



## Somatyczna embriogeneza roślin iglastych na przykładzie świerka pospolitego (*Picea abies* [L.] Karst.)

Monika Joanna Latkowska

Katedra Roślin Ozdobnych, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

### Somatic embryogenesis of coniferous plants with Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) as a model for studies

#### Summary

Somatic embryogenesis is a relatively new method of vegetative propagation of conifers. Many possibilities of its application include: cloning of trees for reforestation and timber production – varieties resistant to environmental stresses, pests and diseases, as well as valuable ornamental varieties; conservation of rare and endangered species; provision of cell lines and protoplasts for genetic manipulations; germplasm preservation; synthetic seed production and use in basic research on conifer genetics and development.

Conifer somatic embryogenesis was first reported in *Picea abies* (1,2) and *Larix decidua*, in 1985 (3). Since then, this technology has been applied to more than 30 coniferous species from the genera: *Abies*, *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudotsuga*, *Sequoia*, *Taxus* (4-7).

As the general development pattern is similar for many conifers, the protocol of Norway spruce can be used as a model system of somatic embryogenesis in conifers. This protocol can be divided into six stages: 1) induction of embryogenic structures, 2) proliferation of embryogenic cultures, 3) maturation of somatic embryos, 4) embryo desiccation, 5) *in vitro* germination and conversion, and 6) transfer of embryos to soil (8).

#### Key words:

biotechnology, conifers, micropropagation, Norway spruce, somatic embryogenesis.

#### Adres do korespondencji

Monika Joanna Latkowska,  
Katedra Roślin  
Ozdobnych,  
Szkoła Główna  
Gospodarstwa Wiejskiego,  
ul. Nowoursynowska 166,  
02-787 Warszawa.

## 1. Somatyczna embriogeneza roślin iglastych

Somatyczna embriogeneza to jeden ze sposobów bezpłciowego rozmnażania roślin, w którym różnicowane są zarodki somatyczne. Wykazuje on wiele analogii z procesem embriogenezy zygotycznej, od której różni się tym, że zarodki nie powstają na skutek łączenia się gamet, lecz z pojedynczych komórek somatycznych lub ich grup (9).

Od czasu pierwszych obserwacji tworzenia się zarodków somatycznych w kulturach zawieszinowych *Daucus carota* (10,11), proces somatycznej embriogenezy został opisany dla wielu gatunków roślin okrytozalążkowych (9) i nagozalążkowych (5). Pierwsze doniesienia o indukcji kultur embriogenicznych roślin iglastych i produkcji dojrzałych zarodków somatycznych pojawiły się 15 lat temu i dotyczyły dwóch gatunków: *Picea abies* (1,2,12) i *Larix decidua* (3). Od tego czasu technologia somatycznej embriogenezy roślin iglastych została znacząco udoskonalona. Indukcja struktur embriogenicznych i produkcja dojrzałych zarodków somatycznych są coraz wydajniejsze, a liczba gatunków, u których uzyskano regenerację roślin na drodze embriogenezy somatycznej stale wzrasta (4,5). Procedura somatycznej embriogenezy, jak dotąd, została opracowana dla ponad 30. gatunków roślin iglastych z rodzajów: *Abies*, *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudotsuga*, *Sequoia* oraz *Taxus* (4-7).

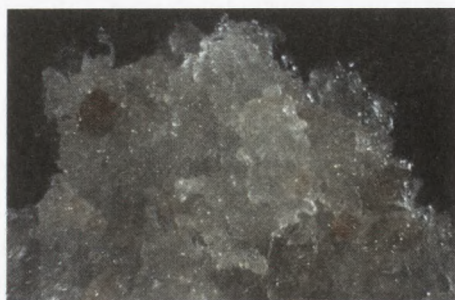
Ogólny model rozwoju zarodków somatycznych jest podobny dla wielu roślin iglastych i dlatego świerk pospolity może być traktowany jako gatunek modelowy w badaniach nad somatyczną embriogenezą tej grupy roślin.

## 2. Proces somatycznej embriogenezy *Picea abies*

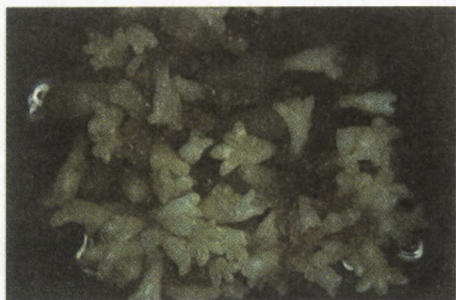
W procesie reprodukcji świerka pospolitego na drodze somatycznej embriogenezy można wyróżnić kilka odrębnych etapów, związanych z poszczególnymi stadiami rozwoju zarodków somatycznych i zróżnicowanymi warunkami kultury (8). Są to kolejno:

- 1) indukcja struktur embriogenicznych,
- 2) proliferacja kultur embriogenicznych (fot. 1a),
- 3) dojrzewanie zarodków somatycznych (fot. 1b),
- 4) dosuszanie (desykacja) dojrzałych zarodków somatycznych (fot. 1c),
- 5) kiełkowanie zarodków somatycznych (fot. 1d) i wzrost siewek *in vitro* (fot. 1e),
- 6) aklimatyzacja roślin przesadzonych do podłoża mineralnego (fot. 1f).

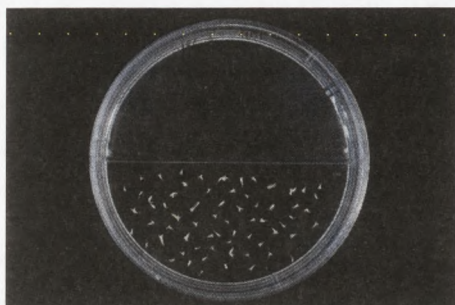




a



b



c



d



e



f

Fot. 1. Reprodukacja świerka pospolitego na drodze somatycznej embriogenezy: proliferacja tkanki embriogenicznej (a), dojrzewanie zarodków somatycznych (b), dosuszenie (c) i kielkowanie zarodków (d), wzrost siewek *in vitro* (e) i aklimatyzacja roślin (f).

## 2.1. Indukcja struktur embriogenicznych

### 2.1.1. Typy eksplantatów

W pierwszych doniesieniach o somatycznej embriogenezie *Picea abies* pisano o wykorzystaniu do indukcji kultur embriogenicznych niedojrzałych (1,2) lub dojrzałych zarodków zygotycznych (1). Później stosowano też starsze eksplantaty inicjalne, takie jak liścienie kilkudniowych siewek (13), 18- i 36-dniowe siewki (14), igły 14-miesięcznych roślin wyprowadzonych z zarodków somatycznych (15), a nawet igły 26-letnich drzew świerka (16). Kultury embriogeniczne *Picea abies* indukowano także z dojrzałych zarodków somatycznych (17) oraz protoplastów pochodzących z embriogenicznych zawieszin komórkowych (18). W masowej reprodukcji świerka pospolitego najczęściej jako eksplantaty inicjalne wykorzystywane są zarodki zygotyczne. Istnieje bowiem zależność, że z wiekiem eksplantatu zmniejsza się liczba komórek wykazujących totipotencję i maleje jego zdolność do tworzenia struktur embriogenicznych. Dla stosowanych jako eksplantaty inicjalne niedojrzałych zarodków zygotycznych częstotliwość indukcji wynosi prawie 100% (12), dla dojrzałych zarodków około 50% (19), zaś dla siewek średnio 40% (14).

### 2.1.2. Warunki indukcji

Indukcja tkanki embriogenicznej świerka przeprowadzana jest zazwyczaj w ciemności (12,20). Struktury embriogeniczne mogą być inicjowane na różnych pożywkach podstawowych (20), w większości będących zmodyfikowanymi formami pożywki MS (21), takich jak: LP (22), DCR (23), BMI-S1 (24), a także na pożywce LM (25), opracowanej na podstawie biochemicznego składu megagametofitu roślin iglastych. Zmodyfikowana pożywka MS o pełnym składzie makro- i mikroelementów daje dobre rezultaty w indukcji tkanki embriogenicznej, gdy eksplantatami inicjalnymi są niedojrzałe zarodki zygotyczne, jest jednak mniej efektywna, gdy wykorzystuje się dojrzałe zarodki. W tym przypadku korzystne okazało się zredukowanie o połowę stężenia pożywki indukcyjnej i wprowadzenie do niej organicznych związków azotowych, np. L-glutaminy i asparaginy.

Indukcja tkanki embriogenicznej świerka przeprowadzana jest na pożywce stałej, zawierającej auksynę i cytokinę (stosunek molarny 2:1). Inicjowaniu struktur embriogenicznych u eksplantatów pochodzących z siewek sprzyja wstępne umieszczenie ich na pożywce o wysokiej zawartości cytokininy (13,26). Obecność auksyny w pożywce stymuluje podziały mitotyczne komórek oraz powstawanie stref merystematycznych, utrzymuje właściwości totipotencjalne tkanki i warunkuje tworzenie się struktur embriogenicznych. Cytokininy natomiast stymulują wzrost komórek, a w obecności auksyny także ich podział (27). Regulatorami wzrostu stosowany-



mi najczęściej do indukcji struktur embriogenicznych świerka są 2,4-D (kwas 2,4-dwu-chlorofenoksyoctowy) i BA (6-benzyloaminopuryna). Wykorzystywane są też takie auksyny, jak NAA (kwas  $\alpha$ -naftylooctowy), IAA (kwas  $\beta$ -indoliloctowy), Picloram (kwas 4-amino-3,5,6-trichloropikolinowy) oraz cytokiny: kinetyna, zeatyna, 2iP (N-izopentenyloadenina) (2,12).

Na indukcję struktur embriogenicznych świerka mają wpływ także inne składniki pożywki, takie jak: sacharoza, substancje zestalające (ich rodzaj i stężenie) oraz związki azotowe (19,28,29). Optymalne stężenie sacharozy wynosi zazwyczaj 1-3% i zależy od dojrzałości eksplantatu inicjalnego, zawartości innych składników pożywki oraz stężenia substancji zestalającej (19). Organiczne formy azotu, takie jak asparagina i glutamina, działają stymulująco na indukcję tkanki embriogenicznej i jej dalszą proliferację, a optymalny dla indukcji stosunek formy amonowej do azotanowej wynosi 1:5 (29).

### 2.1.3. Pochodzenie struktur embriogenicznych

Na pożywce zawierającej auksynę i cytokininę z eksplantatu inicjalnego mogą powstawać trzy rodzaje tkanki (2,30):

1) zielona, ziarnista tkanka z centrami merystematycznymi, z których mogą rozwijać się pąki przybyszowe,

2) nieembriogeniczny kalus, złożony z małych, okrągłych komórek,

3) półprzezroczysta, kleista tkanka embriogeniczna, w której między niezorganizowanymi grupami komórek występują liczne biegunowe struktury embriogeniczne.

Tkanka embriogeniczna świerka pospolitego różnicuje się z komórek eksplantatu inicjalnego na drodze embriogenezy bezpośredniej. Struktury embriogeniczne mogą różnicować się z liścieni, hypokotylu lub epikotylu zarodków zygocyticznych i siewek *Picea abies* (14). Najprawdopodobniej powstają one na drodze podziałów pojedynczych komórek hypokotylu (31) lub z wielokomórkowych struktur merystematycznych liścieni (14). Pierwsze oznaki różnicowania się struktur embriogenicznych obserwuje się w czasie początkowych czterech tygodni kultury na pożywce indukcyjnej. W niektórych przypadkach powstają one pojedynczo na eksplantacie, w innych pokrywają całą jego powierzchnię (14). Tkanek embriogeniczną można łatwo odróżnić od struktur nieembriogenicznych, ze względu na jej śluzowaty, szklisty wygląd.

### 2.2. Proliferacja kultur embriogenicznych

Embriogeniczne struktury powstające z eksplantatu inicjalnego zaczynają proliferować, dając początek liniom komórkowym. Nie wszystkie zaindukowane linie kontynuują jednak proliferację. U świerka pospolitego tylko 5-15% eksplantatów inicjalnych staje się źródłem proliferujących kultur embriogenicznych (14).



Najwcześniejsze stadia rozwoju zarodków somatycznych świerka zostały najlepiej poznane w kulturach zawieszinowych. W zaindukowanych liniach embriogenicznych stwierdzono obecność dwóch typów komórek: silnie zwakuolizowanych i wydłużonych oraz – zaokrąglonych, o gęstej cytoplazmie. W większości tworzą one agregaty o różnej wielkości i formie, które określane są mianem mas proembriogenicznych (PEM, *proembryogenic masses*) (32). W zależności od ich morfologii i stopnia rozwoju wyróżnia się wśród nich trzy stadia: PEM I, PEM II i PEM III. W odpowiednich warunkach z PEM III mogą różnicować się niedojrzałe zarodki somatyczne o biegunowej budowie. W zależności od linii komórkowej i warunków kultury ich liczba jest różna, ale zazwyczaj w gramie świeżej masy tkanki embriogenicznej znajduje się od 200 do około 1500 zarodków (33). Składają się z małych, ściśle ułożonych komórek merystematycznych, tworzących zarodki właściwe i wyrastających z nich wydłużonych komórek, tworzących suspensory (fot. 2b). Komórki części embrionalnej charakteryzują się gęstą cytoplazmą z licznymi organellami i dużymi jądrami, komórki suspensora są natomiast silnie zwakuolizowane. Morfologia niedojrzałych zarodków somatycznych jest bardzo podobna u różnych gatunków *Picea* sp., odznaczają się one też dużym podobieństwem do zarodków zygocyticznych świerka (2,34).

Proliferyjące na pożywce stałej kultury tkanki embriogenicznej wielu genotypów mogą być utrzymywane przez szereg lat, bez utraty zdolności do tworzenia dojrzałych zarodków somatycznych (35).

### 2.2.1. Rola auksyn i cytokinin w proliferacji tkanki embriogenicznej

Prolifercja kultur embriogenicznych odbywa się na pożywce o podobnym składzie jak stosowana do indukcji, zwykle jednak na tym etapie używane są niższe stężenia auksyn i cytokinin (np. 5  $\mu\text{M}$  2,4-D, 2  $\mu\text{M}$  BA).

Obecna w pożywce do proliferacji cytokinina zapewnia prawidłową organizację części embrionalnych zarodków, zaś auksyna warunkuje różnicowanie się nowych struktur embriogenicznych. Zaobserwowano, że na pożywce zawierającej wyłącznie cytokininę (BA), zarodki różnych linii komórkowych osiągały większe rozmiary, a ich części embrionalne bardzo silnie się rozwijały, zaś w obecności auksyny (2,4-D), jako jedyne regulatora wzrostu, zarodki przekształcały się po pewnym czasie w niezorganizowane, luźne agregaty komórek (36).

Wysoki poziom egzogennej auksyny i cytokininy w pożywce stymuluje stałe namnażanie się mas proembriogenicznych na drodze asymetrycznych podziałów komórek embriogenicznych. Spadek zawartości auksyny w pożywce pod koniec pasażu umożliwia różnicowanie się z PEM III zarodków somatycznych (32).

Do proliferacji kultur embriogenicznych wykorzystuje się pożywki stałe lub płynne. Czas podwojenia świeżej masy tkanki wynosi dla kultur stałych 1-2 tygodnie, a dla zawieszin – 3-4 dni, w zależności od warunków prowadzenia kultury i genoty-



pu. Proliferująca na pożywce stałej tkanka embriogeniczna jest przenoszona na świeżą pożywkę zwykle co 2-4 tygodnie (35), natomiast zawiesiny uzupełnia się świeżą pożywką co 1-2 tygodnie (37). Kultury zawiesinowe odznaczają się szybszym tempem wzrostu niż kultury stałe, stwarzają też możliwość wykorzystania bioreaktorów do ich namnażania (38), wcześniej jednak tracą zdolność do produkcji dojrzałych zarodków.

Podobnie jak indukcja, proliferacja tkanki embriogenicznej świerka odbywa się zwykle w ciemności (12,20). Stwierdzono jednak, że jakość spektralna światła może wywierać silny wpływ na proliferację kultur embriogenicznych świerka pospolitego. Światło niebieskie hamuje wzrost tkanki niektórych genotypów (39), stymulując jednocześnie produkcję związków fenolowych (40).

### 2.2.2. Linie komórkowe

Morfologia niedojrzałych zarodków somatycznych *Picea abies* jest bardzo podobna w obrębie jednej linii komórkowej, zarodki różnych linii różnią się natomiast budową i zdolnością do dojrzewania. Na podstawie tych różnic wyodrębniono dwie główne grupy linii komórkowych A i B – występujące w kulturach embriogenicznych świerka pospolitego (18,41).

Linie komórkowe zaliczane do grupy A zawierają zarodki somatyczne o rozbudowanej części embrionalnej, z której wyrastają liczne wydłużone komórki suspensora. Część embrionalna składająca się z ponad 2000 komórek merystematycznych jest wyraźnie oddzielona od części suspensorowej. Zarodki pochodzące z tych linii są zdolne do osiągnięcia pełnej dojrzałości w obecności egzogenego ABA (20).

W grupie B linii komórkowych, nazywanej też słabo rozwiniętą, zarodki somatyczne mają niedużą część embrionalną, utworzoną z mniej niż 300 komórek, pomiędzy którymi często występują zwakuolizowane komórki suspensora. Linie komórkowe grupy B reagują dwojako na obecność egzogenego ABA: proliferują nieprzerwanie bez jakichkolwiek oznak tworzenia zarodków w stadium liścieniowym, bądź też produkują tylko nieprawidłowo wykształcone dojrzałe zarodki, które nie są zdolne do kiełkowania (20,32). Przypuszcza się, że linie grupy B znajdują się we wcześniejszym stadium rozwojowym niż linie grupy A, a ich dalszy rozwój został zablokowany (20) lub też występują u nich zaburzenia w polarnym transporcie endogennych auksyn (32).

Linie grupy A odznaczają się szybkim wzrostem na pożywce stałej, ale są trudne do dłuższego utrzymania w kulturach zawiesinowych. Linie grupy B proliferują natomiast powoli na pożywce stałej, ale ich zawiesiny charakteryzują się stabilnym wzrostem (42).



### 2.3. Dojrzewanie zarodków somatycznych

Niedojrzałe zarodki somatyczne świerka pospolitego dla dalszego rozwoju i osiągnięcia dojrzałości muszą zostać poddane działaniu egzogennej ABA (kwas abscysynowy) (43). Stymulujący wpływ ABA na dojrzewanie zarodków somatycznych stwierdzono też u innych gatunków roślin iglastych z rodzaju *Picea*, *Pinus*, *Abies* i *Larix* (6).

#### 2.3.1. Wpływ ABA na dojrzewanie zarodków somatycznych

Kwas abscysynowy odgrywa ważną rolę w procesie embriogenezy somatycznej. W obecności ABA tkanka embriogeniczna świerka przestaje proliferować, a różniące się z mas proembriogenicznych niedojrzałe zarodki somatyczne zwiększają swoje rozmiary i zaczynają gromadzić materiały zapasowe (44).

Zazwyczaj ABA dostarczany jest w formie racemicznej ( $\pm$ ), jako mieszanina enantiomerów: naturalnego (+) i sztucznego (-). Jego optymalna zawartość w pożywce zależy od linii komórkowej oraz genotypu świerka pospolitego i waha się w granicach od 7 do 60  $\mu\text{M}$  (41). Należy wyznaczać ją empirycznie niemalże dla każdego genotypu z osobna (5). ABA stymuluje dojrzewanie zarodków somatycznych oraz gromadzenie się w nich substancji zapasowych, synchronizuje proces dojrzewania, a także, zwłaszcza w wyższych stężeniach ( $>20 \mu\text{M}$ ), zapobiega powstawaniu zarodków zdeformowanych i przedwcześnie kiełkujących (4,5,45). Podobnie w procesie zygotycznej embriogenezy, regulator ten odgrywa główną rolę w akumulacji materiałów zapasowych i inicjowaniu spoczynku nasion, a także zapobiega ich przedwczesnemu kiełkowaniu (46).

Zawartość endogennej ABA zmienia się w trakcie dojrzewania zarodków somatycznych świerka. W ciągu pierwszych 14 dni dojrzewania zarodków na pożywce z dodatkiem 40  $\mu\text{M}$  cis, trans ( $\pm$ ) – ABA odnotowano gwałtowny wzrost zawartości (+) – ABA (ok. 100-krotny) (47). Tkanki i komórki roślinne pobierają bowiem ABA głównie na drodze dyfuzji (48), a dostarczony egzogenicznie ABA bardzo szybko wnika do tkanek i akumuluje się w nich, osiągając wysokie stężenie. W ciągu kolejnych czterech tygodni dojrzewania poziom ABA nadal wzrastał, ale w znacznie wolniejszym tempie, zaś w ostatnich tygodniach obniżył się gwałtownie (47). Podobne zmiany w zawartości ABA obserwowane są także podczas dojrzewania zarodków zygotycznych roślin iglastych. U *Pinus taeda* najwyższą zawartość endogennej ABA odnotowano podczas wczesnego rozwoju zarodków zygotycznych, zaś wyraźnie niższą w późniejszych fazach dojrzewania (49).

Aby zredukować wysoki poziom zawarty w tkance embriogenicznej auksyn i cytokinin, hamujący dojrzewanie zarodków, często przed dojrzwaniem umieszcza się ją na kilka dni na pożywce bez regulatorów wzrostu, z dodatkiem węgla aktywnego (50,51), który posiada zdolność adsorbowania egzo- i endogennych zwią-



ków. Przy obecności w pożywce zarówno auksyny jak i cytokininy, ABA nie stymuluje dojrzewania zarodków somatycznych świerka (48). W niektórych doniesieniach pisze się jednak o korzystnym wpływie dodanej do pożywki do dojrzewania auksyny (IBA lub NAA, 1-10  $\mu\text{M}$ ) (50-52) lub cytokininy (BA, 1-5  $\mu\text{M}$ ) (53). Obecność auksyny w pożywce do dojrzewania zarodków stymuluje rozwój ich liścieni, jak również ich późniejsze kiełkowanie, cytokinina wpływa natomiast korzystnie na wczesne stadia dojrzewania zarodków, stymulując rozwój ich części embrionalnych (36,53).

### 2.3.2. Rola PEG (glikol polietylenowy) w procesie dojrzewania zarodków

Korzystny wpływ obniżenia potencjału wodnego pożywki na dojrzewanie zarodków somatycznych zaobserwowano po raz pierwszy u *Picea glauca* (51). Stwierdzono, że zastosowanie PEG 4000 zwiększyło trzykrotnie wydajność dojrzewania zarodków *Picea glauca* i ich zdolność kiełkowania, a ponadto stymulowało gromadzenie się w zarodkach zapasowych lipidów (54). Korzystny wpływ PEG na dojrzewanie zarodków somatycznych zaobserwowano też u *Picea abies* (55).

Glikol polietylenu to powszechnie stosowany w somatycznej embriogenezie świerka, nie przenikający do komórek związek osmotycznie czynny. Obniża on potencjał wodny pożywki, hamuje proliferację tkanki i stwarza podczas dojrzewania stres wodny, podobny do naturalnego, który poprzedza dojrzewanie nasion i prowadzi do stopniowej desykcji zarodków (54).

W ostatnich latach pojawiały się też doniesienia mówiące o niekorzystnym wpływie wyższych stężeń PEG (7,5%) na morfologię zarodków somatycznych świerka popolitego (56,57), ich zdolność kiełkowania i wzrost regenerowanych roślin (58), jednak niższe stężenie PEG (3,75%) nie powodowało takich negatywnych efektów.

Na dojrzewanie zarodków somatycznych świerka wpływa też rodzaj i stężenie substancji zestalającej pożywkę oraz węglowodanów. U *Picea mariana* i *P. rubens* przy zastosowaniu Gelrite'u (0,2-0,5%) uzyskano 3-5 razy więcej zarodków niż przy użyciu Difco Bacto-agaru (0,7-1,0%) (59). Korzystny wpływ na dojrzewanie zarodków ma też obecność w pożywce maltozy, która zwiększa jej ciśnienie osmotyczne i stymuluje rozwój części embrionalnych zarodków somatycznych (60).

Dojrzewanie zarodków somatycznych świerka odbywa się zazwyczaj na pożywce stałej. Podejmowane są próby przeprowadzania tego etapu w pożywkach płynnych, z zastosowaniem bioreaktorów, obserwuje się tu jednak dużą asynchronizację rozwoju zarodków (56,61). Nie udało się uzyskać, jak dotąd, zarodków świerka w stadium liścieniowym, bezpośrednio w pożywce płynnej (62).

Dojrzewanie zarodków somatycznych trwa u *Picea abies* od 1 do 3 miesięcy (41), w zależności od linii komórkowej i genotypu. Zdolność zarodków somatycznych do dojrzewania różni się w istotny sposób pomiędzy genotypami i liniami komórkowymi świerka. Wydajną produkcję dojrzałych zarodków somatycznych zapewniają na razie tylko dobrze rozwinięte linie komórkowe, należące do grupy A (20). Najlepsze



z nich dają setki (63), a nawet tysiące (40) dojrzałych zarodków z jednego grama świeżej masy tkanki embriogenicznej.

### 2.3.3. Rozwój zarodków somatycznych

Von Arnold i Hakman (43) wyróżniły w rozwoju zarodków somatycznych *Picea abies* cztery kolejne stadia, które obserwowane są też u innych gatunków świerka:

stadium 1 – zarodki o części embrionalnej złożonej z małych komórek o gęstej cytoplazmie i suspensorze utworzonym z długich, silnie zwakuolizowanych komórek; znajdują się w półprzezroczystej tkance embriogenicznej;

stadium 2 – zarodki z wyraźnie wyodrębnionym merystemem pędowym, nieprzezroczyste, kremowe do bladożółtych; w stadium globularnym i torpedy; są nadal przytwierdzone do otaczającej tkanki za pośrednictwem komórek suspensora;

stadium 3 – zarodki o rozwiniętych liścieniach znajdujące się na powierzchni tkanki, z której powstały, z suspensorem lub bez; koloru od kremowego do jasnozielonego;

stadium 4 – kielkujące zarodki somatyczne – zregenerowane małe, zielone rośliny, o częściowo wydłużonych liścieniach i lekko wydłużonym hypokotylu, z zapoczątkowanym wzrostem radykuli.

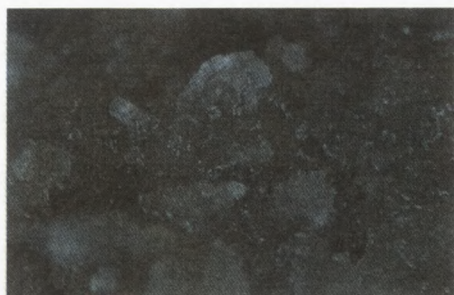
Dunstan (64) zmodyfikował tę klasyfikację, do stadium 3 zaliczając zarodki z widocznymi primordiami liścieniowymi, zaś do stadium 4 (wczesnego i późnego) – zarodki o uformowanych liścieniach.

Budowa rozwijających się zarodków somatycznych i zygotycznych świerka jest bardzo podobna (44). We wczesnej fazie dojrzewania zarówno jedne, jak i drugie posiadają nieduże części embrionalne (zarodki właściwe) i silnie rozwinięte suspensory (fot. 2a,b). Dojrzewające zarodki szybko zwiększają swoje rozmiary, stają się nieprzezroczyste, a ich organy ostatecznie różnicują się (fot. 2c,d). W odróżnieniu od zarodków zygotycznych świerka, u jego zarodków somatycznych liścienie nie zakrywają wierzchołka wzrostu, lecz tworzą wokół niego gwiaździstą rozetę (fot. 2e,f). W dojrzałych zarodkach somatycznych świerka pospolitego wykryto te same białka zapasowe, które występują w zarodkach zygotycznych (65), stwierdzono jednak mniejszą zawartość lipidów (66).

Niepożądanym zjawiskiem występującym podczas dojrzewania zarodków somatycznych jest ich przedwczesne kielkowanie, polegające na wydłużaniu się pędu przy jednoczesnym braku elongacji korzenia (67). Inne obserwowane zaburzenia to powstawanie zarodków nadmiernie uwodnionych lub zdeformowanych: zgrubiałych, ze zredukowaną lub zwiększoną liczbą liścieni, z liścieniami zrosniętymi lub niewykształconymi, czy też z wydłużonym hypokotylem i niedorozwiniętymi liścieniami (68).

Dojrzewanie zarodków somatycznych może być przeprowadzane w ciemności (20) lub na świetle (12,69). Stwierdzono, że światło czerwone może stymulować





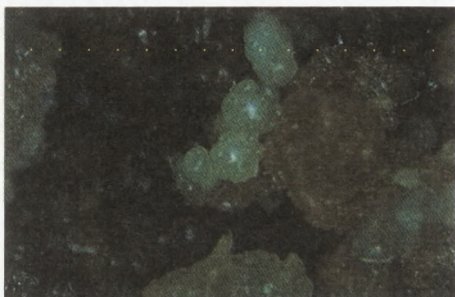
a



b



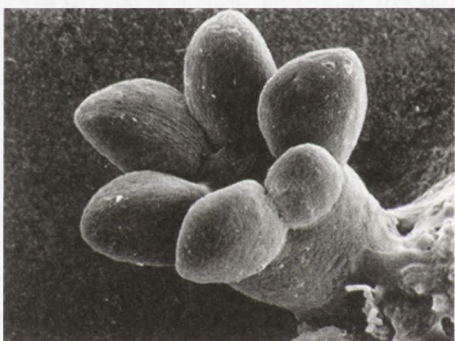
c



d



e



f

Fot. 2. Stadia rozwoju zarodków somatycznych świerka: niedojrzałe zarodki (a, b), stadium globularne i cylindryczne (c), liścieniowe wczesne (d) i późne (d, e).



produkcję dojrzałych zarodków somatycznych świerka pospolitego, podczas gdy światło niebieskie hamuje ten proces (40).

## 2.4. Kiełkowanie zarodków somatycznych i wzrost siewek

W pierwszych badaniach nad somatyczną embriogenezą świerka pospolitego dojrzałe zarodki przenoszono bezpośrednio z pożywki do dojrzewania na pozbawioną regulatorów wzrostu pożywkę do kiełkowania (12). Przy tej metodzie tylko nieliczne zarodki kiełkowały i rozwijały się w rośliny, a głównym problemem było zahamowanie wzrostu ich korzeni.

### 2.4.1. Dosuszanie zarodków somatycznych

Znaczącym udoskonaleniem technologicznym somatycznej embriogenezy roślin iglastych było poddanie dojrzałych zarodków częściowemu dosuszaniu (*partial drying, partial desiccation*) w warunkach wysokiej wilgotności względnej, wynoszącej około 95% (51). Efektem tego zabiegu, powodującego około 5% utratę wilgotności przez zarodki, było zwiększenie ich zdolności kiełkowania do 90%, skrócenie czasu wyrastania korzeni, lepsze zsynchronizowanie elongacji korzeni z wydłużaniem się hypokotyli i wzrostem liścieni, a także zwiększenie zdolności roślin do przeżycia po przesadzeniu do podłoża mineralnego (45,51). Kong i Yeung (70) stwierdzili, że dosuszanie zarodków somatycznych *Picea glauca* poprawia organizację ich merystemu wierzchołkowego, prowadząc do wytworzenia jednej, zwartej warstwy komórek w części apikalnej, co wpływa korzystnie na wzrost regenerowanych roślin.

W procesie embriogenezy zygotycznej desykcja uważana jest za moment kończący rozwój nasion, ważny dla ich przejścia z etapu dojrzewania do kiełkowania. Częściowe dosuszanie dojrzałych zarodków somatycznych obniża poziom ich endogennego ABA (71), a zbyt wysoka zawartość ABA w zarodkach roślin iglastych wpływa niekorzystnie na ich dalszy rozwój (72).

### 2.4.2. Warunki kiełkowania zarodków somatycznych i wzrostu siewek

W procesie somatycznej embriogenezy świerka terminem „kiełkowanie” określa się etap wyrastania korzenia u podstawy zarodka somatycznego (51). Dalszy wzrost wydłużeniowy korzenia i epikotyli, do momentu osiągnięcia przez młode rośliny zdolności do autotroficznego trybu życia w podłożu mineralnym, nazywany bywa „konwersją” lub „wzrostem siewek *in vitro*” (73,74).

Dla prawidłowego dalszego rozwoju dojrzałe zarodki somatyczne umieszcza się na pożywce nie zawierającej regulatorów wzrostu (43). Najlepszy wzrost korzeni



obserwuje się u zarodków umieszczonych w ustawionych pochyło szalkach, z wierzchołkami wzrostu skierowanymi ku górze i liścieniami zagłębionymi w pożywce (50). Liścienie zarodków somatycznych odgrywają bowiem ważną rolę w absorbowaniu składników odżywczych, podobną do tej, jaką obserwuje się u kiełkujących nasion (75).

Do kiełkowania zarodków somatycznych świerka wykorzystuje się pożywkę stałą, nie zawierającą regulatorów wzrostu, często z dodatkiem węgla aktywnego. U większości genotypów zapewnia ona 90% zdolność kiełkowania zarodków (35). Dodatek węgla aktywnego wpływa stymulująco na dalszy wzrost korzeni i pędów siewek, a korzenie wyrastające w jego obecności są grubsze, z licznymi włóśnikami (6,76). Dla stymulacji tworzenia korzeni przez zarodki somatyczne do pożywki dodawana jest niekiedy auksyna (77,78).

Pożywka stosowana do kiełkowania zarodków musi zawierać sacharozę, zarodki somatyczne świerka nie są bowiem zdolne do kiełkowania autotroficznego. Izolowane z nasion zarodki zygotyczne także wymagają egzogennych węglowodanów do wytworzenia korzeni w kulturze *in vitro*, co sugeruje, że składniki odżywcze niezbędne w czasie przechodzenia od hetero- do autotroficznego wzrostu zarodków zapewnia w warunkach naturalnych megagametofit (75).

Z chwilą rozpoczęcia kiełkowania zarodków somatycznych następuje szybkie uruchomienie zgromadzonych w nich substancji zapasowych. U dwutygodniowych siewek nie stwierdzono już obecności głównych zapasowych polipeptydów (79). Gdy korzenie osiągną długość 0,5-1 cm, rośliny można przenieść do nasączonych pożywką bloczków celulozowych lub perlitu, a po 6-8 tygodniach wzrostu w warunkach wysokiej wilgotności powietrza, można przesadzić je do podłoża mineralnego (80).

Wyrastające z zarodków somatycznych rośliny nazywane są siewkami somatycznymi (*somatic seedlings* (74); *emblings* (74,81)) lub roślinkami (*plantlets* lub *germinants* (80); *somatic embryo-derived plantlets* (82)). Są one zwykle bardziej zwarte niż siewki roślin iglastych w tym samym wieku i odznaczają się grubszymi hypokotylami.

Kiełkowanie zarodków somatycznych świerka przebiega lepiej w ciemności niż na świetle białym (43,83). Światło niebieskie silnie hamuje kiełkowanie zarodków i wzrost ich korzeni, podczas gdy światło czerwone wyraźnie stymuluje ten proces (82).

## 2.5. Przesadzanie roślin do gruntu

Zregenerowane młode rośliny z rozwiniętymi liścieniami, rosnącymi epikotylami i korzeniami mogą być przenoszone do niesterylnych warunków. Początkowo umieszcza się je w szklarni, a po pewnym czasie przesadza na zewnątrz. Młode rośliny sadzi się do lekkiego podłoża, będącego zwykle mieszaniną torfu, piasku i perlitu lub wermikulitu. W początkowym etapie aklimatyzacji przykrywa się je folią lub innym



przezroczystym tworzywem, zapewniającym utrzymanie wysokiej wilgotności powietrza (80).

Zdolność roślin do przeżycia po przeniesieniu do warunków *ex vitro* stanowi nadal duży problem technologiczny w somatycznej embriogenezie świerka pospolitego. Prawidłowa aklimatyzacja roślin zależy od wykształcenia dobrze rozwiniętej części epikotylowej, zdolnej do fotosyntezy. U młodych roślin uzyskanych *in vitro* z zarodków somatycznych epikotyl jest jednak zwykle zbyt słabo rozwinięty, aby zapewnić dostatecznie wysoką wydajność fotosyntetyczną, umożliwiającą roślinom samożywność i przetrwanie w warunkach *ex vitro* (6).

Częściowym rozwiązaniem tego problemu może być wydłużenie okresu wzrostu siewek *in vitro* (50,51). Korzystny wpływ na wzrost roślin wyprowadzonych z zarodków somatycznych ma też zabieg częściowego dosuszania zarodków przed kiełkowaniem (45). Wykazano, że zarodki, które nie były poddawane dosuszaniu, kiełkując wytwarzały nadmiernie uwodnione hypokotyle i gorzej aklimatyzowały się *ex vitro*. Kiełkowanie zarodków i zdolność roślin do przeżycia w warunkach *ex vitro* może też poprawić wykorzystanie mikoryzy (84,85). Ważna jest również stopniowa aklimatyzacja roślin przy niższej wilgotności powietrza i większym natężeniu światła, a zatem w warunkach zbliżonych do panujących w szklarni (35).

W przeprowadzonych testach polowych wykazano, że odpowiednio przygotowane rośliny wyprowadzone z zarodków somatycznych świerka pospolitego były zdolne do przeżycia w warunkach polowych w podobnym stopniu jak siewki tego gatunku, a w pierwszym roku uprawy nie ujawniły się różnice morfologiczne między nimi. W obrębie jednego klonu rośliny uzyskane z zarodków somatycznych odznaczały się wyjątkowo wyrównanym wzrostem, w porównaniu z mniej od nich wyrównanymi siewkami (30). Rośliny, które zaaklimatyzowały się i przeżyły po wysadzeniu do gruntu stanowiły u *Picea mariana* 60% (86), u *P. glauca-engelmannii* 80% (83) i u *P. sitchensis* 90% (87).

### 3. Możliwości zastosowania somatycznej embriogenezy roślin iglastych

Somatyczna embriogeneza odznacza się wieloma zaletami, pod względem których przewyższa inne techniki mikrorozmnażania roślin iglastych. Przede wszystkim proces ten odznacza się bardzo wysokim współczynnikiem rozmnażania, z jednego eksplantatu inicjalnego można bowiem uzyskać teoretycznie nieograniczoną liczbę zarodków somatycznych. Zastosowanie bioreaktorów w hodowli kultur zawieszonych umożliwia przy tym szybką produkcję zarodków na bardzo dużą skalę (74).

Somatyczna embriogeneza znajduje coraz częściej zastosowanie w hodowli roślin iglastych z wykorzystaniem technik inżynierii genetycznej. Kultury embriogeniczne roślin iglastych umożliwiają bowiem uzyskiwanie genetycznie zmodyfikowanych linii komórkowych i bezpośrednio z nich transgenicznych zarodków somatycznych, przekształcających się w zmodyfikowane rośliny. Izolacja protoplastów z em-



briogenicznych kultur komórkowych stwarza możliwość zastosowania w hodowli roślin iglastych somatycznej hybrydyzacji lub cybrydyzacji. Somatyczna embriogeneza pozwala przy tym na uniknięcie lub zminimalizowanie ryzyka wystąpienia zmienności somaklonalnej (7).

Niedojrzałe zarodki somatyczne roślin iglastych nadają się do długoterminowego przechowywania w ciekłym azocie, dzięki czemu mogą być wykorzystywane do tworzenia banków genów, mogą też stanowić rezerwy przechowywane podczas testów polowych wyprowadzonych z nich roślin, będących efektem zabiegów hodowlanych (68).

Dojrzałe zarodki somatyczne roślin iglastych, poddane wcześniejszej desykcji, można przechowywać przez kilka miesięcy w niskiej temperaturze, można też poddawać je enkapsulacji, otrzymując sztuczne nasiona (61).

Somatyczna embriogeneza może znaleźć zastosowanie w rozmnażaniu roślin iglastych o niskim plonie nasion, jak *Picea abies*, *Larix* sp., klonowaniu odmian odpornych na stresy środowiskowe, choroby i szkodniki, rzadkich odmian ozdobnych, jak np. odmiany świerka kłującego (*Picea pungens*) o niebieskim zabarwieniu igieł, w zachowaniu gatunków rzadkich i zagrożonych, a także w badaniach podstawowych dotyczących genetyki i rozwoju roślin iglastych (5).

Duże zainteresowanie somatyczną embriogenezą roślin iglastych i szybki postęp badań w tej dziedzinie prowadzą do jej systematycznego udoskonalania. Szczególnie ważnym zagadnieniem, któremu dużo uwagi poświęca się w ośrodkach badawczych w wielu krajach, jest opracowanie warunków efektywnej indukcji struktur embriogenicznych na eksplantatach pochodzących z dojrzałych drzew, o pożądanym cechach fenotypowych. Trwają też intensywne badania nad zwiększeniem efektywności dojrzewania i kiełkowania zarodków somatycznych roślin iglastych (30). Somatyczna embriogeneza roślin iglastych jest nie tylko przedmiotem zainteresowania ośrodków naukowych, znajduje także zastosowanie w masowej reprodukcji roślin dla potrzeb leśnictwa, przemysłu drzewnego i papierniczego (88,89).

## Literatura

1. Chalupa V., (1985), *Comm. Inst. For.*, 14, 57-63.
2. Hakman I., Fowke L. C., von Arnold S., Eriksson T., (1985), *Plant Sci.*, 38, 53-59.
3. Nagmani R., Bonga J. M., (1985), *Can. J. For. Res.*, 15, 1088-1091.
4. Tautorus T. E., Fowke L. C., Dunstan D. I., (1991), *Can. J. Bot.*, 69, 1873-1899.
5. Attree S. M., Fowke L. C., (1993), *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 35, 1-35.
6. Jain S., Gupta P., Newton R., (1995), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 3 – *Gymnosperms*, Kluwer Ac. Publ., Netherlands.
7. Jain S., Gupta P., Newton R., (1999), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 4, Kluwer Ac. Publ., Netherlands.
8. Grossnickle S. C., Cyr D., Polonenko D. R., (1996), *Tree Planters' Note*, 47, 48-57.
9. Ammirato P. V., (1983), *Handbook of Plant Cell Culture*, 1, Eds. Evans D. A., Sharp W. R., Ammirato P. V., Yamada Y., 82-123, Macmillan, Inc. New York.
10. Steward F. C., Mapes M. O., Mears K., (1958), *Am. J. Bot.*, 45, 705-708.



11. Reinert J., (1958), *Naturwiss.*, 45, 344-347.
12. Hakman I., von Arnold S., (1985), *J. Plant Physiol.*, 121, 149-158.
13. Lelu M-A., Boulay M. P., Bornman Ch. H., (1990), *New Forests*, 4, 125-135.
14. Mo L. H., von Arnold S., (1991), *J. Plant Physiol.*, 138, 223-230.
15. Ruaud J. N., Bercetche J., Paques M., (1992), *Plant Cell Rep.*, 11, 563-566.
16. Westcott R. J., (1994), *Plant Cell Rep.*, 14, 47-49.
17. Mo L. H., von Arnold S., Lagercrantz U., (1989), *Plant Cell Rep.*, 8, 375-378.
18. Egerstodter U., von Arnold S., (1993), *J. Plant Physiol.*, 141, 222-229.
19. von Arnold S., (1987), *J. Plant Physiol.*, 128, 233-244.
20. von Arnold S., Clapham D., Egertsdotter U., Mo L. H., (1996), *Plant Growth Reg.*, 20, 3-9.
21. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
22. von Arnold S., Eriksson T., (1981), *Can. J. Bot.*, 59, 870-874.
23. Gupta P. K., Durzan D. J., (1986), *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 22, 685-688.
24. Krogstrup P., (1986), *Can. J. For. Res.*, 16, 664-668.
25. Litvay J. D., Johnson M. A., Verma D., Einspahr D., Kaustinen H., (1981), *Inst. Paper Chem. Tech. Pap. Series No.115*, Appleton, WI.
26. Lelu M-A. P., Bornman Ch. H., (1990), *Plant Physiol. Biochem.*, 28, 785-791.
27. Davies P. J., (1987), *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*, Martinus Nijhoff Publ.
28. Tremblay L., Tremblay F. M., (1991), *Plant Cell, Tiss. Org. Culture*, 27, 95-103.
29. Bozhkov P. V., Mikhailina B., Shiryaeva G. A., Lebedenko L. A., (1993), *J. Plant Physiol.*, 142, 735-741.
30. von Arnold S., Egertsdotter U., Ekberg I., Gupta P., Mo H., Nørgaard J. V., (1995), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants, 3 – Gymnosperms*, 17-36, Eds. Jain S., Gupta P., Newton R., Kluwer Ac. Publ. Netherlands.
31. Nagmani R., Becwar M. R., Wann S. R., (1987), *Plant Cell Rep.*, 6, 157-159.
32. Filonova L. H., Bozhkov P. V., von Arnold S., (2000), *J. Exp. Bot.*, 51, 249-264.
33. Becwar M. R., Noland T. L., Wann S. R., (1987), *Plant Cell Rep.*, 6, 35-38.
34. Hakman I., Rennie P., Fowke L. C., (1987), *Protoplasma*, 140, 100-109.
35. Kvaalen H., (1994), *Somatic embryogenesis in Norway spruce [Picea abies (L.) Karst]. Interactions between the gaseous environment and growth regulators*, Doctor Sci. Thesis. Agric. Univ. of Norway, Ås.
36. Bellarosa R., Mo L. H., von Arnold S., (1992), *Ann. Bot.*, 70, 199-206.
37. Egerstodter U., von Arnold S., (1998), *J. Exp. Bot.*, 49, 155-162.
38. Gupta P. K., Pullman G., Timmis R., Kreitiner M., Carlson W. C., Grob J., Welty E., (1993), *Bio/Technology*, 11, 454-459.
39. Latkowska M. J., Kvaalen H., Appelgren M., (2000), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 36, 57-60.
40. Latkowska M. J., Kvaalen H., Appelgren M., (1998), *Abstracts of the Fifth Annual Meeting of COST 822 Working Group 2*, Erfurt, 37-41.
41. Jalonen P., von Arnold S., (1991), *Plant Cell Rep.*, 10, 384-387.
42. Egerstodter U., von Arnold S., (1995), *Physiol. Plant.*, 93, 334-345.
43. von Arnold S., Hakman I., (1988), *J. Plant Physiol.*, 132, 164-169.
44. Hakman I., (1993), *Physiol. Plant.*, 87, 148-159.
45. Roberts D. R., Webster F. B., Flinn B. S., Lazaroff W. R., Cyr D. R., (1993), *Synseeds. Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement*, 427-450, Ed. Redenbaugh K., CRC Press.
46. Kermode A. R., (1990), *Crit. Rev. Plant Sci.*, 9, 155-194.
47. Latkowska M. J., Łukaszewska A. J., Rybczyński J. J., Chmiel H., (2000), *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 473, 119-125.
48. Dunstan D. I., Dong J-Z., Carrier D. J., Abrams S. R., (1998), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 34, 159-168.
49. Kapik R. H., Dinus R. J., Dean J. F. D., (1995), *Tree Physiol.*, 15, 465-490.
50. Becwar M. R., Noland T. L., Wyckoff J. L., (1989), *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 25, 575-580.
51. Roberts D. R., Sutton B. S. C., Flinn B. S., (1990), *Can. J. Bot.*, 68, 1086-1090.
52. Jain S. M., Dong N., Newton R. J., (1988), *Plant Sci.*, 65, 233-241.



53. Bozhkov P. V., Lebedenko L. A., Shiryayeva G. A., (1992), *Plant Cell Rep.*, 11, 386-389.
54. Attree S. M., Moore D., Sawhney V. K., Fowke L. C., (1991), *Ann. Bot.*, 68, 519-521.
55. Tingstad H., (1993), *Oksygen og delvis tørking påvirker mengden og sammensetning av lagringsfett i somatiske embryo as gran (Picea abies (L.) Karst.)*. Forest Res. Inst., Agricultural Univ. of Norway, Ås.
56. Kumstýřová L., Albrechtová J., Lipavská H., Svobodová H., Vondráková Z., (1999), *Biologia*, 54, suppl. 7, 30.
57. Svobodová H., Albrechtová J., Kumstýřová L., Lipavská H., Vágner M., Vondráková Z., (1999), *Plant Physiol. Biochem.*, 37, 209-221.
58. Bozhkov P. V., von Arnold S., (1998), *Physiol. Plant.*, 104, 211-224.
59. Tremblay L., Tremblay F. M., (1991), *Plant Sci.*, 77, 233-242.
60. Gupta P. K., (1996), *Method for regeneration of coniferous plants by somatic embryogenesis*, US Patent No. 5,506,136.
61. Attree S. M., Pomeroy M. K., Fowke L. C., (1994), *Plant Cell Rep.*, 13, 601-606.
62. Gupta P. K., (1999), *Biologia*, 54, suppl. 7, 66-67.
63. Nørgaard J. V., Duran V., Johnsen Ø., Krogstrup P., Baldursson S., von Arnold S., (1993), *Can. J. For. Res.*, 23, 2560-2567.
64. Dunstan D. I., (1988), *Can. J. For. Res.*, 18, 1497-1506.
65. Hakman I., Stabel P., Engström P., Eriksson T., (1990), *Physiol. Plant.*, 80, 441-445.
66. Feirer R. P., Conkey J. H., Verhagen S. A., (1989), *Plant Cell Rep.*, 8, 207-211.
67. Norstog K., (1982), *Experimental embryology of vascular plants*, 25-51, Ed. Johri B. M., Springer-Verlag, New York.
68. Park Y. S., Barrett J. D., Bonga J. M., (1998), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 34, 231-239.
69. Webb D. T., Webster F., Flinn B. S., Roberts D. R., Ellis D. D., (1989), *Can. J. For. Res.*, 19, 1303-1308.
70. Kong L., Yeung E. C., (1992), *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant*, 28P, 125-131.
71. Find J. I., (1997), *Plant Sci.*, 128, 75-83.
72. Lelu M-A., Label P., (1994), *Physiol. Plant.*, 92, 53-60.
73. Hay E. I., Charest P. J., (1999), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 4, 61-96, Eds. Jain S., Gupta P., Newton R., Kluwer Ac. Publ. Netherlands.
74. Gupta P. K., Grob J. A., (1995), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 1, 81-98, Eds. Jain S., Gupta P., Newton R., Kluwer Ac. Publ. Netherlands.
75. Brown C. L., Gifford E. M., (1958), *Plant Physiol.*, 33, 57.
76. Latkowska M. J., (2000), *Wpływ rodzaju światła i regulatorów wzrostu na somatyczną embriogenezę świerka pospolitego (Picea abies (L.) Karst.)*, praca doktorska, Wydz. Ogrodnictwa i Architektury Krajozbrazu SGGW.
77. Afele J. C., Saxena P. K., (1995), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 3, 99-110, Eds. Jain S., Gupta P., Newton R., Kluwer Ac. Publ. Netherlands.
78. Slaby K., Havel L., (1998), *Biologia*, 54, suppl. 7, 15.
79. Misra S., Attree S. M., Leal I., Fowke L. C., (1993), *Ann. Bot.*, 71, 11-22.
80. Klimaszewska K., (1995), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 3, 67-79, Eds. Jain S., Gupta P., Newton R., Kluwer Ac. Publ. Netherlands.
81. Libby W. J., (1986), *J. For.*, 84, 37-38.
82. Kvaalen H., Appelgren M., (1999), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 35, 437-441.
83. Webster F. B., Roberts D. R., McInnis S. M., Sutton B. C. S., (1990), *Can. J. For. Res.*, 20, 1759-1765.
84. Sasa M., Krogstrup P., (1991), *Scan. J. For. Res.*, 6, 129-136.
85. Piola F., Rohr R., von Aderkas P., (1995), *Physiol. Plant.*, 95, 575-580.
86. Attree S. M., Budimir S., Fowke L. C., (1990), *Can. J. Bot.*, 68, 30-34.
87. Krogstrup P., (1990), *Plant Sci.*, 72, 115-123.
88. Grossnickle S., (1999), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 3, 97-123, Eds. Jain S., Gupta P., Newton R., Kluwer Ac. Publ. Netherlands.
89. Sutton B. C. S., Polonenko D. R., (1999), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 3, 263-291, Eds. Jain S., Gupta P., Newton R., Kluwer Ac. Publ. Netherlands.