oraz występowanie czynników powodujących pogorszenie stanu zdrowotnego lub wręcz zamieranie cennych populacji, a także w przypadku rozmnażania nowych form roślin uzyskanych przez krzyżowanie, a przede wszystkim w celu uzyskania wegetatywnego potomstwa drzew doborowych i elitarnych do zakładania plantacji nasiennych.

W szkółkarstwie leśnym wegetatywne rozmnażanie drzew jest szeroko stosowane. Tradycyjne metody mnożenia drzew, jak ukorzenianie zrzewów pędowych (zdrewniałych i zielnych) i korzeniowych, szczepienia, odrosty czy odkłady, mają szereg ograniczeń. Metody te często wymagają specjalnych mateczników, które muszą być odpowiednio pielęgnowane i odmładzane, w celu zachowania przez rośliny mateczne zdolności do regeneracji. Efektywność tych metod (szczególnie ukorzeniania zrzewów) zależy od wieku rośliny matecznej i jest wysoka niemal wyłącznie w przypadku pozyskiwania zrzewów z młodych roślin matecznych. Przy wegetatywnym rozmnażaniu drzew iglastych spotykany jest często u nowopowstałych sadzonek wzrost plagiotropowy, czyli poziomy wzrost pędów, bez wyraźnego przewodnika. Natomiast przy szczepieniu utrudnieniem jest wyrastanie z podkładek pędów konkurujących ze zrazami, co w wypadku plantacji nasiennych jest całkowicie niedopuszczalne. Ponadto, stosując tradycyjne metody uzyskuje się małą wydajność rozmnażania z jednej rośliny matecznej.

Najnowszym sposobem masowego, klonalnego rozmnażania drzew jest ich wegetatywne rozmnażanie *in vitro*, metodą hodowli tkanek (tzw. mikrorozmnażanie).

Podstawowe zalety i cele rozmnażania drzew leśnych metodą kultur tkankowych to:

- możliwość uzyskania w krótkim czasie dużej liczby genetycznie identycznych osobników (rozmnażanie klonalne) z małej ilości materiału wyjściowego (eksplantaty pierwotne: dojrzałe i niedojrzałe zarodki zygocytne, liścienie, igły, liście, pąki wierzchołkowe i boczne),

- kriokonserwacja materiału uzyskanego drogą *in vitro*: wykorzystanie materiału otrzymanego drogą somatycznej embriogenezy (kalus embriogeny, somatyczne zarodki i sztuczne nasiona) oraz organogenezy (pąki, pędy z pąkami) do długoterminowego przechowywania w ciekłym azocie w temperaturze -196°C ,

- możliwość otrzymania w krótkim okresie wartościowego wyselekcjonowanego materiału sadzeniowego, ulepszanego genetycznie ze względu na wartościowe cechy dla leśnictwa, różnych gałęzi przemysłu czy produkcję metabolitów wtórnych dla potrzeb farmacji i przemysłu kosmetycznego,

- możliwość regeneracji gatunków drzew, które trudno rozmnażają się tradycyjnymi metodami wegetatywnego mnożenia (np. sosna, dąb, buk),
- rozmnażanie gatunków drzew, których nasiona są trudne do przechowywania przez długi okres (tzw. „recalcitrant” – dęby, jawor, klon srebrzysty, kasztanowce, kasztan jadalny), lub które produkują nasiona późno i nieregularnie (np. modrzew, buk zwyczajny, jodła pospolita),
- ścisły związek kultur tkankowych z inżynierią genetyczną (transformacje genetyczne).

2. HISTORIA BADAŃ KULTUR TKANKOWYCH

Po raz pierwszy problem hodowli organów i tkanek roślinnych in vitro został podjęty przez Haberlandta w 1902 r., który twierdził, że komórki każdej rośliny hodowane w odpowiednich warunkach mogą zainicjować regenerację roślin (później na tym stwierdzeniu została oparta teoria totipotencji, Młodzianowski 1984). W 1934 r. sukcesem zakończyły się doświadczenia White’a (1934), który uzyskał długotrwały wzrost korzeni pomidora zwyczajnego (*Lycopersicon esculentum*), stosując pożywkę mineralną uzupełnioną glukozą i wyciągiem z drożdży. Podobnie nieograniczony wzrost tkanki roślinnej in vitro uzyskali w 1939 r. we Francji Gautheret oraz Nobecourt (Młodzianowski 1984). W Polsce już w latach 1952–1953 pojawiły się prace nad podziałami jąder i komórek w eksplantatach oraz nad hodowlą tkanek. W latach 1948–1959 pionierami prac z zakresu metody hodowli in vitro tkanek roślinnych i izolowanych zarodków byli prof. J. Czosnowski ze współpracownikami oraz prof. A. Szweykowska (Młodzianowski 1984). Od tego czasu metoda hodowli in vitro stosowana jest w naszym kraju w wielu placówkach naukowych.

Początkowo do regeneracji roślin drzewiastych używano tkanki kambialnej (Gautheret 1934), ze względu na dużą zawartość w niej endogennych hormonów wzrostu (auksyn i cytokinin). Dopiero po odkryciu cytokinin zaczęto wykorzystywać do hodowli tkanek inne źródła eksplantatów. Z 1940 r. pochodzą doniesienia o możliwości regeneracji pąków przybyszowych z tkanki kalusa wiązu *Ulmus campestris* (Gautheret 1940). Podobne wyniki otrzymał Jacquot (1949, 1955), prowadząc badania na tym samym gatunku, a także brzozie (*Betula verrucosa*). Poza pąkami przybyszowymi uzyskał on również zaczątki korzeni, jednak nie udało się mu wyhodować całkowicie wykształconych roślin. Pierwszą kompletną rośliną była osika zregenerowana z liścia w 1970 r. (Winton 1970), co zapoczątkowało intensywne badania nad rozmnażaniem wegetatywnym drzew w kulturach in vitro.

W 1958 r. otrzymano pierwsze roślinne somatyczne zarodki u marchwi (*Daucus carota*) (Steward 1958), a siedem lat później zarodki drzewa sandałowego (*Santalum album*) Rao (1965).

O dużych możliwościach somatycznej embriogenezy jako metody szybkiego rozmnażania *in vitro* gatunków drzew iglastych donosili Thorpe i Biondi (1984), Dunstan (1988), Becwar i in. (1988). Pionierskie badania nad somatyczną embriogenezą drzew iglastych prowadzone były już wcześniej, w latach 1968–1980. Przewodzącym laboratorium prowadzącym badania w tym zakresie był ośrodek kierowany przez prof. D. J. Durzana i współpracowników (w Kanadzie), w którym badano rozwój i metabolizm kalusa oraz komórek zawieszinowych gatunków drzew iglastych (Durzan i Steward 1968, Chalupa i Durzan 1973, Durzan i Chalupa 1976). Wprawdzie obserwowano różne struktury podobne do zarodków, nie uzyskano jednak z nich zarodków ani roślin. Pierwsze doniesienie o możliwości rozmnażania przez somatyczne zarodki gatunków drzew iglastych pochodzi z 1985 r., gdy Hakman i in. (1985) oraz Chalupa (1985) uzyskali inicjację somatycznej embriogenezy u świerka pospolitego (*Picea abies* Karst.). Jako eksplantaty zastosowano dojrzałe i niedojrzałe zygotyczne zarodki. Uzyskano 38% frekwencję inicjacji kalusa embriogenego (procent eksplantatów tworzących tkankę embriogenną) z niedojrzałych zarodków, 8% z dojrzałych (Chalupa 1985) oraz somatyczne zarodki, a z nich siewki. W laboratorium szwedzkim Hakman ze współpracownikami (1985) otrzymali w 50% inicjację tkanki embriogennej, stosując również jako eksplantaty niedojrzałe zarodki zygotyczne świerka pospolitego. W tym samym roku również zainicjowano kalus embriogeny (Nagmani i Bonga 1985) z megagametofitu (prabiela z niedojrzałym zarodkiem) modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.), a w 1986 r. Erdelsky i Barancok pierwsi otrzymali tkankę embriogenną u jodły pospolitej (*Abies alba* Mill.), wykorzystując jako eksplantat dojrzały zarodek zygotyczny. Należy podkreślić, że pierwsze somatyczne siewki świerka pospolitego wyhodowali Hakman i von Arnold (1985) oraz Chalupa (1985). W tym samym roku Nagmani i Bonga (1985) uzyskali pierwszą siewkę modrzewia europejskiego (haploidalną), a dopiero w 1995 r. Hristoforoglu ze współpracownikami (1995) otrzymali siewki somatyczne jodły pospolitej.

Od tego czasu w wielu laboratoriach rozpoczęto intensywne badania nad możliwością rozmnażania *in vitro* różnych gatunków drzew iglastych metodą somatycznej embriogenezy.

Obecnie metodą somatycznej embriogenezy rozmnażanych jest ponad 300 gatunków roślin (Bajaj 1995, Dunstan i in. 1995), w tym 120 gatunków drzew liściastych, wśród nich liczne drzewa leśne, jak: *Fagus sylvatica* (Jorgensen 1988), *Fraxinus* spp. (Preece i in. 1987), *Juglans* spp. (Cornu 1988), *Populus* spp. (Chen i in. 1988), *Robinia* (Wang i in. 1982), *Quercus robur* i *Tilia cordata* (Chalupa 1990), (Kendurkar i in. 1995), i ponad 50 gatunków drzew iglastych (Gupta i Grob 1995, Minocha i Minocha 1995, Raemakers i in. 1999).

3. MIKROROZMNAŻANIE GATUNKÓW DRZEW IGLASTYCH

Mikrorozmnażanie drzew (klonowanie – wegetatywne rozmnażanie drzew *in vitro*) można uzyskać stosując dwie metody: organogenezę i somatyczną embriogenezę.

Organogeneza jest sposobem klonowania polegającym na formowaniu organów roślinnych na eksplantacie pod wpływem roślinnych regulatorów wzrostu (hormonów). Umieszczenie eksplantatu (pąki wierzchołkowe i kątowe, pęd 1–2 cm z pąkiem, liścień, igła, liść, zarodek) na pożywce uzupełnionej cytokininami lub cytokininą i auksyną powoduje aktywację merystemów pędowych, w wyniku czego powstają mikropędy (mikrosadzonki), które następnie są ukorzeniane w pożywkach o wyższym stężeniu auksyn niż cytokinin, w warunkach *in vitro* lub *ex vitro*. Do ukorzeniania mikrosadzonek stosowane są substraty (najczęściej mieszanka torfu z perlitem lub wermikulitem) oraz hormony wzrostu w preparatach proszkowych. Stosując tą metodę z jednego eksplantatu pierwotnego można uzyskać od 10 do 50 nowych roślin.

Bardziej wydajną metodą rozmnażania drzew *in vitro* jest somatyczna embriogeneza, dzięki której w krótkim czasie możliwie jest otrzymanie dużej liczby genetycznie identycznych osobników (klon) z małej ilości materiału wyjściowego – eksplantatu (co umożliwi masowe, klonalne rozmnażanie). Proces ten polega na formowaniu i rozwoju zarodków z komórek somatycznych (wegetatywnych) z pominięciem zapłodnienia i zygoty. Tautorus i in. (1991) definiują ją jako metodę bezpłciowego rozmnażania, która odtwarza normalny proces rozwoju zarodka w nasieniu. Somatyczne zarodki są identyczne lub podobne do zygotycznych, mają zdolność kiełkowania i regeneracji siewek. Według Malepszego i Wróblewskiego (1994) jest to proces morfogenetyczny, w wyniku którego z komórki lub komórek roślinnych (z wyłączeniem zygoty i gamet) powstanie struktura o morfologii zbliżonej lub identycznej z morfologią któregoś ze stadiów rozwojowych zarodka zygotycznego.

Zasadnicza różnica między obydwojema metodami mikrorozmnażania polega na tym, że podczas organogenezy dochodzi do formowania organów na eksplantacie, a w wyniku somatycznej embriogenezy powstają somatyczne zarodki.

Proces somatycznej embriogenezy zachodzi poprzez następujące fazy:

- 1) inicjację kalusa embriogenego na eksplantacie,
- 2) namnażanie kalusa embriogenego (tworzenie somatycznych zarodków),
- 3) dojrzewanie somatycznych zarodków,
- 4) kiełkowanie somatycznych zarodków,
- 5) konwersję somatycznych zarodków w siewki.

Faza inicjacji kalusa embriogenego na eksplantacie

Somatyczna embriogeneza może zachodzić bezpośrednio z komórek eksplantatu lub pośrednio poprzez stadium kalusa embriogenego powstającego na

eksplantacie (Sharp i in. 1980, 1982). Przez ciągłe podziały i namnażanie embriogennej tkanki, ten drugi sposób stwarza praktycznie nieograniczone możliwości uzyskania zarodków somatycznych, a z nich siewek.

W celu inicjacji tkanki embriogennej drzew iglastych, jako eksplantaty pierwotne (fragment rośliny lub tkanka używana do zainicjowania kultury *in vitro*), stosuje się głównie dojrzałe i niedojrzałe zygotyczne zarodki (fot. 1). Do inicjacji kalusa embriogenego *Picea abies* wykorzystywano też liścienie 7-dniowych kiełkujących zarodków (Krogstrup 1986, Lelu i in. 1987, 1990), a *Picea glauca* i *Picea mariana* – liścienie 12-dniowe (Lelu i Bornman 1990). Attree i in. (1990) zastosowali również liścienie 12-30-dniowych siewek *Picea glauca* i *Picea mariana*. Do inicjacji kalusa embriogenego *Picea abies* Ruaud i in. (1992) wykorzystali hipokotyle i liścienie 1-miesięcznych siewek somatycznych i zygotycznych oraz igły 14-miesięcznych siewek somatycznych hodowanych w szklarni, a także igły 7–56-dniowych siewek somatycznych i zygotycznych (Rnaud 1993). Ostatnio Harvengt ze współpracownikami (2001) otrzymali tkankę embriogeną na 3-letnich igłach siewek somatycznych *Picea abies*. Jest to najstarszy eksplantat świerka, z którego uzyskano tkankę embriogeną.

Nagmani i Bonga (1985) u *Larix decidua* oraz von Aderkas i in. (1990) u *Larix decidua* i *L. leptolepis* w celu inicjacji haploidalnej tkanki embriogennej zastosowali megagametofit, z którego usunięto niedojrzały zarodek, oraz megagametofit z niedojrzałym zarodkiem, aby zainicjować diploidalny kalus embriogeny.

W celu inicjacji somatycznej embriogenezy wykorzystywano również protoplasty (Attree i in. 1987, Klimaszewska 1989, Egertsdotter i von Arnold 1991, von Aderkas 1992). Attree ze współpracownikami (1987) uzyskał regenerację somatycznych zarodków z protoplastów wyizolowanych z embriogennej tkanki *Picea glauca*, a Klimaszewska (1989) wyhodowała siewki mieszańca *Larix*×*leptolepis*, również stosując jako eksplantaty w somatycznej embriogenezie protoplasty z tkanki embriogennej. Podobnie von Aderkas (1992) otrzymał regenerację siewek z protoplastów izolowanych z haploidalnego kalusa *Larix decidua* Mill.

Wyższą frekwencję inicjacji kalusa embriogenego uzyskiwano stosując jako eksplantaty zarodki niedojrzałe. Pozyskanie takich eksplantatów jest jednak kłopotliwe ze względu na terminowość zbioru niedojrzałych szyszek, a także krótki



Fot. 1. Dojrzały zygotyczny zarodek świerka pospolitego (*Picea abies*) (eksplantat)

Phot. 1. Mature zygotic embryo of Norway spruce (*Picea abies*) (explant)

okres odpowiedniego stadium rozwoju niedojrzałych zarodków (na ogół 2–4 tygodnie po zapłodnieniu), a poza tym częste lata nieurodzaju szyszek. Bardziej korzystne jest zastosowanie dojrzałych zarodków zygotycznych, izolowanych z nasion przechowywanych w chłodniach. Z danych literaturowych wynika, że do inicjacji najczęściej stosowano dojrzałe zarodki bezpośrednio po zbiorze, a rzadziej przechowywane przez długi okres. Dojrzałe zygotyczne zarodki gatunków drzew iglastych mają różną zdolność do inicjacji somatycznej embriogenezy. Zdolność do somatycznej embriogenezy u świerka pospolitego jest – w porównaniu z innymi gatunkami drzew iglastych – stosunkowo wysoka i wynosi 55% (Jain i in. 1988). Dotychczas tylko Lelu i in. (1994) uzyskali kalus embriogeny na dojrzałych zarodkach modrzewia europejskiego (w 5%). Tkankę embriogeną na dojrzałych zygotycznych zarodkach jodły pospolitej zainicjowali Hristoforoglu i in. (1995) – w 40%, Braumüller i in. (2001) – w 52% oraz Szczygieł i Kowalczyk (2001) – w 29,4%. Obecnie trwają poszukiwania innych źródeł eksplantatów (igły, liścienie, hipokotyle) oraz różnych regulatorów roślinnych stymulujących proces inicjacji somatycznej embriogenezy.

Jako eksplantaty wtórne stosowane są somatyczne zarodki oraz liścienie i igły somatycznych siewek. Stwierdzono wyższą wydajność inicjacji kalusa embriogenego przy zastosowaniu materiału roślinnego wcześniej uzyskanego drogą somatycznej embriogenezy (Ruaud i in. 1992, Ruaud 1993, Salajova i Salaj 2001).

Zainicjowana tkanka embriogenna* ma postać od białej do przezroczystej „kleistej” masy (fot. 2). Po zabarwieniu jej acetokarminem widoczne są (pod mikroskopem) wczesne stadia rozwojowe zarodków – prazarodki. Wyodrębnia się w nich wyraźna strefa masy embriogennej (małe komórki, których jądra wybarwiają się na czerwono) oraz długie bezbarwne komórki suspensora o dużych wakuolach i małych jądrach (fot. 3).

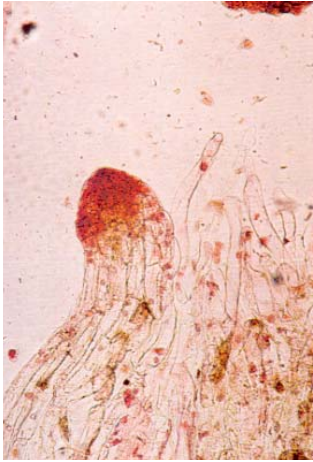
W celu zainicjowania procesu somatycznej embriogenezy eksplantat należy wyłożyć na pożywkę uzupełnioną regulatorami roślinnymi. Somatyczna embriogeneza, począwszy od fazy inicjacji kalusa embriogenego do uzyskania dojrzałych zarodków, zależy od dostarczanych egzogennie roślinnych regulatorów wzrostu. Każda faza somatycznej embriogenezy wymaga innych zabiegów, które zależą od wyników fazy poprzedniej.



Fot. 2. Inicjacja kalusa embriogenego na dojrzałym zygotycznym zarodku świerka pospolitego (*Picea abies*)

Phot. 2. Initiation of embryogenic callus on mature zygotic embryo of Norway spruce (*Picea abies*)

* W literaturze określana jest w różnoraki sposób, jako masa proembriogeniczna, kalus embriogeny, masa komórek embriogenych lub masa embriogenna suspensora.



Fot. 3 Prazarodek świerka pospolitego (*Picea abies*)

Phot. 3. Proembryo of Norway spruce (*Picea abies*)

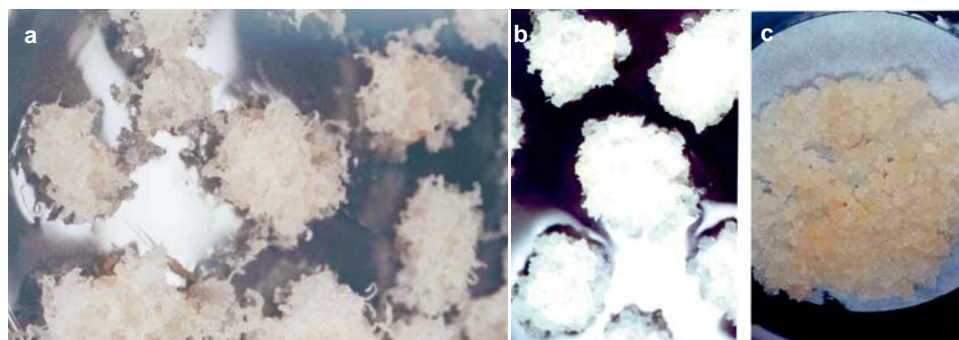
W fazie inicjacji kalusa embriogenego u większości gatunków drzew iglastych pożywki podstawowe uzupełnia się cytokininą (najczęściej BAP-6-benzyloaminopuryna, w stężeniu 4,5–5 μM) i auksyną (2,4-D-kwas 2,4-dichloro-fenoksyoctowy, w ilości 9–10 μM), z wyjątkiem jodły, dla której pożywka wzbogacana jest tylko o BAP. Jedynie Hristoforoglu i in. (1995) dodawali cytokininy BAP (2,2 μM) wraz z kinetyną (2,3 μM). Sporadycznie stosowano również NAA (kwas naftylooctowy) razem z BAP – aby zainicjować tkankę embriogenną na dojrzałych zygotycznych zarodkach *Picea abies* (von Arnold 1987), a także Picloram (chlorowcopochodna kwasu α -pikolinowego, cytokinina) – w celu inicjacji somatycznej embriogenezy *Picea glauca* (Park i in. 1993).

Najczęściej stosowanymi pożywkami podstawowymi są: DCR (Gupta i Durzan 1985), BM-3 (Gupta i Durzan 1986), LP (von Arnold i Eriksson 1981), LM (Litvay i in. 1985), MSG (Becwar i in. 1990), SH (Schenk i Hildebrandt 1972). Na ogół są to modyfikacje pożywki MS (Murashige i Skoog 1962). Stosowane są głównie pożywki stałe (zestalone phytagelem lub agarem) lub rzadziej płynne.

W tej fazie kultury hodowane są w ciemności w temperaturze 22–25 °C. Na inicjację tkanki embriogennej, poza rodzajem i stanem rozwoju eksplantatu, ma wpływ wiele współdziałających czynników, przede wszystkim genotyp eksplantatu, poziom endogennych hormonów roślinnych, rodzaj i stężenie hormonów zastosowanych w pożywce do inicjacji, a przede wszystkim obecność w komórkach białek receptorowych, które wiążą odpowiadające im hormony. Dlatego też komórki reagują w sposób specyficzny, nie wszystkie mają właściwe receptory dla danego rodzaju hormonów. W zależności od stadium rozwojowego eksplantatu, w jakim podawane są hormony, mogą one być pobierane przez komórki, unieczynniane, przechowywane, transportowane do innych komórek lub wydalane poza eksplantat. Regulatory roślinne mogą oddziaływać na realizację programu genetycznego komórki poprzez blokadę jednych genów i aktywację innych, co wywołuje zmiany morfogenetyczne (Orlikowska 1997). Ze względu na trudności z odtworzeniem warunków współdziałających w tak czułym układzie, bezpośrednie zastosowanie metodyk stosowanych w innych laboratoriach często kończy się niepowodzeniem. Dlatego zawsze, nawet gdy metodyki są opublikowane, wymagają własnych modyfikacji i eksperymentów (Orlikowska 1997). Faza inicjacji tkanki embriogennej (zależnie od gatunku) trwa od 4–10 tygodni.

Namnażanie kalusa embriogenego

W celu uzyskania odpowiedniej ilości tkanki embriogennej, niezbędne jest dzielenie jej i przenoszenie na świeżą pożywkę (pasażowanie) co dwa lub trzy tygodnie (fot. 4). W tej fazie prazarodki intensywnie dzielą się, ale ich dalszy rozwój i różnicowanie są zahamowane. Stwierdzono, że w przypadku licznych gatunków drzew iglastych, aby zachodził proces namnażania kalusa embriogenego (powstawania nowych, niedojrzałych somatycznych zarodków we wczesnych stadiach rozwojowych) niezbędne jest uzupełnienie pożywki podstawowej o auksyny i cytokininy (Bellarosa i in. 1992, Filonova i in. 2000 a, von Aderkas i in. 2001). Z danych literaturowych wynika, że do namnażania kalusa embriogenego stosowano na ogół taką samą pożywkę jak do indukcji tkanki embriogennej, lub o obniżonej ilości hormonów. Faza ta – zależnie od potrzeb – trwa od kilku tygodni do kilku lat.



Fot. 4. Namnażanie kalusa embriogenego: a) jodły pospolitej, b) świerka pospolitego na stałej pożywkę, c) świerka pospolitego na filtrze papierowym wyłożonym na stałą pożywkę.

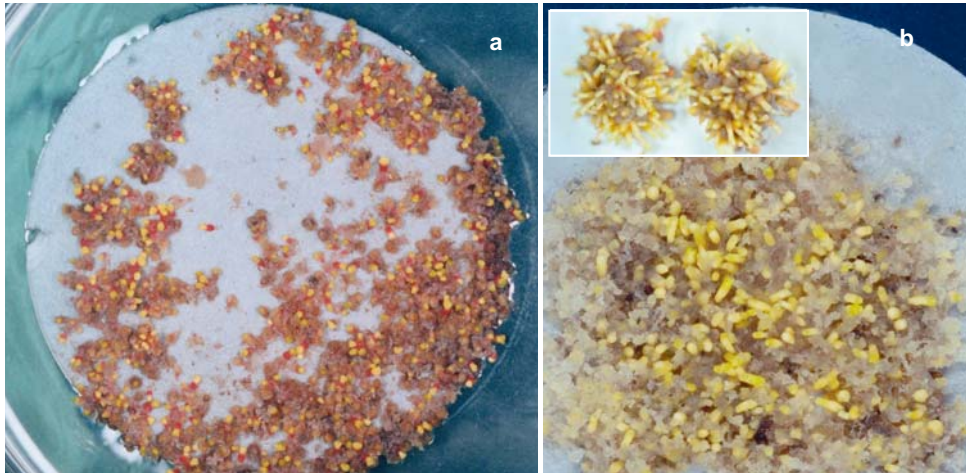
Fot.4. Embryogenic callus multiplication: a) silver fir, b) Norway spruce on solid medium, c) Norway spruce on filter paper placed on solid medium

Faza dojrzewania somatycznych zarodków

W tej fazie somatycznej embriogenezy niezbędny jest pasaż kalusa na pożywkę podstawową wzbogaconą o kwas abscysynowy (ABA), zależnie od gatunku w ilości 20–80 μM . Kultury najczęściej są hodowane w warunkach światła o niskim natężeniu ($15\text{--}30 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$), w 16-godzinnym fotoperiodzie.

Proces uzyskania dojrzałych somatycznych zarodków przebiega na ogół dwuetapowo: kultury są hodowane przez 7 dni na podłożu uzupełnionym węglem aktywnym (0,5–1%), a następnie pasażowane na podłoże z kwasem abscysynowym, na 4–8 tygodni (zależnie od gatunku roślin).

Węgiel aktywny absorbuje niektóre regulatory wzrostu (auksyny, cytokininy, kwas abscysynowy), a także związki fenolowe i substancje toksyczne (Ebert i Taylor 1990). Dodanie do podłoża egzogenego kwasu abscysynowego (\pm cis trans ABA) stymuluje proces prawidłowego dojrzewania somatycznych zarodków.



Fot. 5. Liścieniowe somatyczne zarodki modrzewia europejskiego (a) i świerka pospolitego (b)
 Phot. 5. Cotyledonary somatic embryos of European larch (a) and Norway spruce (b)

Kwas abscysynowy odgrywa istotną rolę podczas rozwoju zygotycznych i somatycznych zarodków. Uzupełnienie pożywki o ABA jest niezbędne w celu różnicowania i wzrostu somatycznych zarodków oraz zahamowania procesu namnażania kalusa embriogenego gatunków drzew iglastych (Dunstan i in. 1988, 1994, Vagner i in. 1998, Filonova i in. 2000a, b). Tak długo, jak auksyny i cytokininy są obecne w podłożu, różnicowanie somatycznych zarodków jest zahamowane. Dopiero wówczas, gdy kultury są pasażowane na pożywkę bez tych regulatorów, dochodzi do synchronicznego wykształcania indywidualnych dojrzałych somatycznych zarodków (Filonova i in. 2000 a, b). ABA ma również wpływ na gromadzenie i syntezę substancji zapasowych w zarodkach oraz stymuluje późniejsze ich kiełkowanie. U wielu gatunków drzew iglastych do optymalnego dojrzewania somatycznych zarodków dochodzi wówczas, gdy pożywka uzupełniona jest o ABA wraz z auksyną IBA – kwas indolilomasłowy (Becwar i in. 1987, 1989, Roberts i in. 1990a) lub związkiem osmotycznie czynnym, jak PEG – glikol polietylenowy (Attree i in. 1991, Bozhkov i von Arnold 1998), zwiększonym stężeniem cukrów (Tremblay i Tremblay 1995) lub zastosowaniem pożywki utwardzonej phytagelem o wyższym stężeniu niż stosowanym we wcześniejszych fazach (Klimaszewska i Cyr 2002).

Podczas hodowli kalusa embriogenego zarodki somatyczne przechodzą poprzez kolejne stadia rozwoju od prazarodków, poprzez globularne, do najbardziej istotnych dla hodowców – dojrzałych, zarodków liścieniowych (fot. 5). Tylko zarodki w stadium liścieniowym (z wyraźnie wykształconymi liścieniami, hipokotylem i korzeniem zarodkowym, o morfologii identycznej lub podobnej, jak zarodki zygotyczne) kiełkują i rozwijają się w somatyczne siewki (fot. 6, 7, 8).

Podczas badań prowadzonych w Zakładzie Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych zależnie od genotypu linii kalusa świerka pospolitego (w pożywce do doj-



Fot. 6. Kielkowanie podsuszonych somatycznych zarodków świerka pospolitego
 Phot. 6. Germination of partially dried somatic embryos of Norway spruce

rzewania somatycznych zarodków BM-3 z 20 μM ABA i 1 μM IBA) z 1 grama świeżej masy kalusa wytworzyło się średnio 250–520 szt. zarodków liczonych ogółem (tj. zarodków globularnych i liścieniowych), z czego 80–200 szt. w stadium liścieniowym. Po zastosowaniu kalusa drugiej generacji wykształciło się średnio 120–220 szt. zarodków ogółem, w tym 80–110 szt. liścieniowych, przy czym na licznych kawałkach kalusa uzyskano nawet 600–1200 szt. zarodków (po 4–5 tygodniach hodowli kultur).

Najwyższą efektywność somatycznej embriogenezy modrzewia europejskiego otrzymano po 4 tygodniach hodowli kultur na pożywce podstawowej (MSG) uzupełnionej ABA, w ilości 20–60 μM i 1 μM IBA (zależnie od genotypu).



Fot. 7. Dwumiesięczne somatyczne siewki świerka przed wysadzeniem do warunków naturalnych

Phot. 7. Two-month old somatic seedlings of spruce before planting in natural conditions

Najwięcej zarodków ogółem (949 szt.) i liścieniowych (226 szt.) z 1 grama kalusa wytworzyło się z linii pochodzącej z nasion z Nadleśnictwa Młynary. Na dużą wydajność somatycznej embriogenezy modrzewia europejskiego wskazuje możliwość uzyskania dużej liczby somatycznych zarodków (średnio globularnych 284 szt., w tym 89 szt. liścieniowych) z trzeciej generacji kalusa embriogenego, a z nich siewek.

Fot. 8. Jednomiesięczne siewki somatyczne modrzewia europejskiego przed wysadzeniem do substratu naturalnego

Phot. 8. One-month old somatic seedlings of european larch before planting in natural substratum



Jodła pospolita charakteryzowała się niską zdolnością do regeneracji zarodków. Najlepsze efekty u większości badanych linii jodły uzyskano, gdy kultury hodowano na zmodyfikowanej pożywce MCM (Bornman i Jansson 1981, za Hristoforoglu i in. 1995) uzupełnionej 20 μM ABA z 1 μM IBA (przez okres 6–10 tygodni). Na pożywce tej wytworzyło się 20–60 szt. zarodków globularnych, w tym 5–20 liścieniowych (z grama świeżej masy kalusa). Tylko jedna linia (pochodząca z Nadl. Lesko) charakteryzowała się wysoką wydajnością somatycznej embriogenezy (średnio uzyskano 134 szt. zarodków globularnych i 108 szt. liścieniowych).

Kielkowanie i konwersja somatycznych zarodków w siewki

Somatyczne zarodki w stadium liścieniowym są wykładane bezpośrednio na pożywkę do kielkowania (najczęściej w tym celu stosowana jest pożywka podstawowa bez hormonów, o niższej zawartości cukru i makroelementów, w porównaniu z poprzednimi fazami) lub poddawane są zabiegom, ułatwiającym ich dalszy rozwój. W tym celu stosowane są: częściowe podsuszanie somatycznych zarodków w warunkach wysokiej wilgotności powietrza w przedziale 95–97% (Roberts i in. 1990b, 1991), suszenie – zastosowanie wysyconych roztworów soli (Roberts i in. 1990b, Lelu i in. 1995, Dronne i in. 1997) lub prowadzenie dojrzewania zarodków na pożywkach o wyższym stężeniu phytagelu lub agaru niż w poprzednich fazach somatycznej embriogenezy (Klimaszewska, informacja ustna). Wszystkie te zabiegi powodują redukcję zawartości wody w somatycznych zarodkach, przez co zwiększa się zdolność kielkowania oraz ich konwersja w siewki. Konwersja określana jest w dwojaki sposób: jako rozwój roślin somatycznych, identycznych jak siewki wykształcone z nasion, zdolnych do wzrostu i rozwoju *ex vitro* (Becwar i in. 1989), lub jako wzrost i rozwój siewek somatycznych, z



Fot. 9. Trzyletnie somatyczne sadzonki świerka pospolitego (szklarnia w Sękocinie)

Phot. 9. Three-year old somatic seedlings of Norway spruce (greenhouse in Sękocin)



Fot. 10. Dwuletnie somatyczne sadzonki modrzewia (*Larix x leptoeuropea*)

Phot. 10. Two-year old somatic seedlings of larch (*Larix x leptoeuropea*)

wyraźnie wykształconym korzeniem, pękiem szczytowym i pierwszymi igłami w warunkach *in vitro* (Lelu – informacja ustana). Obecnie niektórzy autorzy zamiast „konwersji”, częściej określają przeżywalność zregenerowanych siewek po wysadzeniu i adaptacji do warunków *ex vitro*, tj. niesterylnych, naturalnych (fot. 9, 10).

Jak wynika z danych literaturowych, w początkowych badaniach zarówno kiełkowanie (zdolność kiełkowania 11–82%), jak i konwersja (5–35%) zarodków świerka pospolitego w somatyczne siewki, były na stosunkowo niskim poziomie (Becwar 1993, Hay i Charest 1999). Salajova i in. (1995) dla zarodków somatycznych mieszańców jodły uzyskali zdolność kiełkowania 12%, a Cornu i Geoffrion (1990) dla modrzewia europejskiego – 20%. Obecnie, zależnie od gatunku drzew i stosowanych zabiegów, uzyskiwana jest wysoka zdolność kiełkowania (70–90%) oraz adaptacja somatycznych siewek do wzrostu i rozwoju w warunkach naturalnych. Lelu i in. (1995) uzyskali najwyższą konwersję (92%) somatycznych siewek mieszańców modrzewia (*Larix × leptoeuropaea*). Konwersja zarodków w siewki oraz dalszy ich wzrost i adaptacja do warunków naturalnych wymagają wielu zabiegów. Rośliny z kultur *in vitro* charakteryzują się znacznym uwodnieniem tkanek, małym zdrewnieniem, słabo wykształconymi: tkanką okrywającą (kutykulą), aparatem fotosyntetycznym oraz aparatami szparkowymi i korzeniami. Poza zabiegami takimi, jak zmniejszanie w pożywce stężenia makro- i mikroelementów, cukru, zastosowanie przechładzania czy zwiększenie natężenia światła przeprowadzanymi w warunkach *in vitro*, wymagane jest również zachowanie odpowiednich warunków hodowli siewek w warunkach *ex vitro*. W tym celu konieczne jest zastosowanie fitotronów oraz szklarni z zamgławianiem i regulacją temperatury, a często i fotoperiodu oraz ochrona przed zakażeniami. W wielu krajach prowadzone są intensywne badania nad możliwością ulepszenia i modyfikacji sposobów mnożenia przez somatyczne zarodki poszczególnych gatunków drzew leśnych, w celu wykorzystania ich na szerszą skalę.

4. ZASTOSOWANIE SOMATYCZNEJ EMBRIOGENEZY GATUNKÓW DRZEW IGLASTYCH W LEŚNICTWIE

Olbrzymia efektywność rozmnażania metodą somatycznej embriogenezy oraz możliwość kriokonserwacji tkanek embriogennych to podstawowe zalety tej metody mnożenia oraz podstawa wykorzystania jej do hodowli i selekcji drzew leśnych na skalę gospodarczą.

Somatyczna embriogeneza drzew iglastych jest istotną metodą dla hodowli i selekcji drzew leśnych ze względu na olbrzymi potencjał regeneracji roślin ulepszonych genetycznie, pozwalający na selekcję i masowe rozmnażanie linii elitarnych. Selekcja siewek somatycznych uwzględnia parametry stosowane w tradycyjnej hodowli i selekcji drzew, tj. formę, wzrost, jakość drewna, odporność na

owady czy choroby. Ponadto stosując tę metodę, w ciągu krótkiego okresu od inicjacji kultur (12–18 miesięcy zależnie od gatunku) można dostarczyć do szkółki materiał sadzeniowy (Cyr i in. 2001).

W wielu krajach, głównie w Kanadzie i USA, materiał sadzeniowy produkowany tą metodą jest już stosowany do zakładania upraw leśnych i zalesień (Grossnickle 1999). Liczne szkółki i powierzchnie doświadczalne założono z różnymi gatunkami świerka: *Picea mariana* Mill. B.S.P. (Adams i in. 1994), *Picea glauca* (Park i in. 1993, 1994), *Picea abies* L. Karst. (Gupta i in. 1993, 1996, Gupta 1999), *Picea rubens* (Isabel i Tremblay 1995), a także sosny: *Pinus taeda* L. (Becwar i Pullman 1995), *Pinus radiata* (Smith 1997, Aitken-Christie 2001) oraz dąglezji *Pseudotsuga menziesii* (Gupta i in. 1993, Gupta i Grob 1995, Gupta i in. 1996). Cyr i Klimaszczyńska (2002) podają, że obecnie na szeroką skalę jako materiał sadzeniowy stosuje się również somatyczne siewki *Picea sitchensis*, *Pinus monticola*, *Pinus strobus* (Kanada), *Pinus elliotii* (USA), *Pinus patula* (Południowa Afryka) oraz *Pinus pinaster* (Francja). Rozmnażanie klonalne prowadzone jest głównie przez sektor prywatny i przedsiębiorstwa leśne.

Przed zastosowaniem somatycznej embriogenezy na skalę gospodarczą poddano tę metodę szczegółowej analizie. Przeprowadzone badania służyły ocenie poszczególnych etapów tego procesu mnożenia i zmierzały do opracowania odpowiedniej metodyki, aby uniknąć strat genotypów podczas całego procesu. Głównym celem było uzyskanie licznych, dojrzałych, liścieniowych zarodków somatycznych, identycznych pod względem morfologicznym i fizjologicznym z zygocytowymi, oraz prawidłowo rozwiniętych siewek. Uzyskane siewki powinny spełniać te same kryteria co materiał sadzeniowy pochodzący z nasion.

Z badań prowadzonych nad somatyczną embriogenezą świerka czarnego (Adams i in. 1994) wynika, że ulepszanie jakości drzew oraz produkcja materiału sadzeniowego wymagają zastosowania wielu rodów z danego gatunku, aby po selekcji zachować zróżnicowanie genetyczne oraz osiągnąć zysk genetyczny. Przed wprowadzeniem materiału z hodowli *in vitro* na skalę gospodarczą niezbędna jest długoterminowa obserwacja wzrostu i rozwoju olbrzymiej liczby siewek somatycznych reprezentujących dużą liczbę genotypów.

Siedmioletnie badania i obserwacje siewek świerka (*Picea glauca* (Moench) Voss×*Picea engelmannii* Parry) w warunkach naturalnych (szkółka) wykazały, że siewki somatyczne spełniają wymagania standardowe materiału sadzeniowego, co wskazuje na możliwość stosowania ich na skalę gospodarczą (Grossnickle i Major 1994 a, b, Grossnickle in. 1994, 1996, Grossnickle 1999, Grossnickle i Sutton 1999). Od początku lat dziewięćdziesiątych obserwuje się ciągły wzrost produkcji somatycznych siewek tego gatunku: w 1993 r. – 12 000 szt., w latach 1997/98 – 600 000 szt., a w następnych latach przewidywany jest wzrost produkcji do 1 mln (Grossnickle i Sutton 1999). W celach handlowych metodą somatycznej embriogenezy wyprodukowano w 1998 r. 50 000 szt. sadzonek *Picea sitchensis*, w 2000 r. – 1,45 mln *Picea glauca*, w latach 1999–2001 – 0,2 mln *Pinus taeda*, i w latach 2000–2001 – 0,5 mln *Pseudotsuga menziesii* (Cyr i in. 2001).

W Kanadzie możliwość włączenia do programu hodowli i selekcji drzew leśnych somatycznych siewek świerka białego [*Picea glauca* (Moench) Voss], najbardziej rozpowszechnionego gatunku w tym kraju, wykazał Park (2001) ze współpracownikami (1993, 1994, 1998). W 2000 r. roczna produkcja świerka białego do zalesień wynosiła tu 33 mln sadzonek. Lamhamedi i in. (2000) również podkreślali, że klonalne, masowe rozmnażanie wyselekcjonowanych genotypów drzew wysokiej wartości oraz ich hodowla na powierzchniach doświadczalnych dają większy zysk genetyczny niż można uzyskać z konwencjonalnych metod hodowli i selekcji. Stwierdzono, że siewki świerka białego uzyskane drogą somatycznej embriogenezy są dobrym materiałem do zalesień.

Obszerne badania nad określeniem możliwości wykorzystania somatycznej embriogenezy w hodowli selekcyjnej świerka pospolitego (*Picea abies* Karst.) wykonano również w Szwecji (Hogberg i in. 1998, 2001). Stwierdzono wyraźne różnice między rodami i wewnątrz rodów we wszystkich fazach somatycznej embriogenezy. Autorzy sugerują, że do inicjacji tkanki embriogennej należy zastosować dużo nasion (eksplantatów) z każdego rodzaju. Dzięki temu możliwe będzie szybsze zastosowanie na skalę gospodarczą najlepszych wyselekcjonowanych genotypów, niż przy zastosowaniu materiału sadzeniowego z nasion.

Dla ułatwienia masowej produkcji siewek somatycznych niektórzy autorzy (Gupta i in. 1991, 1999, Polonenko 1999, Ingram i Mavituna 2000) proponują zastosowanie bioreaktorów (dużych naczyń z płynnymi pożywkami, które są dobrze napowietrzane i mieszane). Stosuje się je do namnażania tkanki embriogennej i dojrzwania somatycznych zarodków. Przy zastosowaniu bioreaktorów chodzi nie tylko o zwiększenie efektywności uzyskania zarodków, ale przede wszystkim o usprawnienie metody i obniżenie kosztów produkcji materiału. Aby usprawnić przechowywanie, transport i wysiew somatycznych zarodków w niektórych laboratoriach rozwinięto technologię kapsułkowania somatycznych zarodków i uzyskiwania tą drogą tzw. sztucznych nasion. W tym celu stosowano głównie różnego typu otoczki alginianowe lub silikonowe, w których umieszczano uwodnione lub częściowo odwodnione somatyczne zarodki (Attree i in. 1994, Mała i in. 1995). Somatyczne zarodki świerka pospolitego oraz daglezi zabezpieczane specjalnymi otoczkami (dodatkowo uzupełnionymi o substancje odżywcze i grzybobójcze) są z sukcesem wysiewane w szkółce w Weyerhaeuser, USA (Gupta 1999). Siewki somatyczne wysadzone w tej szkółce charakteryzowały się bardziej jednolitym wzrostem i fenologią wewnątrz klonu niż siewki z nasion oraz miały taką samą morfologię jak siewki zygotyczne (Gupta i in. 1996). Badania nad somatyczną embriogenezą prowadzone w licznych laboratoriach na świecie doprowadziły do wielu rozwiązań technologicznych, które w większości są opatentowane (Cyr i Klimaszewska 2002).

Kalus embriogeny oraz podsuszane somatyczne zarodki, dzięki możliwości długoterminowego przechowywania w ciekłym azocie (kriokonserwacja), wykorzystywane są również w celu zakładania banków klonów drzew leśnych (Cyr 1999). Stwarza to możliwość przechowywania genotypów drzew, wcześniej wy-

selekcjonowanych na powierzchniach doświadczalnych, a następnie rozmnożenie ich i regenerację siewek w kulturach *in vitro*. Ponadto, kriokonserwacja tkanek różnych genotypów może stanowić uzupełniającą metodę zachowania zasobów genowych drzew leśnych *ex situ* (Matras *in in.* 1993, Blakesley *in in.* 1996, Chmielarz 1998).

Przedstawione w tej pracy liczne badania nad somatyczną embriogenezą wykazują, że istnieje możliwość zakładania wysoce produkcyjnych lasów z wyselekcjonowanych klonów uwzględniających zarówno potrzeby gospodarki leśnej jak i przemysłu.

Biorąc pod uwagę zalety mikrorozmnażania i dotychczasowe dobre wyniki zastosowania tej metody dla gatunków drzew leśnych, również w Zakładzie Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych Instytutu Badawczego Leśnictwa podjęto badania nad możliwością rozmnażania przez somatyczne zarodki wybranych gatunków drzew iglastych, uwzględniające polski materiał różnego pochodzenia.

Praca została złożona 19.02.2005 r. i przyjęta przez Komitet Redakcyjny 21.03.2005 r.

LITERATURA

- Adams G. W., Doiron M. G., Park Y. S. Bonga J. M., Charest P. J. 1994: Commercialization potential of somatic embryogenesis in black spruce tree improvement. *For. Chron.*, 70 (5): 593-598.
- Aitken-Christie J. 2001: Somatic embryogenesis for large-scale clonal testing and propagation of elite material. International Conference on: Wood, Breeding, Biotechnology and Industrial Expectations. Abst. Bordeaux, France: 9.
- Attree S. M., Bekkaoui F., Dunstan D. I., Fowke L. C. 1987: Regeneration of somatic embryos from protoplasts isolated from an embryogenic suspension culture of white spruce (*Picea glauca*). *Plant Cell Rep.*, 6: 480-483.
- Attree S. M., Budimir S., Fowke L. C. 1990: Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured shoots and cotyledons of seedlings from stored seeds of black and white spruce (*Picea mariana* and *P. glauca*). *Can. J. Bot.*, 68: 30-34.
- Attree S. M., Moore D., Sawhney V. K., Fowke L. C. 1991: Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce (*Picea glauca* (Moench.) Voss) somatic embryos: effects of non-plasmolyzing water stress and abscisic acid. *Ann. Bot.*, 68: 519-525.
- Attree S. M., Pomeroy M.K., Fowke L.C. 1994: Production of vigorous, desiccation tolerant white spruce (*Picea glauca* (Moench.) Voss) synthetic seeds in bioreactor. *Plant Cell Rep.*, 13 (11): 601-606.
- Bajaj Y. P. S. 1995: Somatic embryogenesis and its applications for crop improvement. [W:] *Somatic Cell Genetics of Woody Plants*. Bajaj Y. P. S. (Red.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands: 1-18.
- Becwar M. R. 1993: Conifer somatic embryogenesis and clonal forestry. [W:] *Clonal Forestry I. Genetics and Biotechnology* (red. M. R. Ahuja, W. J. Libby). 201-223.
- Becwar M. R., Noland T. L., Wann S. R. 1987: Somatic embryo development and plant regeneration from embryogenic Norway spruce callus. *Tappi J.*, 70: 155-160.
- Becwar M. R., Wann S. R., Johnson M. A., Verhagen S. A., Feire R. P., Nagmani R. 1988: Development and characterization of *in vitro* embryogenic systems in conifers (red. Ahuja M.

- R.). [W:] Somatic Cell Genetics and Woody Plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 1-18.
- Becwar M. R., Noland T. L., Wyckoff J. L. 1989: Maturation, germination and conversion of Norway spruce (*Picea abies* L.) somatic embryo to plants. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 25: 575-580.
- Becwar M. R., Nagmani R., Wann S. R. 1990: Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Can. J. For. Res.*, 20: 810-817.
- Becwar M. R., Pullman G. S. 1995: Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). [W:] Somatic Embryogenesis in Woody Plants. (red. Jain S., Gupta P., Newton R.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands, 3: 287-301.
- Bellarosa R., Mo L. H., von Arnold S. 1992: The influence of auxin and cytokinin on proliferation and morphology of somatic embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *Ann. Bot.*, 70: 199-206.
- Blakesley D., Pask N., Henshaw G. G., Fay M. F. 1996: Biotechnology and the conservation of forest genetic resources: in vitro strategies and cryopreservation. *Plant Growth Regul.*, 20 (1): 11-16.
- Bozhkov P. V., von Arnold S. 1998: Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. *Physiol. Plant.* 104: 211-224.
- Braumüller S., Ross H., Rahmad A., Zoglauer K. 2001: Somatic embryogenesis in silver fir (*Abies alba* Mill.). International Conference on: Wood, Breeding, Biotechnology and Industrial Expectations. Abst. Bordeaux, France, 62.
- Chalupa V. 1985: Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *Comm. Inst. For. Cech.*, 14: 57-63.
- Chalupa V. 1990: Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of Oak (*Quercus robur* L.) and Linden (*Tilia cordata* Mill.). *Plant Cell Rep.*, 9: 398-401.
- Chalupa V., Durzan D. J. 1973: Growth and development of resting buds of conifers in vitro. *Can. J. For. Res.*, 3: 196-208.
- Chen Z., Yao Y., Zhang L. 1988: Studies on embryogenesis of woody plants in China (red. M. R. Ahuja). [W:] Somatic Cell Genetics of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 19-25.
- Chmielarczyk P. 1998: Reakcja roślin na niskie temperatury. Metody kriokonserwacji komórek i organów roślin w ciekłym azocie. Instytut Dendrologii PAN. Wydawnictwo Z. Bartkowiak. Poznań.
- Cornu D. 1988: Somatic embryos in tissue cultures of walnuts (*Juglans nigra*, *J. major* and hybrids *J. nigra* × *J. regia*). (red. M. R. Ahuja). [W:] Somatic Cell Genetics of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, 45-49.
- Cornu D., Geoffrion C. 1990: Aspects de l'embryogenèse somatique chez le mélèze. *Bull. Soc. Bot. Fr. Actual. Bot.*, 137: 25-34.
- Cyr D. R. 1999: Cryopreservation of embryogenic cultures of conifers and its application to clonal forestry. [W:] Somatic Embryogenesis in Woody Plants (red. S. M. Jain, P. K. Gupta, R. J. Newton). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. 4: 239-261.
- Cyr D. R., Attree S. M., El-Kassaby A., Ellisd D., Polonenko D. R., Sutton B. C. S. 2001: Application of somatic embryogenesis to tree improvement in conifers. *Molecular Breeding of Woody Plants* (red. N. Morohoshi, A. Komamine). Proceedings of the International Wood Biotechnology Symposium. Narita, Chiba. Japonia. Elsevier Science: 305-312.
- Cyr D. R., Klimaszewska K. 2002: Conifer somatic embryogenesis: II Applications. *Dendrobiology*, 48: 41-49.
- Dronne S., Label P., Lelu M.A. 1997: Desiccation decreases abscisic acid content in hybrid larch (*Larix × leptoeuropea*) somatic embryos. *Physiol. Plant.*, 99: 433-438.
- Dunstan D.I. 1988: Prospects and progress in conifer biotechnology. *Can. J. For. Res.*, Vol. 18 (12): 1497-1506.
- Dunstan D. I., Dong J. Z., Carrier D. J., Abrams S. R. 1988: Events following ABA treatment of spruce somatic embryos. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.*, 34: 159-168.
- Dunstan D. I., Berry S., Bock C. A. 1994: ABA consumption in Norway spruce (*Picea abies*) and white spruce (*Picea glauca*) somatic embryo cultures. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 30P: 156-159.

- Dunstan D. I., Tautorus T. E., Thorpe T. A. 1995: Somatic embryogenesis in woody plants. [W:] *In vitro Embryogenesis in Plants*. (red. T. A. Thorpe). Kluwer Academic Publishers The Netherlands, 471-538.
- Durzan D. J., Steward F. C. 1968: Cell and tissue culture of white spruce and jack pine. *Bi-Mon. Res. Notes Can. For. Serv.*, 24: 30.
- Durzan D. J., Chalupa V. 1976: Growth and metabolism of cells and tissue of jack pine (*Pinus banksiana*). 3. Growth of cells in liquid suspension cultures in light and darkness. *Can. J. Bot.*, 54: 456-467.
- Ebert A., Taylor H. F. 1990: Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 20: 165-172.
- Egerstodter U., von Arnold S. 1991: Protoplast culture from to different types of embryogenic cell – lines of *Picea abies*. Eight International Protoplast Symposium. *Physiol. Plant.* 82: 1,A13.
- Erdelsky K., Barancok P. 1986: Cultivating embryos of the silver fir (*Abies alba* Mill.) *in vitro*. *Acta Fac. Rer. Nat. Univ. Com. Physiol. Plant.*, 23: 25-29.
- Filonova L. H., Bozhkov P. V., von Arnold S. 2000a. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J. Exp. Bot.*, 51: 249-264.
- Filonova L. H., Bozhkov P. V., Brukhin V. B., Daniel G., Zhivotovsky B., von Arnold S. 2000b. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *J. Cell Sci.*, 113: 4399-4411.
- Gautheret R. J. 1934: Culture du tissu cambial. *Acad. Sci. Paris.*, 198: 2195-2196.
- Gautheret R. J. 1940: Nouvelles recherches sur le bourgeonnement du tissu cambial d'*Ulmus campestris* cultive *in vitro*. *C. R. Acad. Sci. Paris.*, 210: 744-746.
- Grossnickle S. C. 1999: Performance of conifer stock produced through somatic embryogenesis. [W:] *Somatic Embryogenesis in Woody Plants* (red. S. M. Jain, P. K. Gupta, R. J. Newton). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London. 4: 97-123.
- Grossnickle S. C., Major J. E. 1994a: Interior spruce seedlings compared to emblings produced from somatic embryogenesis. II. Stock quality assessment prior to field planting. *Can. J. For. Res.*, 24: 1385-1396.
- Grossnickle S. C., Major J. E. 1994b: Interior spruce seedlings compared to emblings produced from somatic embryogenesis. III. Physiological response and morphological development on a reforestation site. *Can. J. For. Res.*, 24: 1397-1407.
- Grossnickle S. C., Major J. E., Folk R. S. 1994: Interior spruce seedlings compared to emblings produced from somatic embryogenesis. I. Nursery development, fall acclimation, and over-winter storage. *Can. J. For. Res.*, 24: 1376-1384.
- Grossnickle S. C., Cyr D., Polonenko D. R. 1996: Somatic embryogenesis tissue culture for the propagation of conifer seedlings: A technology comes of age. *Tree Planters' Notes.* 47: 48-57.
- Grossnickle S. C., Sutton B. C. S. 1999: Applications of biotechnology for forest regeneration. *New For.*, 17: 213-226.
- Gupta K. P. 1999: Somatic embryogenesis for clonal forestry. The third international symposium in the series Recent Advances in Plant Biotechnology. Stara Lešna, Slovak Republik. Abst. 159-161.
- Gupta P. K., Durzan D. J. 1985: Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Rep.*, 4: 177-179.
- Gupta P. K., 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.
- Gupta P. K., Timmis R., Pullman G., Yancey M., Kreitinger M., Carlson W., Carpenter C. 1991: Development of an embryogenic system for automated propagation of forest trees. [W:] *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. (red. I. K. Vasil). Academic Press, San Diego. 8: 75-93.
- Gupta P. K., Pullman G., Timmis R., Kreitinger M., Carlson W. C., Grob J. A., Welty D. E. 1993: Forestry in the 21st century: The biotechnology of somatic embryogenesis. *Bio-Technology.* 11: 454-459.
- Gupta P. K., Grob J. A. 1995: Somatic embryogenesis in conifer. [W:] *Somatic Embryogenesis in Woody Plants* (red. S. Jain, P. Gupta, R. Newton). Netherlands. 1: 81-98.

- Gupta K. P., Timmis R., Timmis K. A., Carlson W. C., Grob J. A., Welty D. E. 1996: Clonal propagation of conifers *via* somatic embryogenesis. [W:] Somatic Cell Genetics and Molecular Genetics of Trees. (red. M. R. Ahuja, W. Boerjan, D. B. Neale), 3-9.
- Gupta K. P., Timmis R., Altman A., Ziv M., Izhar S. 1999: Conifer somatic embryo production from liquid culture. Proceedings of the IXth International Congress of the International Association of Plant Tissue Culture and Biotechnology. Jerusalem, Israel. 1998. Current Plant Sci. Biotech. Agr. 36: 49-52.
- Hakman I., von Arnold S. 1985: Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (Norway spruce). J. Plant Physiol., 121: 149-158.
- Hakman I., Fowke L. C., von Arnold S., Eriksson T. 1985: The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). Plant Sci., 38: 53-59.
- Harvengt L., Trontin J. F., Reymond I., Canlet F., Paques M. 2001: Molecular evidence of true-to-type propagation of 3-year old Norway spruce through somatic embryogenesis. Planta., 213: 5. 828-832.
- Hay I. E., Charest P. J. 1999: Somatic embryo germination and desiccation tolerance in conifers. [W:] Somatic Embryogenesis in Woody Plants (red. M. S. Jain, P. K. Gupta, R. J. Newton). 4: 61-96.
- Hogberg K. A., Ekberg I., Norell L., von Arnold S. 1998: Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programme: a case study with *Picea abies*. Can. J. For. Res., 28: 1536-1545.
- Hogberg K. A., Bozhkov P. V., Gronroos R., von Arnold S. 2001: Critical factors affecting ex vitro performance of somatic embryo plants of *Picea abies*. Scand. J. For. Res., 16: 295-304.
- Hristoforoglu K., Schmidt J., Bolhar-Nordenkamp H. 1995: Development and germination of *Abies alba* somatic embryos. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 40: 277-284.
- Ingram B., Mavituna F. 2000: Effect of bioreactor configuration on the growth and maturation of *Picea sitchensis* somatic embryos cultures. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 61 (2): 87-96.
- Isabel N., Tremblay F.M. 1995: Somatic embryogenesis in red spruce (*Picea rubens* Sarg.). [W:] Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Jain S., Gupta P., Newton R. (Red.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 3: 111-123.
- Jacquot C. 1949: Observations sur la neoformation de bourgeons chez le tissu cambial d'*Ulmus campestris* cultive in vitro. C. R. Acad. Sci. Paris., 229: 529-530.
- Jacquot C. 1955: Formation d'organes par le tissue cambial d'*Ulmus campestris* L. et de *Betula verrucosa* Gaertn. cultives in vitro. C. R. Acad. Sci. Paris., 240: 557-558.
- Jain S. M., Newton R. J., Soltes E. J. 1988: Enhancement of somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies* L.). Theor. Appl. Genet. 76: 501-506.
- Jorgensen J. 1988: Embryogenesis in *Quercus petraea* and *Fagus silvatica*. J. Plant Physiol., 132: 638-640.
- Kendurkar S. V., Nadgouda R. S., Phadke C. H., Jana M. M. Shirke S. V., Mascarenhas A. F. 1995: Somatic embryogenesis in some woody angiosperms (red. S. Jain, P. Gupta, R. Newton). [W:] Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 1: 49-79.
- Klimaszewska K. 1989: Recovery of somatic embryos and plantlets from protoplast cultures of *Larix x eurolepis*. Plant Cell Rep., 8: 440-444.
- Klimaszewska K., Cyr D.R. 2002: Conifer somatic embryogenesis: I. Development. Dendrobiology. 48: 31-39.
- Krogstrup P. 1986: Embryo-like structures from cotyledons and ripe embryos of Norway spruce (*Picea abies*). Can. J. For. Res., 16: 664-668.
- Lamhamedi M. S., Chamberland H., Bernier P., Tremblay F. M. 2000: Clonal variation in morphology, growth, physiology, anatomy and ultrastructure of container-grown white spruce somatic plants. Tree Physiol., 20: 869-880.
- Lelu M. A., Boulay M., Arnaud Y. 1987: Obtention de cals embryogènes à partir de cotylédons de *Picea abies* (L.) Karst. prélevés sur de jeunes plantes âgées de 3 à 7 jours après germination. C. R. Acad. Sci. Ser., 3, 305: 105-109.
- Lelu M. A., Bornman C. H. 1990: Induction of somatic embryogenesis in excised cotyledons of *Picea glauca* and *Picea mariana*. Plant Physiol. Biochem., 28 (6): 785-791.

- Lelu M. A., Boulay M. P., Bornman C. H. 1990: Somatic embryogenesis in cotyledons of *Picea abies* is enhanced by an adventitious bud-inducing treatment. *New For.*, 4: 125-135.
- Lelu M. A., Klimaszewska K., Charest P. J. 1994: Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix*. *Can. J. For. Res.*, 24: 100-106.
- Lelu M. A., Klimaszewska K., Pflaum G., Bastien K. 1995: Effect of maturation duration on desiccation tolerance in hybrid larch (*Larix × leptoeuropea* Dengler) somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 31: 15-20.
- Litvay J. D., Verma D. C., Johnson M. A. 1985: Influence of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Rep.*, 4: 325-328.
- Mala J., Dujickova M., Kalal J. 1995: The development of encapsulated somatic embryos of spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Comm. Inst. For. Bohemicae*. 18: 59-74.
- Malepszy S., Wróblewski T. 1994: Proces somatycznej embriogenezy – charakterystyka ogólna. Somatyczna embriogeneza i jej molekularno-genetyczne uwarunkowania u roślin. (red. S. Malepszy). *Post. Biol. Kom.*, T. 21. Supl. 4: 1-10.
- Matras J., Burzyński G., Czart J., Fonder W., Korczyk A., Puchniarski T., Tomczyk A., Załęski A. 1993: Program zachowania leśnych zasobów genowych i hodowli selekcyjnej drzew leśnych w Polsce na lata 1991–2010. DGLP, IBL Warszawa.
- Minocha S. C., Minocha R. 1995: Historical aspects of somatic embryogenesis in woody plants. [W:] *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. (red. S. Jain, P. Gupta, R. Newton). Kluwer Academic Publishers. The Netherlands, 1: 9-22.
- Młodzianowski F. 1984: Podziały oraz różnicowanie się komórek w hodowli in vitro. *Hodowla komórek i tkanek roślinnych* (red. M. Zenkteler). PWN. Warszawa. 11-17.
- Murashige T., Skoog F. 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Nagmani R., Bonga J. M. 1985: Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. *Can. J. Res.*, 15: 1088-1091.
- Orlikowska T. 1997: Regulatory roślinne w kulturach in vitro. [W:] *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Zastosowanie w ogrodnictwie, rolnictwie, leśnictwie i kulturach tkanek*. (red. L. S. Jankiewicz). PWN. Warszawa. 2: 219-247.
- Park Y. S. 2001: Implementation of somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment strategies. *International Conference on: Wood, Breeding, Biotechnology and Industrial expectations*. Abst. Bordeaux, France. 106.
- Park Y. S., Pond S. E., Bonga J. M. 1993: Initiation of somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control, culture treatment effects and implication for tree breeding. *Theor. Appl. Genet.*, 86: 427-436.
- Park Y. S., Pond S. E., Bonga J. M. 1994: Somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control in somatic embryos exposed to storage, maturation treatments, germination and cryopreservation. *Theor. Appl. Genet.*, 89: 742-750.
- Park Y. S., Barret 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. Dev. Biol.*, 34: 231-239.
- Polonenko D. R. 1999: Challenges and issues in scaling commercial production of conifer somatic embryogenesis. *Biological and engineering aspects of plant cell bioreactor technology*. *Congress on In Vitro Biology. In Vitro Cell Develop. Biol. Plant.*, 35 (4): 299-302.
- Preece J. E., Zhao J. L., Kung F. H. 1987: In vitro callus production and somatic embryogenesis of ash, *Fraxinus* sp. *Hort. Sci.*, 22: 1131.
- Raemakers K., Jacobsen E., Visser R. 1999: Proliferative somatic embryogenesis in woody species. [W:] *Somatic Embryogenesis in Woody Plants* (red. S. Jain, P. Gupta, R. Newton). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 4: 29-59.
- Rao P. S. 1965. In vitro induction of embryonal proliferation in *Santalum album* L. *Phytomorphology*. 15: 175-179.

- Roberts D. R., Flin B. S., Webb D. T., Webster F., Sutton B. C. S. 1990a: Abscisic acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce. *Physiol. Plant.*, 78: 335-360.
- Roberts D. R., Sutton B. C. S., Flinn B. S. 1990b: Synchronous and high frequency germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity. *Can. J. Bot.*, 68: 1086-1090.
- Roberts D. R., Lazarof W. R., Webster F. B. 1991: Interaction between maturation and high relative humidity treatments and their effects on germination of Sitka spruce somatic embryos. *J. Plant Physiol.*, 138: 1-6.
- Ruaud J. N. 1993: Maturation and conversion into plantlets of somatic embryos derived from needles and cotyledons of 7-56-day old *Picea abies*. *Plant Sci.*, 92: 213-220.
- Ruaud J. N., Bercetche J., Paques M. 1992: First evidence of somatic embryogenesis from needles of 1-year-old *Picea abies* plants. *Plant Cell Rep.*, 11: 563-566.
- Salajova T., Salaj J., Jasik J., Kormutak A. 1995: Somatic embryogenesis in *Pinus nigra* Arn. [W:] Somatic embryogenesis in Woody Plants. Jain S. M., Gupta P. K., Newton R. J. (Red.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, 207-220.
- Salajova T., Salaj J. 2001: Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cotyledon explants isolated from emblings and seedlings of hybrid firs. *J. Plant Physiol.*, 158: 747-755.
- Schenck R. U., Hildebrandt A. C. 1972: Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 50: 199-204.
- Sharp W. R., Sondahl M. R., Caldas L. S., Maraffa S. B. 1980: The physiology of in vitro asexual embryogenesis. *Hort. Rev.*, 2: 268-310.
- Sharp W. R., Evans D. A., Sondahl M. R. 1982: Application of somatic embryogenesis to crop improvement. Proc. 5th Intern. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, Japanese Assoc. for Plant Tissue Culture (red. A. Fujiwara). *Plant Tiss. Cult.*, 759-762.
- Smith D. R. 1997: The role of *in vitro* methods in pine plantation establishment: the lesson from New Zealand. *Plant Tiss. Cult. Biotech.*, 3: 63-73.
- Steward F. C. 1958: Growth and development of cultivated cells. III. Interpretations of the growth from free cell of carrot. *Amer. J. Bot.*, 45: 709-713.
- Szczygieł K., Kowalczyk J. 2001: Somatic embryogenesis of Silver fir (*Abies alba* Mill.) Polish provenances. Proceedings of the Fourth International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, 2000. Tampere, Finlandia. *Acta Hort.*, 560: 509-512.
- Tautorus T. E., Fowke L. C., Dunstan D. I. 1991: Somatic embryogenesis in conifers. *Can. J. Bot.* 69: 1873-1899.
- Thorpe T. A., Biondi S. 1984: Conifers. Handbook of plant cell culture (red. W. R. Sharp, A. Evans, P. V. Ammirato, Y. Yamada). MacMillian Publishing Co. New York. 435-470.
- Tremblay L., Tremblay F. 1995: Maturation of black spruce somatic embryos: sucrose hydrolysis and resulting osmotic pressure of the medium. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 42: 39-46.
- Vagner M., Vondrakova Z., Strnadova Z., Eder J., Machackova I. 1998: Endogenous levels of plant growth hormones during early stages of somatic embryogenesis of *Picea abies*. *Adv. Hort. Sci.*, 12: 11-18.
- Von Aderkas P., Klimaszewska K., Bonga J. 1990: Diploid and haploid embryogenesis in *Larix leptolepis*, *L. decidua*, and their reciprocal hybrids. *Can. J. For. Res.*, 20: 9-14.
- Von Aderkas P., Lelu M. A., Label P. 2001: Plant growth regulator levels during maturation of larch somatic embryos. Edision scientifiques et medicales Elsevier SAS. *Plant Physiol. Biochem.*, 39: 495-502.
- Von Aderkas P. 1992: Embryogenesis from protoplasts of haploid European larch. *Can. J. For. Res.*, 22, 3: 397-402.
- Von Arnold S. 1987: Improved efficiency of somatic embryogenesis in mature embryos of *Picea abies*. *J. Plant. Physiol.*, 128: 233-244.
- Von Arnold S., Eriksson T. 1981: In vitro studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Can. J. Bot.*, 59: 870-874.

- Wang Q. Z., Wang Z. X., Zhang X. H. 1982: Initial success in the culture of monoploid plants from the unpollinated ovary of *Robinia pseudoacacia*. For. Abstr., 43: 845.
- White P. R. 1934: Potentially unlimited growth of excised plant callus in artificial nutrient. Plant Physiol., 9: 585-600.
- Winton L. L. 1970: Shoot and tree production from aspen tissue cultures. Am. J. Bot., 57: 904-909.