

Krystyna SZCZYGIEL*

MIKROROZMNAŻANIE MODRZEWIA EUROPEJSKIEGO (*LARIX DECIDUA* MILL.) METODĄ SOMATYCZNEJ EMBRIOGENEZY

MICROPROPAGATION OF EUROPEAN LARCH (*LARIX DECIDUA* MILL.)
VIA SOMATIC EMBRYOGENESIS

Abstract. *The somatic embryogenesis has been used for propagation of European larch (*Larix decidua* Mill.). Somatic embryogenesis in combination with cryopreservation is very effective in preserving selected genotypes and mass (clonal) propagation. In this study, the main problem with larch somatic embryogenesis is to initiate the embryonal tissue. Immature zygotic embryos at precotyledonary stage with endosperm (megagametophyte) have been used and embryogenic callus frequency 8.6–35.7% have been obtained, as well as with cotyledonary zygotic embryos (8.6%). Development of mature somatic embryos at cotyledonary stage was observed after 4 weeks culture of embryogenic callus on basal medium (MSG) containing 20–60 μ M ABA with 1 μ M IBA (dependent on genotype). Three generations of embryogenic callus and plantlets were obtained. Germination and development of plantlets indicate possible use of this method during production of improved plant material in forestry.*

Key words: *explant, somatic embryogenesis, zygotic embryo, somatic embryo, somatic seedling (plantlet).*

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

1. WSTĘP

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.

Badania nad możliwością rozmnażania modrzewia *in vitro* metodą somatycznej embriogenezy rozpoczęli w 1985 r. Nagmani i Bonga (1985), którzy uzyskali kalus embriogeny *Larix decidua* z megagametofitu z wyizolowanym zarodkiem zygotycznym (z 1440 eksplantatów 5 wytworzyło kalus) i wyhodowali pierwsze siewki haploidalne (tab. 1).

Najwcześniejsze doniesienia o otrzymaniu diploidalnej tkanki embriogennej u modrzewia europejskiego pochodzą z 1990 r. Wówczas P. von Aderkas ze współpracownikami (1990) zainicjowali ją na niedojrzałych zygotycznych zarodkach we wczesnym etapie rozwoju (przedliścieniowym, dwa tygodnie po zapłodnieniu). Uzyskano frekwencję inicjacji kalusa w 20%. Lelu i inni (1994a) na tym samym rodzaju eksplantatu *Larix decidua* otrzymali różne wartości frekwencji inicjacji tkanki embriogennej, zależnie od stadium rozwojowego zarodków – najwyższą (19%), gdy eksplantaty znajdowały się w stadium przedliścieniowym, a najniższą (4%), gdy zarodki miały wykształcone duże liście.

Klimaszewska (1989b), stosując niedojrzałe zygotyczne zarodki w stadium przedliścieniowym z nasion mieszańca *Larix decidua* × *L. leptolepis*, uzyskała frekwencję inicjacji tkanki embriogennej w zakresie 6–15%. Podobne wyniki otrzymali Lelu ze współpracownikami (1994b) dla mieszańca modrzewia (*Larix* × *leptoeuropaea*), przy czym inicjacja tkanki embriogennej wyraźnie zależała również od stadium rozwojowego zarodków. Spośród zarodków pozyskanych z nasion zbieranych w maju 38,4–55% wykształciło tkankę embriogeną, natomiast z nasion zbieranych pod koniec lipca – 4%. Wyniki te potwierdzają badania Kim i in. (1999), którzy podczas inicjacji somatycznej embriogenezy u modrzewia japońskiego *Larix leptolepis* z niedojrzałych zarodków stwierdzili podobną zależność inicjacji tkanki embriogennej od terminu zbioru szyszek, uzyskując najwyższą frekwencję stymulacji kalusa embriogenego (59–67%) z zarodków w stadium przedliścieniowym otrzymanych z nasion pozyskanych w lipcu. Lelu ze współautorami (1994a) jedyni zainicjowali kalus embriogeny (5%) u *Larix decidua*, stosując jako eksplantaty dojrzałe zarodki zygotyczne.

Jak wynika z cytowanych wyżej prac, badania prowadzone były głównie na mieszańcach modrzewia, natomiast mało jest prac dotyczących modrzewia europejskiego. Ponadto, w badaniach nad rozmnażaniem modrzewia europejskiego przez somatyczne zarodki nie uwzględniono polskiego materiału różnego pochodzenia, dlatego celem obecnych badań* było zastosowanie i zmodyfikowanie metody mikrorozmnażania drogą somatycznej embriogenezy modrzewia, ze szcze-

* Pracę wykonano w ramach tematu BLP-814 finansowanego przez Dyрекcję Generalną Lasów Państwowych.

Tabela 1. Badania nad inicjacją somatycznej embriogenezy i regeneracją somatycznych siewek modrzewia

Table 1. Studies on larch somatic embryogenesis initiation and somatic seedlings regeneration

Gatunek Species	Rodzaj eksplantatu Kind of explant	Frekwencja inicjacji kalusa embriogenego Frequency of embryogenic callus initiation (%)	Regeneracja siewek somatycznych Somatic seedlings regeneration	Autorzy/rok Authors/year
<i>Larix decidua</i>	M	nieliczne, kalus haploidalny singular, haploidal callus	+	Nagmani i Bonga (1985), Von Aderkas i Bonga (1988) Von Aderkas i in. (1987) Von Aderkas i in. (1990) Cornu i Geoffrion (1990) Von Aderkas (1992) Lelu i in. 1994 a Lelu i in. 1994 a
	M	11	–	
	NZ	20	–	
	NZ	nie podano , not given	–	
	P	nie podano , not given	–	
	NZ	4–19	–	
	DZ	5	–	
<i>Larix decidua</i> × <i>L. leptolepis</i>	M	2–5	–	Von Aderkas i in. (1990)
	NZ	2–11	–	Von Aderkas i in. (1990)
<i>Larix</i> × <i>eurolepis</i>	P	nie podano , not given	+	Klimaszewska (1989a)
	NZ	6–15	+	Klimaszewska (1989b)
	NZ	2–9	+	Lelu i in. 1994 a
<i>L. leptolepis</i>	M	1	–	Von Aderkas i in. (1990)
	NZ	15	–	Von Aderkas i in. (1990)
	NZ	59–67	+	Kim i in. 1999
<i>Larix occidentalis</i>	NZ	30	+	Thompson i von Aderkas (1992)
<i>Larix</i> × <i>leptoeuropaea</i>	NZ	26–62	+	Lelu i in. 1994 a
	L	8		
	I	3		
	NZ	38,4–55	+	
<i>Larix laricina</i>	NZ	43,7	+	Klimaszewska i in. 1997

NZ **niedojrzałe zygocyczne zarodki**
immature zygotic embryos

DZ **dojrzałe zygocyczne zarodki**
mature zygotic embryos

L **liścienie somatycznych siewek**
cotyledons of somatic seedlings

I **igły somatycznych siewek**
needles of somatic seedlings

M **megagametofit (bez zarodka)**
megagametophyte (without embryo)

P **protoplasty**

– **nie uzyskano siewki**
lack of seedlings

+ **regeneracja siewek somatycznych**
regeneration of somatic seedlings

gólnym uwzględnieniem modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.) rodzimego pochodzenia.

Prace doświadczalne obejmowały badania nad poszczególnymi etapami somatycznej embriogenezy, począwszy od fazy inicjacji kalusa embriogenego do uzyskania siewek somatycznych oraz ich adaptacji do wzrostu i rozwoju w warunkach naturalnych.

2. MATERIAŁ I METODY

Materiałem wyjściowym (eksplantaty pierwotne) do mikrorozmnażania modrzewia metodą somatycznej embriogenezy były dojrzałe i niedojrzałe zygocyczne zarodki.

Do badań wykorzystano metodykę opracowaną dla mieszańca modrzewia (*Larix × leptoeuropaea*), na podstawie prac Lelu i in. (1993, 1994a, b, c), z własnymi modyfikacjami.

W celu uzyskania niedojrzałych zygocycznych zarodków zebrano szyszki w nadleśnictwach: Chojnów (10.07.1997), Olsztynek (9.07.1998), Łuków – plantacyjna uprawa nasienna założona w 1988 r. (21.07.1998, 6.07.1999, 29.06.2001) oraz Kutno (9.08.2002). Z nasion reprezentujących 7 pochodzeń wyizolowano 368 dojrzałych zygocycznych zarodków. W celu inicjacji kalusa embriogenego drugiej i trzeciej generacji wykorzystano somatyczne zarodki w stadium globularnym i liścieniowym, jako eksplantaty wtórne.

Do badań zastosowano też kalus embriogeny (cztery linie) otrzymany z Francji (INRA – Narodowy Instytut Badawczy Rolnictwa, w Orleanie). Wszystkie linie zainicjowane zostały na niedojrzałych zarodkach zygocycznych: linia nr 69.18 – mieszańca modrzewia europejskiego i japońskiego (*Larix × leptoeuropaea* Dengler), linia C1 – modrzewia europejskiego (zbiór szyszek w 1992 r.), linia H18 – również modrzewia europejskiego (zbiór szyszek w 1997 r.), oraz linia F80 – mieszańca *Larix leptoeuropaea × L. kaempferi × L. decidua* (kontrolowane zapylenie wykonane w 1995 r.).

Szyszki z nasionami z niedojrzałymi zarodkami, po powierzchniowej sterylizacji w 96% alkoholu i przesuszeniu, przechowywano przez 1–2 tygodnie w temperaturze +4 °C. Aby wyizolować niedojrzałe zarodki, szyszki ponownie moczone w 96% alkoholu etylowym przez okres 15 minut, po czym po zdjęciu łusek, skalpelem oddzielano od nich nasiona wraz ze skrzydełkami. Następnie pod binokulem zdejmowano łupinę nasienną i wyjmowano zarodki z prabielma lub stosowano megagametofit (prabielmo z niedojrzałym zarodkiem).

Nasiona z dojrzałymi zarodkami sterylizowano w 36% roztworze H₂O₂ uzupełnionym kroplą Tweenu (przez 15 minut), po czym trzykrotnie przepłukiwano w wysterylizowanej wodzie destylowanej. Następnie przenoszono je na szalkę Petriego, z niewielką ilością sterylnej wody destylowanej, zamykano i pozostawiano przez 12 godzin w temperaturze 4 °C. Po tym czasie wyłuskany, nieuszkodzony zarodek umieszczano na pożywce.

We wszystkich fazach somatycznej embriogenezy stosowano pożywkę podstawową MSG, opracowaną przez Becwar i in. (1990), którą uzupełniano hormonami wzrostu odpowiednio do danej fazy mnożenia modrzewia.

W fazie inicjacji kalusa embriogenego zastosowano również pożywki: BM-3 (Gupta i Durzan 1986) oraz MCM (Bornman i Jansson 1981, zmodyfikowaną przez Hristoforoglu i in. 1995). Odczyn wszystkich pożywek utrzymywano na poziomie

pH $5,8 \pm 0,1$. Pożywki utwardzono phytagelem (4 g/l) oraz sterylizowano w autoklawie przez 20 minut pod ciśnieniem 1 atmosfery w temp. $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Roztwory \pm cis-trans ABA, IBA oraz L-glutaminy sterylnie filtrowano i dodawano do autoklawowanej, przestudzonej pożywki.

Do inicjacji kalusa embriogenego pożywkę podstawową uzupełniano: 2 mg/l 2,4-D (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy), 1 mg/l BAP (6-benzyloaminopuryna) oraz sacharozą w ilościach 10–30 g/l. W niektórych wariantach doświadczeń do pożywki podstawowej dodawano dodatkowo kinetynę (2–2,5 mg/l) lub zeatynę (0,5–1 mg/l).

Dojrzałe i niedojrzałe zygocyczne zarodki, po wyizolowaniu ich z nasion, umieszczano na wyżej wymienionych pożywkach. W ten sposób, po 4–6 tygodniach, z eksplantatu uzyskiwano odrębną linię kalusa embriogenego (reprezentującego jeden genotyp).

W celu stwierdzenia, czy kalus jest embriogeny, czy też nie, stosowano acetokarmin, barwiący na czerwono jądra komórek strefy embriogennej prazarodków (Gupta i Durzan 1987). Obecność takich komórek świadczy o tym, że tkanka jest embriogenna, a ich liczba – o stopniu embriogeniczności.

W fazie inicjacji kalusa embriogenego:

- określono frekwencję inicjacji kalusa embriogenego z dojrzałych i niedojrzałych zarodków zygocycznych (procent zarodków, które wykształciły tkankę embriogenną),

- określono frekwencję inicjacji kalusa embriogenego II i III generacji na eksplantatach wtórnych (dojrzałych somatycznych zarodkach). Jako eksplantaty wykorzystano somatyczne zarodki uzyskane z linii kalusa pochodzenia Nadl. Młynary. Somatyczne zarodki wykształcone z macierzystej linii kalusa wykładano kolejno na pożywkę do inicjacji kalusa embriogenego drugiej generacji, z którego następnie, na pożywce do dojrzewania, wykształcały się zarodki somatyczne, stanowiące eksplantaty do uzyskania kalusa embriogenego i zarodków somatycznych trzeciej generacji.

Ilość kalusa embriogenego na zarodku zygocycznym po 6–8 tygodniach inkubacji jest niewielka, dlatego umieszczano go na pożywce MSG w celu namnażania. Pożywkę uzupełniano 2 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l BAP oraz sacharozą – 20 g/l. Pasaże na świeżą pożywkę i podziały kalusa wykonywano co 2 tygodnie.

Fazy inicjacji i namnażania kalusa embriogenego przebiegają w ciemności, w temperaturze $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Określono przyrost świeżej masy kalusa embriogenego 10 linii (4 francuskie oraz 6 pochodzenia polskiego). Kalusy z każdej linii ważono co 2 tygodnie.

Proces dojrzewania somatycznych zarodków modrzewia przebiegał w dwóch fazach:

- faza aktywnego wzrostu kalusa embriogenego (7 dni od ostatniego podziału) na pożywce MSG, uzupełnionej 1% węglem aktywnym i sacharozą w ilości 34 g/l,

– faza dojrzewania fragmentów kalusa na pożywce uzupełnionej kwasem abscysynowym – ABA (20–80 mM z 1mM IBA) oraz sacharozą (68,4 g/l).

Kultury hodowano w świetle o niskim natężeniu (25–30 mE m⁻² s⁻¹), przy fotoperiodzie 16 godzin i w temperaturze 25 °C.

Hodowlę kalusa prowadzono na stałej pożywce lub na filtrze papierowym umieszczonym na stałej pożywce. W pierwszym przypadku kawałki kalusa wazono przed wyłożeniem ich na stałe pożywki, w drugim przypadku, w fazach namnażania i dojrzewania, odważoną ilość masy embriogennej (50–100 mg) uzupełniano pożywką płynną (5 ml) i wytrząsano. Następnie z zawiesiny masy embriogennej umieszczonej na filtrze papierowym odciągano pożywkę za pomocą pompy próżniowej (Whatman nr 2), na lejku Büchnera. Kalus embriogeny znajdujący się na filtrze papierowym przenoszono na stałą pożywkę do namnażania lub dojrzewania (Lelu, informacja ustna).

Po 2–3 tygodniach hodowli kultur na pożywce do dojrzewania wykształcały się somatyczne zarodki w stadium globularnym, a po 3–4 tygodniach obserwowano dojrzałe zarodki w stadium liścieniowym. Wytworzoną liczbę zarodków przeliczano na 1 gram świeżej masy kalusa embriogenego.

W tej fazie somatycznej embriogenezy modrzewia zbadano:

– wpływ genotypu na liczbę dojrzałych somatycznych zarodków (10 linii kalusa: 6 genotypów polskich i 4 francuskie, 10 powtórzeń, hodowla na filtrze). Do dojrzewania somatycznych zarodków zastosowano pożywkę podstawową uzupełnioną 60 mM ABA z 1 mM IBA. Liczono 4-tygodniowe somatyczne zarodki ogółem (suma zarodków w stadium globularnym i liścieniowym) oraz osobno zarodki liścieniowe,

– wpływ stężenia ABA (20–80 mM) w pożywce do dojrzewania na liczbę dojrzałych somatycznych zarodków w stadium globularnym i liścieniowym. Somatyczne zarodki liczono po 3 i 6 tygodniach hodowli na pożywce z kwasem abscysynowym. Doświadczenia wykonano na kalusie embriogennej, 10 linii modrzewia europejskiego (3 powtórzenia z każdego pochodzenia, hodowla na filtrze papierowym),

– określono możliwość regeneracji somatycznych zarodków z kalusa II i III generacji. Kalus drugiej generacji hodowano na filtrze papierowym umieszczonym na pożywce do dojrzewania uzupełnionej 60 mM ABA z 1 mM IBA, a zarodki trzeciej generacji dojrzewały na takiej samej pożywce, lecz na kawałkach kalusa umieszczonych na podłożu stałym, agarowym. Obserwacje wykonywano na zarodkach 4-tygodniowych.

Do kiełkowania wybrano zarodki somatyczne na podstawie ich morfologii (z wyraźnie wykształconymi liścieniami, hipokotylem i korzeniem zarodkowym). Dojrzałe, liścieniowe zarodki wyłożono na pożywkę MSG z 20 g/l sacharozy, bez hormonów wzrostu. Po 2–4 tygodniach hodowli na tej pożywce obserwowano wydłużenie korzenia, hipokotyła i liścieni, a także rozwój pierwszych igieł (hodowla w temp. 25 °C, fotoperiod – 16 h/dobę).

Określono:

– udział somatycznych zarodków z liścieniami i z korzeniami po 14 i 28 dniach od wyłożenia na pożywkę do kiełkowania (zarodki linii polskich I, II i III generacji i francuskich),

– wpływ wieku zarodków (długości hodowli kultur na pożywce do dojrzewania) na ich kiełkowanie,

– wpływ stężenia ABA (20–80 mM) w pożywce do dojrzewania somatycznych zarodków na ich kiełkowanie i rozwój jedno i dwumiesięcznych siewek.

Siewki somatyczne (po konwersji na podłożu agarowym, tj. po miesiącu hodowli na pożywce do kiełkowania, z pierwszymi igłami lub ich zawiązkami i rozwiniętymi korzeniami) przenoszono na podłoża naturalne, które stanowiły mieszanki torfu z piaskiem lub wemikulitem (v:v,1:1). Przez miesiąc hodowano je w fitotronie, w temperaturze 20 °C, przy fotoperiodzie 16 h/dobę, wilgotności powietrza 80–90% i niskim natężeniu światła (ok. 30 mE m⁻² s⁻¹). Następnie wilgotność powietrza stopniowo obniżano (60–70%), a zwiększano natężenie światła (ok. 50 mE m⁻² s⁻¹). Stosowano przemiennie opryski roztworami Benlate i Bravo, w stężeniu 0,1–0,25%, oraz nawożenie płynną pożywką 50% MS (Murashige i Skoog 1962). Po 2 miesiącach siewki przeniesiono do szklarni, a następnie wysadzono w szkółce w Sękocinie.

Zbadano wpływ stężenia ABA w pożywce do dojrzewania somatycznych zarodków na wzrost jedno i dwumiesięcznych siewek. Ocenę statystyczną wyników wykonano stosując analizę wariancji (istotność różnic oceniano testem Tukeya). W tabelach i na rycinach podano wartość średnią ±błąd standardowy.

W celu określenia stabilności genetycznej kultur modrzewia zastosowano technikę markerów DNA–RAPD (losowo amplifikowane polimorficzne DNA), według metodyki stosowanej w ZGiFDL w badaniach zmienności genetycznej świerka pospolitego (Nowakowska, informacja ustna). Badania wykonano na kalusie embriogennym I generacji – macierzystym (Nadl. Młynary, linia nr 2920/8), kalusie drugiej generacji (5 linii), pędach jednomiesięcznych siewek somatycznych drugiej generacji i pędach dwumiesięcznych siewek trzeciej generacji. Dla porównania analizowano różne linie kalusa embriogennego I i II generacji oraz igły jednorocznych siewek somatycznych (3 pochodzenia, w tym macierzyste).

Materiał roślinny (ok. 100 mg) rozcierano w ciekłym azocie, a następnie ekstrahowano DNA za pomocą zestawów do izolacji DNA (QIAGEN). Całkowitą zawartość DNA określono na podstawie migracji elektroforetycznej w 1% żelu agarozowym z wykorzystaniem markera 100 pb DNA Ladder (MBI Fermentas), a następnie za pomocą skanera, używając programu Gel DocTM 2000 (BioRad). W dalszym etapie badań przeprowadzono analizę zmienności genetycznej badanego materiału na podstawie reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), przy zastosowaniu techniki RAPD na 1,8% żelu agarozowym, stosując marker 100 pb DNA Ladder Plus (MBI Fermentas). Uwzględniając zawartość DNA genomowego, oszacowaną

dla każdego rodzaju materiału, przygotowano 15 ml mieszaniny reakcyjnej (QIAGEN PCR Master Kit) dla każdej próby (w nawiasie podano stężenia końcowe):

- DNA genomowe (30 ng),
- bufor reakcyjny ($\times 1$),
- $MgCl_2$ (4 mM),
- roztwór Q ($\times 1$),
- dNTPs (200 mM),
- starter firmy OPERON (0,4 mM),
- Taq polimeraza (0,4 U).

Mieszaninę umieszczano w termocyklerze Biometra, zaprogramowanym na 40 cykli amplifikacji DNA. Każdy cykl amplifikacji obejmował 4 etapy. Pierwszy etap: temp. 94 °C przez 1 min. 30 sek.; drugi etap: 94 °C przez 1 min.; trzeci: 37 °C, 1 min.; czwarty: 72 °C, 2 min. Końcowy etap reakcji PCR obejmował: temp. 72 °C przez 10 min. Powielone fragmenty DNA poddano następnie migracji elektroforetycznej i analizowano zmienność ich profilów migracyjnych za pomocą programu Gel DocTM 2000 (BioRad). W pierwszym etapie badań, na wyekstrahowanym DNA z pędów dwumiesięcznych siewek somatycznych uzyskanych z kalusa embriogenego III generacji, zastosowano 18 starterów firmy Operon Technologies (OPA – 06, 08, 09, 11, 16, OPB-05, 08, 13, OPC-04, OPE-08, 12, 17, OPF-07, OPG-09, 10, 12, OPJ-01, 08). Do dalszych analiz wybrano dwa startery: OPF-07 i OPG-09.

3. WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

3.1. Inicjacja kalusa embriogenego

W doświadczeniach przeprowadzonych na dojrzałych zygotycznych zarodkach modrzewia europejskiego nie uzyskano tkanki embriogennej. Do zainicjowania tkanki embriogennej stosowano materiał różnego pochodzenia, w różnych terminach zbioru, różne pożywki podstawowe (MSG, BM-3 i MCM), modyfikacje hormonów uzupełniających pożywkę MSG oraz różne stężenia sacharozy w pożywce MSG (10 i 30 g/l). Mimo zastosowania tak wielu różnych czynników w doświadczeniach, nie udało się uzyskać kalusa embriogenego. W niektórych powtórzeniach obserwowano pojawianie się tkanki embriogennej, która jednak po paru pasażach brązowieła i zamierała.

Nie uzyskano tkanki embriogennej również z niedojrzałych zygotycznych zarodków nasion ze zbioru szyszek w latach 1998 i 1999 w Nadleśnictwie Olsztynek i w 1998 r. w Nadleśnictwie Łuków (tab. 2). W 2002 r. uzyskano kalus embriogeny na niedojrzałych zarodkach zygotycznych (Nadl. Kutno). Frekwencja inicjacji kalusa wyniosła 8,6% (tab. 2). Wyizolowane z nasion zarodki znajdowały się w późnym stadium rozwoju, z wyraźnymi liścieniami (sierpień).

Tabela 2. Inicjacja kalusa embriogenego na niedojrzałych zarodkach zygocycznych modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.)Table 2. Embryogenic callus initiation on immature zygotic embryos of European larch (*Larix decidua* Mill.)

Pochodzenie eksplantatów Explant origin/		Związki uzupełniające pożywkę podstawową MSG Supplements of MSG basal medium	Liczba eksplantatów No. of explants	Frekwencja inicjacji kalusa embriogenego Frequency of embryogenic callus initiation (%)
Nadleśnictwo, data zbioru Forest District, collection date	Numer drzewa Number of tree			
Nadl. Olsztynek 07.1998		2,4-D-2 mg/l BAP-1 mg/l sacharoza-10 g/l	39	0
Nadl. Łuków 07.1998	3084	2,4-D-2,5 mg/l kinetyna-2,5 mg/l zeatyna-0,5 mg/l sacharoza-20 g/l	27	0 +
		2,4-D-2 mg/l BAP-1 mg/l sacharoza-30 g/l	17	0
		2,4-D-2 mg/l BAP-1 mg/l sacharoza-10 g/l	10	0
Nadl. Łuków 07.1998	3081	2,4-D-2 mg/l BAP-1 mg/l sacharoza-10 g/l	40	0
		2,4-D-2 mg/l BAP-1 mg/l sacharoza-30 g/l	30	0
Nadl. Łuków 07.1998	3081	2,4-D-2,5 mg/l kinetyna-2,5 mg/l zeatyna-0,5 mg/l sacharoza-20 g/l	30	0
Nadl. Łuków 07.1999	2864	2,4-D-2 mg/l	23	0+
	2926	BAP-1 mg/l	22	0
	3084	sacharoza-30 g/l	15	
Nadl. Kutno 08.2002		2,4-D-2 mg/l BAP-1 mg/l zeatyna-1 mg/l	23	8,6

+ **obecność kalusa** occurrence of callus

W 2001 r. zainicjowano kalus embriogeny na niedojrzałych zygocycznych zarodkach modrzewia europejskiego (wykładano megagametofit) pochodzących z nasion z plantacyjnej uprawy nasiennej w Nadl. Łuków, w której szyszki zebrano pod koniec czerwca. Wykorzystano szyszki tylko z 5 drzew, ponieważ większość nasion było pustych lub robaczywych (tab. 3). Należy nadmienić, że był to rok o słabym obradzaniu szyszek modrzewia. Zależnie od próby 8,6–35,7% zarodków wykształciło kalus embriogeny (fot. 1).

W dużym procencie (40%) wykształciła się tkanka embriogenna, gdy zastosowano jako eksplantaty wtórne dojrzałe somatyczne zarodki w stadium liście-

niowym, wytworzone z kalusa linii nr 2920/II/8 (Nadl. Młynary). W ten sposób uzyskano II generację kalusa embriogenego, a z zarodków wytworzonych z tego kalusa zainicjowano tkankę embriogeną u 80% eksplantatów z zarodków globularnych, a u 74,4% eksplantatów z zarodków liścieniowych (III generacja kalusa) (tab. 4).

Barwienie acetokarminem wykazało w zainicjowanej tkance embriogennej obecność prazarodków (wczesne stadium rozwojowe somatycznych zarodków) (fot. 2).

Tabela 3. Inicjacja kalusa embriogenego modrzewia europejskiego na megagametoficie

Table 3. European larch embryogenic callus initiation on megagametophyte

Pochodzenie eksplantatów/ nr drzewa i kwatery Explants origin/tree and plot number	Rodzaj pożywki do inicjacji Kind of initiation medium	Liczba wyłożo- nych zarodków No. of explants	Frekwencja inicjacji kalusa embriogenego Frequency of embryo- genic callus initiation (%)
Nadl. Młynary 2920/II	BM-3 2,4-D-2 mg/l BAP-1 mg/l	34	26,5
Nadl. Dobrocin 3079/I	BM-3* 2,4-D-2 mg/l BAP-1 mg/l	14	35,7
Nadl. Dobrocin 3079/II	BM-3 2,4-D-2 mg/l BAP-1 mg/l	27	11,1
Nadl. Dobrocin 3079/III	MSG 2,4-D-2 mg/l BAP-1 mg/l zeatyna-1 mg/l	35	8,6
Nadl. Dobrocin 3080/III	MSG 2,4-D-2 mg/l BAP-1 mg/l zeatyna-1 mg/l	19	21,0

* z dodatkiem 1 g/l hydrolizatu kazeiny, 2,4-D – 2 mg/l i BAP – 1 mg/l przez 2 tygodnie (Gupta i Durzan 1986), następnie na pożywce MSG z dodatkiem 2 mg/l 2,4-D, 1 mg/l BAP i 1 mg/l zeatyny with 1 g/l of hydrolysate casein, 2,4-D – 2 mg/l and BAP – 1 mg/l during 2 weeks (Gupta and Durzan 1986), later on MSG medium with 2 mg/l 2,4-D, 1 mg/l BAP and 1 mg/l of zeatine



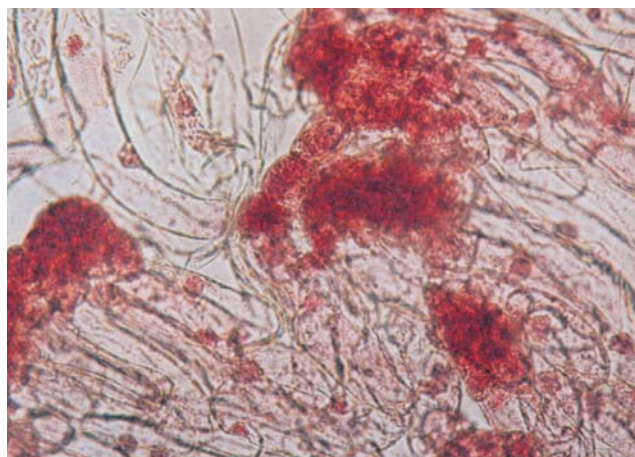
Fot. 1. Inicjacja kalusa embriogenego modrzewia europejskiego na megagametoficie (pochodzenie nasion Nadl. Młynary)

Photo 1. Embryogenic callus initiation on megagametophyte of European larch (Młynary origin)

Tabela 4. Inicjacja kalusa embriogenego drugiej i trzeciej generacji (linia macierzysta pochodzenia Nadl. Młynary, numer 2920/II/8)

Table 4. Embryogenic callus initiation – second and third generation (parent line origin – Młynary Forest district, number 2920/II/8)

Rodzaj eksplantatu (somatyczne zarodki) Kind of explantat (somatic embryos)	Liczba eksplantatów No. of explants	Frekwencja inicjacji kalusa embriogenego Frequency of embryogenic callus initiation (%)	Liczba linii kalusa embriogenego No. of embryogenic callus lines
II generacja kalusa embriogenego Second generation of embryogenic callus			
Zarodki liścieniowe Cotyledonary embryos	20	30,0	6
	20	55,0	11
	20	60,0	12
	20	25,0	5
	20	30,0	6
Ogółem Total	100	40,0	40
III generacja kalusa embriogenego Third generation of embryogenic callus			
Zarodki liścieniowe Cotyledonary embryos	15	66,7	10
	15	79,9	12
	15	93,3	14
	15	73,3	11
	15	79,3	12
	15	53,3	8
Ogółem Total	90	74,4	67
Zarodki globularne Globular embryos	15	79,3	12
	15	66,7	10
	15	93,3	14
	15	73,3	11
	15	73,3	11
	15	93,3	14
Ogółem Total	90	80,0	72



**Fot. 2. Prazarodki
w kalusie embriogenym**
Photo 2. Proembryos
in embryogenic callus

3.2. Faza namnażania kalusa embriogenego

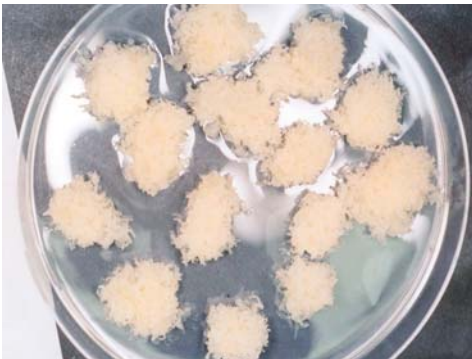
Po pasażu kawałków kalusa na pożywkę do namnażania obserwowano intensywny wzrost jego świeżej masy (fot. 3). Widoczne były różnice w przyroście kalusa embriogenego między liniami. Dla porównania określono przyrost świeżej masy kalusa embriogenego linii francuskich i polskich (ryc. 1). Pomimo że wszystkie kultury hodowano na takiej samej pożywkę, przyrost świeżej masy kalusa był różny, co wskazuje na wpływ genotypu eksplantatu (wyprowadzonej z niego linii kalusa embriogenego) na ten proces.

Nie wszystkie linie kalusa zainicjowane w czerwcu 2001 r. kontynuowały wzrost. Po 7 miesiącach hodowli na pożywkę do namnażania obserwowano przyrost świeżej masy kalusa u 87,5% linii, a po roku tylko u 45,8%. Podobnie zachowały się linie kalusa II generacji: po 9 miesiącach stwierdzono przyrost świeżej masy kalusa u 58,8% linii modrzewia, natomiast pozostałe zbrązowiły i zamarły.

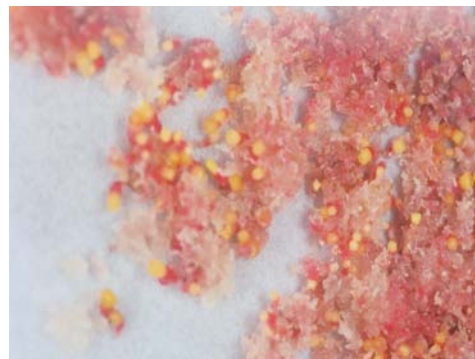
3.3. Dojrzewanie somatycznych zarodków

W tej fazie mikrorozmnażania somatyczne zarodki powiększają rozmiary, różnicują się i gromadzą substancje zapasowe. Po 2 tygodniach hodowli na pożywkę do dojrzewania (pożywka podstawowa uzupełniona 60 mM ABA z 1 mM IBA) obserwowano zarodki w stadium globularnym, a po 3–4 tygodniach zarodki liścieniowe (fot. 4).

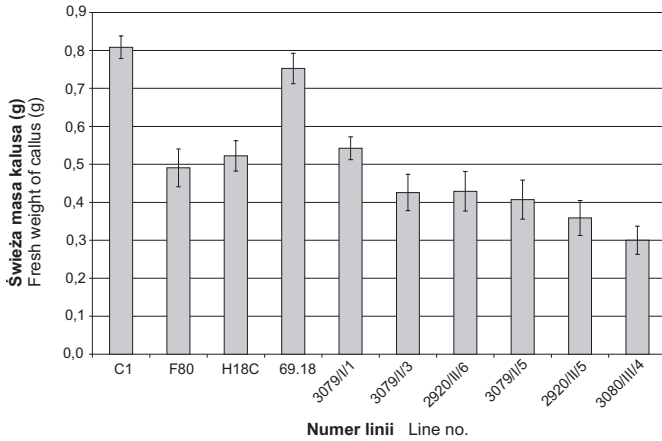
Liczba wytworzonych somatycznych zarodków (ogółem, tj. sumy zarodków w stadium globularnym i liścieniowym oraz osobno liścieniowych) 10 badanych linii kalusa na pożywkę podstawowej wskazuje wyraźnie na wpływ genotypu na ten proces (ryc. 2a, b). Podobną zmienność w dojrzewaniu somatycznych zarodków stwierdzono między liniami modrzewia pochodzenia polskiego i francuskiego. Najwyższą zdolność do embriogenezy wykazywała francuska linia 69.18 (*Larix×leptoeuropaea*). Po 3 tygodniach hodowli kalusa linii 69.18 na pożywkę do dojrzewania zarodków (na filtry papierowym wyłożonym na pożywkę) uzyskano liczne zarodki liścieniowe i globularne. Zależnie od próby wykształciło się



Fot. 3. Namnażanie kalusa embriogenego
Photo 3. Multiplication of embryogenic callus



Fot. 4. Dojrzałe somatyczne zarodki
Photo 4. Mature somatic embryos

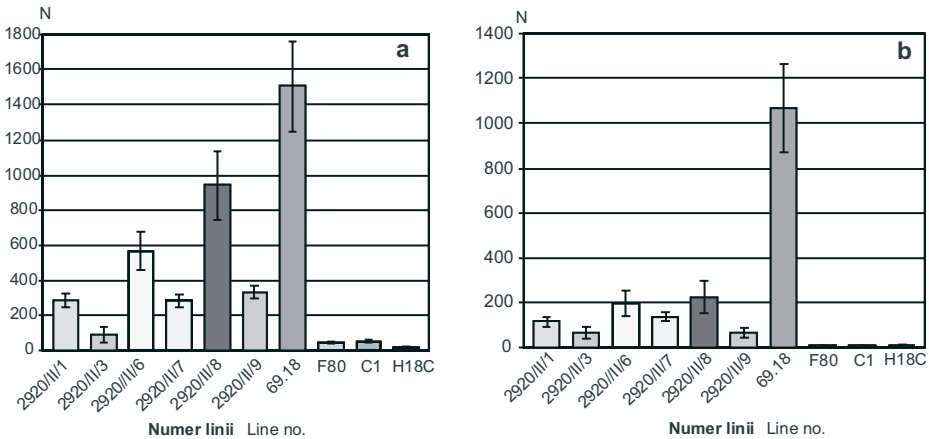


Ryc. 1. Przyrost świeżej masy kalusa embriogenego różnych linii modrzewia pochodzenia francuskiego (C1, F80, H18C, 69.18) i polskich; średnia±błąd standardowy

Fig. 1. Fresh weight increment of embryogenic callus of different larch lines of French origin (C1, F80, H18C, 69.18) and Polish ones (mean ± standard error)

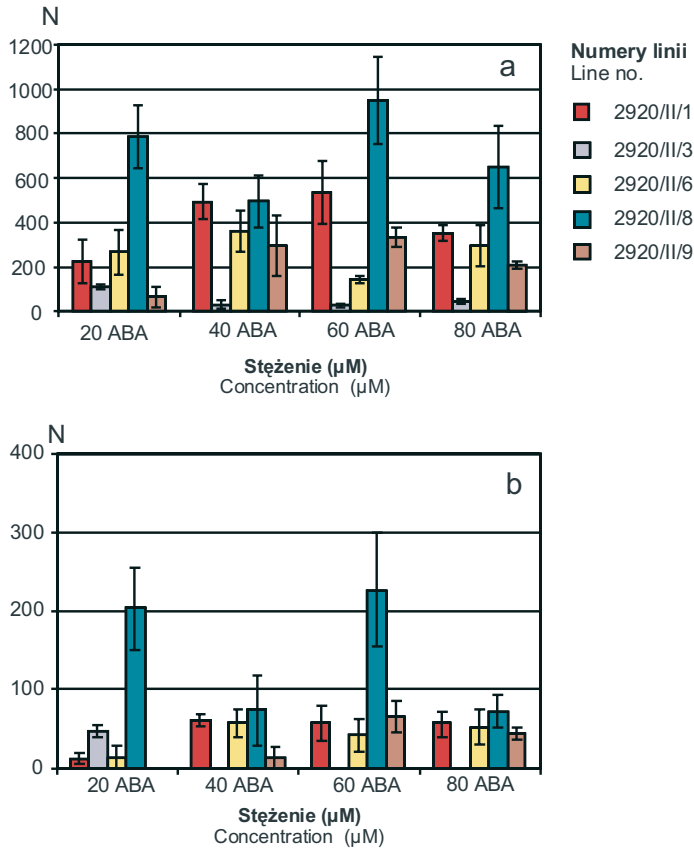
800–1500 sztuk zarodków somatycznych (w tym 60–70% zarodków liścieniowych) z jednego grama świeżej masy kalusa. Najwyższą zdolność do regeneracji somatycznych zarodków modrzewia europejskiego wykazały dwie linie pochodzenia Nadl. Młynary (linia nr 2920/II/6 i 2920/II/8).

Wpływ genotypu uwidocznił się również, gdy uzupełniono pożywkę do dojrzewania różnymi stężeniami ABA (20–80 mM) i IBA (1mM). Określono średnią liczbę somatycznych zarodków zregenerowanych z 10 linii modrzewia europejskiego zainicjowanych na niedojrzałych zygotycznych zarodkach w 2001 r. (ryc. 3a, b). Z badanych linii 5 wytworzyło zarodki liścieniowe, 1 – pojedyncze glo-



Ryc. 2. Liczba somatycznych zarodków modrzewia N (na 1 g świeżej masy kalusa) wykształconych na pożywce podstawowej uzupełnionej 60 μ M ABA z 1 μ M IBA w zależności od genotypu eksplantatu: a – somatyczne zarodki ogółem, b – zarodki liścieniowe (średnia±błąd standardowy)

Fig. 2. Number of larch somatic embryos N (per 1 g of fresh weight of callus) on the basal medium with 60 μ M ABA z 1 μ M IBA depending on explant genotype: a – total number of somatic embryos, b – cotyledonary somatic embryos (mean±standard error)



Ryc. 3. Liczba somatycznych zarodków modrzewia europejskiego N (na 1 g świeżej masy kalusa) w zależności od stężenia ABA (1 μM IBA): a – somatyczne zarodki globularne, b – somatyczne zarodki liścieniowe. Linie embriogenne pochodzenia Nadl. Młynary (średnia±błąd standardowy)

Fig. 3. Number of European larch somatic embryos N (per 1 g of fresh weight of callus) depending on concentration of ABA (1 μM IBA): a – globular somatic embryos, b – cotyledonary somatic embryos. Embryogenic lines origin from Młynary Forest district (mean±standard error)

bularne, a 4 genotypy w tych warunkach hodowli w ogóle nie wykształciły zarodków (po 3 tygodniach hodowli na tych pożywkach). Poszczególne linie kalusa charakteryzują się różną zdolnością do regeneracji zarodków i zareagowały w różny sposób na zastosowane w pożywce stężenia ABA. Najwięcej zarodków ogółem (949 szt.) i liścieniowych (226 szt.) zregenerowało się z kalusa linii 2920/II/8 na pożywce z 60 mM ABA. Podobnie zareagowała linia 2920/II/1, podczas gdy linia 2920/II/3 wytworzyła zarodki liścieniowe tylko na pożywce z 20 mM ABA (47 szt.). Zwiększenie stężenia ABA w podłożu do 80 mM nie miało wyraźnego wpływu na liczbę zregenerowanych somatycznych zarodków u większości badanych linii.

Tabela 5. Liczba somatycznych zarodków liścieniowych po 3 i 6-tygodniach hodowli na pożywce uzupełnionej różną ilością ABA (pożywka podstawowa MSG; średnia±błąd standardowy)

Table 5. Number of somatic embryos at cotyledonary stage after 3 and 6 weeks on maturation medium supplemented with different concentration of ABA (basal medium MSG; mean±standard error)

Pochodzenie/ nr linii kalusa Origin/ No. of callus line	Stężenie ABA (mM) ABA concentration (mM)	Średnia liczba somatycznych zarodków ogółem/ g świeżej masy kalusa Mean total number of somatic embryos/ g of fresh weight of callus	Średnia liczba somatycznych zarodków liścieniowych/ g świeżej masy kalusa Mean number of cotyledonary somatic embryos/ g of fresh weight of callus	
		po 3 tygodniach after 3 weeks	po 6 tygodniach after 6 weeks	
Nadl. Młynary	2920/II/1	20	238,65 ± 62,77	497,57 ± 89,45
		40	553,85 ± 73,94	695,79 ± 108,85
		60	521,85 ± 158,69	546,12 ± 185,38
		80	408,58 ± 49,71	853,56 ± 119,39
	2920/II/3	20	159,94 ± 34,67	83,60 ± 22,11
		40	31,64 ± 18,99	6,32 ± 6,32
		60	27,26 ± 5,45	32,71 ± 10,9
		80	49,07 ± 16,35	68,06 ± 19,07
	2920/II/6	20	280,14 ± 115,62	290,76 ± 102,11
		40	420,36 ± 110,44	292,55 ± 108,58
		60	164,89 ± 37,23	297,87 ± 21,28
		80	346,36 ± 19,78	307,29 ± 77,65
	2920/II/8	20	988,51 ± 193,94	969,03 ± 165,58
		40	711,97 ± 96,03	718,55 ± 78,55
		60	1175,38 ± 269,00	1172,42 ± 141,25
		80	722,14 ± 197,88	595,32 ± 92,18
2920/II/9	20	65,04 ± 44,78	27,10 ± 33,19 inf.	
	40	307,76 ± 131,32	90,45 ± 27,95 inf.	
	60	398,37 ± 61,38	246,61 ± 25,85	
	80	252,03 ± 8,13	165,31 ± 68,72	
Nadl. Dobrocin	3079/I/2	20	0	264,73 ± 74,25
		40	0	332,98 ± 72,5
		60	0	367,58 ± 66,61
		80	0	283,38 ± 200,38
	3079/I/8	20	0	39,28 ± 27,77
		40	0	62,5 ± 20,83
		60	0	41,66 ± 8,02
		80	0	18,52 ± 12,25

Z wieloczynnikowej analizy wariancji wynika, że stężenie ABA nie wpływa w sposób statystycznie istotny ($p < 0,05$) na liczbę wytworzonych somatycznych zarodków (globularnych i liścieniowych), po 3-tygodniowym okresie hodowli kultur na pożywce uzupełnionej różnymi stężeniami kwasu abscysynowego. Natomiast istotny statystycznie ($p < 0,05$) okazał się wpływ linii kalusa (genotypu) na ich liczbę. Po 6-tygodniowym kontakcie kultur z podłożem z ABA, u większości badanych linii kalusa 100% somatycznych zarodków rozwinęło się w zarodki liścieniowe (tab. 5). Po tym okresie dwie z badanych linii, u których nie obserwowano zarodków po 3-tygodniach hodowli na pożywce do dojrzewania, wytworzyło zarodki w stadium liścieniowym (linie pochodzenia Nadl. Dobrocin, nr

Tabela 6. Liczba somatycznych zarodków linii macierzystej (pochodzenia Nadl. Młynary) oraz zarodków z kalusa II i III generacji na pożywce podstawowej (MSG) uzupełnionej 60 mM ABA z 1 mM IBA (średnia±błąd standardowy)

Table 6. Number of somatic embryos of parent line (origin – Młynary Forest district), and of embryos from 2nd and 3rd generation of callus on basal medium MSG supplemented with 60 mM ABA and 1 mM IBA (mean±standard error)

Nr linii kalusa No. of callus line	Liczba somatycznych zarodków ogółem/gram świeżej masy kalusa embriogenego Total number of somatic embryos/g of fresh weight of embryogenic callus	Liczba somatycznych zarodków liścieniowych/gram świeżej masy kalusa embriogenego Number of cotyledonary somatic embryos/g of fresh weight of embryogenic callus
linia macierzysta parent line	949,10 ± 226,28	226,28 ± 73,35
II generacja 2 nd generation	290,34 ± 38,46	59,51 ± 10,98
III generacja 3 rd generation	278,05 ± 9,0	118,46 ± 13,50

3079/I/2 i 3079/I/8). Przedłużona hodowla kultur z trzech do sześciu tygodni spowodowała wzrost liczby zarodków liścieniowych, u niektórych linii nawet przewyższając liczbę zarodków ogółem obserwowanych po trzech tygodniach. Spowodowane było to rozwojem somatycznych zarodków w stadium globularnym wewnątrz masy kalusa, w początkowym okresie hodowli niewidocznych na jego powierzchni. Jak wykazały późniejsze doświadczenia, zarodki 6-tygodniowe charakteryzują się niższą zdolnością kiełkowania. Istotny statystycznie okazał się – jak poprzednio – wpływ genotypu na dojrzewanie somatycznych zarodków.

Wyniki badań nad dojrzewaniem somatycznych zarodków w przeprowadzonych doświadczeniach nie były jednoznaczne. Można jednak stwierdzić, że w celu uzyskania najlepszej efektywności dojrzewania somatycznych zarodków modrzewia europejskiego wskazane jest uzupełnienie pożywki podstawowej o ABA w stężeniu 20–60 mM i IBA, w stężeniu 1 mM.

Na dużą wydajność mnożenia modrzewia europejskiego metodą somatycznej embriogenezy wskazuje możliwość uzyskania dojrzałych somatycznych zarodków również z kalusa II i III generacji (tab. 6).

3.4. Kiełkowanie i adaptacja somatycznych siewek modrzewia do wzrostu w warunkach naturalnych

Somatyczne zarodki modrzewia charakteryzują się wysoką zdolnością kiełkowania, która w sposób widoczny zależna jest od pochodzenia zarodków (tab. 7 i 8, fot. 5).

Nie obserwowano wyraźnego wpływu stężenia ABA w podłożu do dojrzewania somatycznych zarodków na ich kiełkowanie (tab. 7). Jedynie zarodki wykształcone z kalusa linii 2920/II/8 kiełkowały lepiej, gdy kultury hodowano na podłożu z 40 mM ABA (zdolność kiełkowania 76,7%). Zaznaczył się wpływ wieku

Tabela 7. Kielkowanie somatycznych zarodków modrzewia linii z Nadl. Młynary w zależności od stężenia ABA (z 1 mM IBA) w pożywce do dojrzewania (średnia±błąd standardowy)

Table 7. Germination of somatic embryos of larch lines from Młynary Forest district depending on concentration of ABA (with 1 mM IBA) on the maturation medium (mean±standard error)

Numer linii kalusa No. of callus line	Stężenie ABA (mM) w pożywce do dojrzewania ABA concentration (mM) in maturation medium	Liczba somatycznych zarodków na pożywce do kielkowania Somatic embryos number on germination medium	% zarodków z korzeniami % of embryos with roots
2920/II/8	20	60	50,0 ± 6,7
	40	60	76,7 ± 3,3
	60	90	48,9 ± 6,8
	80	60	40,0 ± 6,7
2920/II/1	20	104	71,6 ± 4,3
	40	75	67,8 ± 1,1
	60	90	63,3 ± 8,8
	80	70	72,1 ± 4,6

Tabela 8. Kielkowanie somatycznych zarodków uzyskanych z różnych linii kalusa embriogenego pochodzących z Francji na pożywce do dojrzewania z 60 mM ABA (1 mM IBA)

Table 8. Germination of somatic embryos from different embryogenic callus lines from France on the maturation medium with 60 mM ABA (1 mM IBA)

Nr linii kalusa No. of callus line	Liczba somatycznych zarodków na pożywce do kielkowania Somatic embryos number on germination medium	Zarodki z korzeniami Embryos with roots %
H18C	30	30,0
F80	30	13,3
C1	300	11,3
69.18	93	73,0

**Fot. 5. Kielkowanie somatycznych zarodków**
Photo 5. Germination of somatic embryos

Tabela 9. Wpływ wieku somatycznych zarodków modrzewia europejskiego na ich kiełkowanie po 14 i 28 dniach (pochodzenie Nadl. Młynary; średnia±błąd standardowy)

Table 9. Influence of European larch somatic embryos age on theirs germination after 14 and 28 days (origin of Młynary Forest district; mean±standard error)

Wiek somatycznych zarodków (tygodnie) Somatic embryos age (weeks)	Nr linii kalusa No. of callus line	Kiełkowanie po 14 dniach Germination after 14 days		Kiełkowanie po 28 dniach Germination after 28 days	
		% zarodków z liścieniami % of embryos with cotyledons	% zarodków z korzeniami % of embryos with roots	% zarodków z liścieniami % of embryos with cotyledons	% zarodków z korzeniami % of embryos with roots
4	2920/II/1	98,30 ± 1,67	70,0 ± 2,29	98,33 ± 1,67	88,33 ± 4,40
	2920/II/3	86,67 ± 8,82	56,67 ± 6,67	93,33 ± 6,67	66,67 ± 16,67
	2920/II/6	94,44 ± 2,94	26,67 ± 11,71	94,44 ± 2,94	42,22 ± 11,66
	Średnio Mean	93,15 ± 3,43	51,11 ± 12,81	95,37 ± 1,51	65,74 ± 13,32
5	2920/II/1	96,67 ± 3,33	66,67 ± 6,67	96,67 ± 3,33	76,67 ± 6,67
	2920/II/3	90,0 ± 0	50,0 ± 0	85,0 ± 5,0	65,0 ± 5,0
	2920/II/6	98,33 ± 1,67	13,33 ± 7,27	96,67 ± 1,67	33,33 ± 13,33
	Średnio Mean	95,0 ± 2,54	43,33 ± 15,7	92,78 ± 3,89	58,33 ± 12,95
6	2920/II/ 1	82,17 ± 4,43	42,20 ± 5,88	97,77 ± 2,23	48,87 ± 8,87
	2920/II/3	20,0 ± 10,0	45,0 ± 35,0	65,0 ± 35,0	50,0 ± 40,0
	2920/II/6	80,0 ± 6,94	46,65 ± 7,71	78,88 ± 7,78	47,77 ± 7,73
	Średnio Mean	60,72 ± 20,37	44,62 ± 1,30	80,55 ± 9,50	48,88 ± 0,64

Tabela 10. Wpływ wieku somatycznych zarodków *Larix×leptoeuropaea* na ich kiełkowanie (linia 69.18; średnia±błąd standardowy)

Table 10. Influence of *Larix × leptoeuropaea* somatic embryos age on their germination (parent line no. 69.18; mean±standard error)

Wiek somatycznych zarodków (tygodnie) Somatic embryos age (weeks)	Liczba somatycznych zarodków na pożywce do kiełkowania Number of somatic embryos on germination medium	Kiełkowanie Germination (%)
4	93	73,02 ± 3,7
5	54	46,97 ± 4,74
7	325	15,14 ± 3,91
8	52	22,83 ± 1,48

somatycznych zarodków (długość hodowli kultur na podłożu z ABA) na ich zdolność kiełkowania. Najwyższy wskaźnik kiełkowania (% zarodków z korzeniami) po 14 i 28 dniach hodowli na podłożu do kiełkowania miały zarodki 4-tygodniowe (odpowiednio 51,11 i 65,74%, tab. 9). Taką samą zależność stwierdzono dla linii francuskiej (tab.10).

Tabela 11. Kielkowanie somatycznych zarodków modrzewia europejskiego II i III generacji kalusa embriogenego (linia macierzysta pochodzenia Młynary, nr 2920/II/8; średnia±błąd standardowy)

Table 11. Germination of the European larch somatic embryos of 2nd and 3rd generation of embryogenic calluses (parent line origin – Młynary Forest district, no. 2920/II/8; mean±standard error)

Numer linii/ generacja kalusa No. of line/callus generation	Liczba somatycznych zarodków Somatic em- bryos number	Kielkowanie po 14 dniach Germination after 14 days		Kielkowanie po 28 dniach Germination after 28 days		
		% zarodków z liścieniami % of embryos with cotyledons	% zarodków z korzeniami % of embryos with roots	% zarodków z liścieniami % of embryos with cotyledons	% zarodków z korzeniami % of embryos with roots	
1	II	15	80,0	66,7	80,0	66,7
2		15	73,3	46,7	73,3	66,7
3		15	100,0	73,3	100,0	73,3
4		15	100,0	93,3	100,0	92,5
5		15	53,3	86,7	53,3	53,3
6		58	89,3	59,6	93,7	70,5
Średnio Mean			82,6 ± 7,3	71,0 ± 7,8	83,3 ± 7,5	70,5 ± 5,3
1	III	170	100,0	81,8	100,0	87,3
3		15	60,0	20,0	80,0	46,7
5		25	72,0	40,0	100,0	44,0
6		30	83,3	46,7	83,3	60,0
7		60	88,3	20,0	91,7	40,0
Średnio Mean			80,7 ± 6,8	41,7 ± 11,3	91,0 ± 4,2	55,6 ± 8,6

Tabela 12. Wpływ stężenia ABA (1 mM IBA) w pożywce do dojrzewania na wielkość dwumiesięcznych somatycznych siewek modrzewia europejskiego (pochodzenie Nadl. Młynary; średnia±błąd standardowy)

Table 12. Influence of ABA concentration (1 mM IBA) in maturation medium on size two-month-old somatic seedlings of European larch (origin – Młynary Forest district; mean±standard error)

Nr linii kalusa embriogenego No. of embryo- genic callus line	Liczba siewek somatycznych No. of somatic seedlings	Stężenie ABA(mM) w pożywce do dojrzewania ABA (mM) concentration in maturation medium	Długość korzenia Root length (cm)	Długość pędu Shoot length (cm)
2920/II/1	106	20	1,04 ± 0,24	0,56 ± 0,08
		40	0,93 ± 0,06	0,60 ± 0,04
		60	0,82 ± 0,06	0,66 ± 0,03
		80	1,03 ± 0,07	0,66 ± 0,02
2920/II/7	24	20	1,05 ± 0,19	0,63 ± 0,05
		60	1,00 ± 0,21	0,67 ± 0,05
		80	1,02 ± 0,16	0,56 ± 0,02



Fot. 6. Dwumiesięczna siewka somatyczna

Photo 6. Two-month-old somatic seedling

Wysoką wartość kiełkowania miały również somatyczne zarodki wytworzone na kalusie II generacji, po 14 i 28 dniach 71,0 i 70,5%, i III generacji – odpowiednio 41,7 i 55,6% zarodków z korzeniami (tab. 11), przewyższającą wartość kiełkowania linii macierzystej (pochodzenie Nadl. Młynary, linia nr 2920/II/8) (tab. 7). Do dojrzewania zarodków zastosowano pożywkę uzupełnioną 60 mM ABA z 1 mM IBA).

Dwumiesięczne somatyczne siewki, z prawidłowo ukształtowanym korzeniem i zawiązkami pierwszych igieł lub wyraźnymi igłami (fot. 6) wysadzono w mieszaninie torfu z piaskiem lub wermikulitem (v:v, 1:1), (tab. 12). Analiza statystyczna wyników potwierdza brak istotnego statystycznie wpływu stężenia kwasu absycynowego w pożywce do dojrzewania somatycznych zarodków na długość korzenia i pędu dwumiesięcznych siewek.

Somatyczne siewki modrzewia po wysadzeniu ze sterylnego podłoża do warunków naturalnych przez okres 1–2 miesięcy hodowano w fitotronie w warunkach wysokiej wilgotności powietrza (80–90%), następnie stopniowo obniżano wilgotność powietrza (60–70%) i przenoszono do szklarni. Przeżywalność siewek somatycznych wskazuje na wysoką zdolność adaptacji do warunków naturalnych



Fot. 7. Dwuletnie sadzonki modrzewia europejskiego

Photo 7. Two-year-old somatic seedlings of European larch



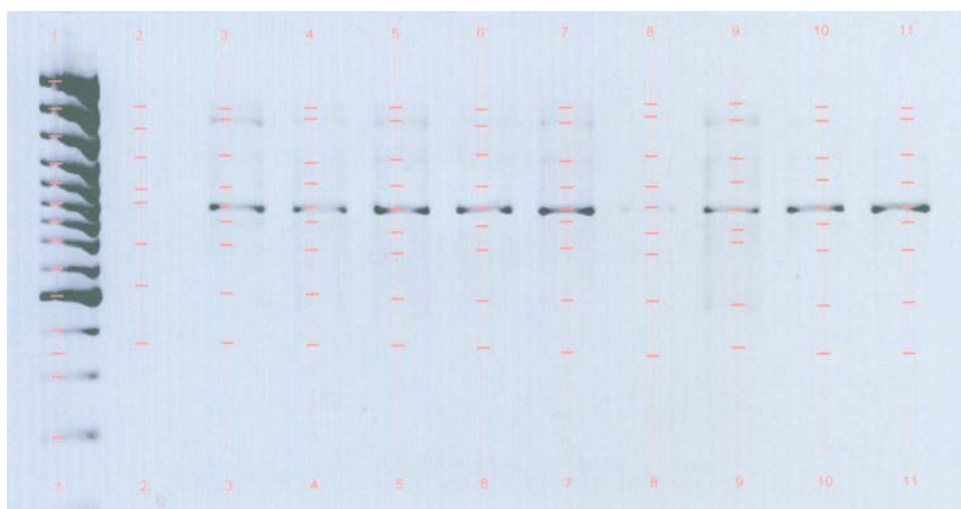
Fot. 8. Dwuletnie sadzonki mieszańców *Larix x leptoeuropaea*

Photo 8. Two-year-old plantlets of *Larix x leptoeuropaea*

modrzewia zarówno europejskiego (przeżywalność 30–50%), jak i mieszańców uzyskanych z Francji (linia 69.18 – przeżywalność siewek zależnie od próby 50–80%). Siewki te charakteryzują się także dobrym wzrostem po przesadzeniu ich do podłoża (fot. 7, 8). Zwiększenie przeżywalności byłoby możliwe poprzez hodowlę siewek w szklarni z automatycznym zamgławianiem. W 1999 r. 165 somatycznych siewek zregenerowanych z kalusa linii 69.18 (*Larix × leptoeuropaea* Dengler) wysadzono w szkółce w Sękocinie. Wszystkie siewki przezimowały i wiosną wykazywały prawidłowy rozwój. Wiosną 2002 r. wysadzono w szkółce w Sękocinie 90 siewek somatycznych modrzewia europejskiego (pochodzenia Nadl. Młynary), które po trzech sezonach wegetacyjnych także charakteryzowały się prawidłowym rozwojem i wzrostem pędu.

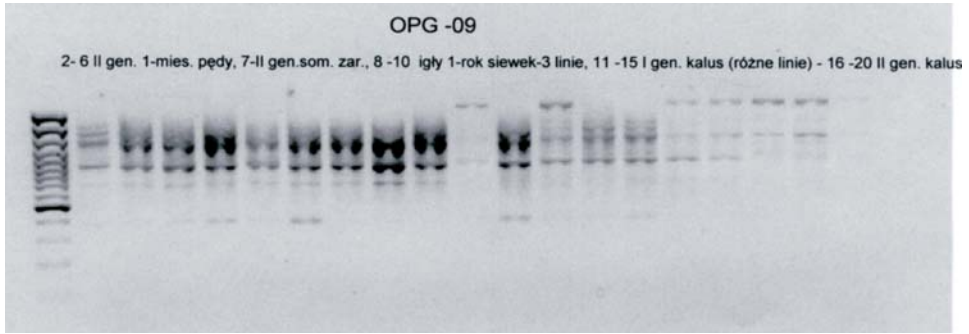
3.5. Stabilność genetyczna kultur modrzewia europejskiego

Z analizy zmienności genetycznej, wykonywanej techniką RAPD, wynika, że badane kultury modrzewia są stabilne genetycznie. Na podstawie migracji elektroforetycznej genomowego DNA wyekstrahowanego z pędów dwumiesięcznych siewek somatycznych otrzymanych z kalusa III generacji, oszacowano zawartość DNA, która wahała się od 75 do 242 ng/μl, w pędach jednomiesięcznych siewek II generacji 70–120 ng/μl, w kalusie I generacji 28–53 ng/μl, a II generacji 52–90 ng/μl. Analiza 18 starterów w reakcji PCR (DNA z pędów dwumiesięcznych siewek somatycznych z kalusa III generacji) wykazała największą ilość fragmentów DNA dla starterów: OPF-07 i OPG-09. Rycina 4 przykładowo przedstawia analizę RAPD tego materiału (starter OPF-07). Migrację elektroforetyczną DNA (starter OPG-09) z pędów jednomiesięcznych siewek z kalusa II generacji (profile



Ryc. 4. RAPD (OPF-07) pędów dwumiesięcznych somatycznych siewek modrzewia z kalusa embriogenego III generacji

Fig. 4. RAPD (OPF-07) of two-month-old larch somatic seedlings from 3rd generation of embryogenic callus



Ryc. 5. RAPD (OPG-09) pędów jednomiesięcznych siewek z kalusa II generacji (profile migracyjne nr 2–6), somatyczne zarodki z kalusa II generacji –7, od 8–10 igły jednorocznych siewek z trzech linii, 11–15 różne linie kalusa I generacji i profile 16–20 reprezentują różne kalusy II generacji

Fig. 5. RAPD (OPG-09) of one-month-old shoots of seedlings from 2nd generation callus (migration profiles No. 2–6), somatic embryos from 2nd generation of callus –7, 8–10 needles one-year-old seedlings from 3 lines, 11–15 different lines of 1st generation callus, 16–20 different callus of 2nd generation

migracyjne 2–6), somatycznych zarodków z kalusa II generacji (7), igieł jednorocznych siewek z trzech linii (8–10), różnych linii kalusa I generacji (11–15) i różnych kalusów II generacji (16–20) pokazano na rycinie 5. Komputerowa analiza wielkości powielonych fragmentów DNA nie wykazała różnic w profilach migracyjnych badanego materiału.

4. PODSUMOWANIE

Faza inicjacji kalusa embriogenego

Uzyskano stosunkowo wysoką frekwencję inicjacji kalusa embriogenego modrzewia europejskiego przy zastosowaniu jako eksplantatu megagametofitu.

Na ten pozytywny wynik złożyło się wiele czynników: przede wszystkim odpowiednie stadium rozwojowe zarodków (stadium przedliścieniowe), na co miał wpływ termin zbioru (koniec czerwca) i warunki pogodowe (upalna wiosna). Korzystne okazało się również wyłożenie eksplantatów (megagametofit) na 2 tygodnie na pożywkę podstawową BM-3, stosowaną w celu uzyskania somatycznej embriogenezy świerka pospolitego (Gupta i Durzan 1986, wzbogaconą o hydrolizat kazeiny w ilości 1 g/l), a także dalsza hodowla kalusa na pożywce MSG uzupełnionej 2,4-D (2 mg/l) z BAP (1 mg/l) i dodatkowo zeatyną (1 mg/l). Należy zaznaczyć, że wykonano tylko jeden zbiór szyszek w czerwcu 2001 r., w roku nieurodzaju nasion modrzewia.

Również inicjacja kalusa embriogenego na niedojrzałych zygotycznych zarodkach w późnym stadium rozwojowym była zadowalająca. Jednak wadą za-

stosowania niedojrzałych zygotycznych zarodków jako źródła eksplantatów są trudności ich pozyskiwania w odpowiednim stadium rozwojowym (ze względu na krótki okres rozwoju zarodków), zależnym od warunków pogodowych w danym sezonie wegetacyjnym. Ponadto kosztowny jest wielokrotny zbiór szyszek. Z tego względu podjęto próby nad zastosowaniem do inicjacji tkanki embriogennej dojrzałych zarodków zygotycznych, co daje możliwość wykorzystania jako materiału wyjściowego do rozmnażania również nasion przechowywanych w chłodniach. Lelu ze współautorami (1994a) jako jedyni uzyskali kalus embriogeny (5%) u *Larix decidua*, stosując jako eksplantaty dojrzałe zarodki zygotyczne. W swych badaniach zastosowali oni nasiona z Nadleśnictwa Suchedniów, obręb Bliżyn, ze zbioru w 1987 r. W niniejszych badaniach, pomimo wielu prób, nie udało się uzyskać tkanki embriogennej z zarodków z nasion tego samego pochodzenia i zbioru. Na inicjację kalusa embriogenego mają wpływ, poza pochodzeniem nasion, warunki ich dojrzewania i przechowywania, a także termin ich zbioru.

Podstawową trudnością w somatycznej embriogenezie modrzewia europejskiego jest faza inicjacji kalusa embriogenego na dojrzałych zygotycznych zarodkach.

Według Chałupki (informacja ustna) nieskuteczność inicjacji kalusa z dojrzałych zarodków generatywnych u tego gatunku wynika z występowania różnego rodzaju zaburzeń w procesie rozmnażania generatywnego, a szczególnie na różnych etapach rozwoju zarodka, czego efektem końcowym jest niezwykle niski procent wytwarzanych pełnych nasion. Zaburzenia występujące w końcowej fazie dojrzewania zarodka mogą być przyczyną braku jego zdolności do inicjacji tkanki embriogennej. Uzyskanie takiej tkanki z niedojrzałych zarodków modrzewia pozwala przypuszczać, iż w procesie formowania zarodków zygotycznych jedynie w niektórych fazach możliwa jest inicjacja tkanki embriogennej.

Faza inicjacji kalusa embriogenego wymaga dalszych badań, w których należy również uwzględnić inne źródła eksplantatów (igły, pąki z siewek somatycznych i zygotycznych, a także ze starych drzew).

Namnażanie kalusa embriogenego

W fazie namnażania kalusa embriogenego stwierdzono intensywny przyrost świeżej masy kalusów trzech generacji. Obserwowano zamieranie części linii w trakcie namnażania kalusa. Thompson i von Aderkas (1992) podają, że 21–93% niedojrzałych zarodków *Larix occidentalis* wykształciło kalus embriogeny, a tylko 3% kontynuowało wzrost w postaci stabilnych linii embriogennych.

Dojrzewanie somatycznych zarodków

W tej fazie kultury wykładano kalus embriogeny na pożywkę bez hormonów wzrostu, uzupełnioną węglem aktywnym, na 1 tydzień (Becwar i in. 1987). Węgiel aktywny absorbuje auksyny, cytokininy, fenole i substancje toksyczne. Następnie dodawano do podłoża egzogenego \pm cis trans ABA, który stymuluje proces prawidłowego dojrzewania somatycznych zarodków.

Dane z literatury wykazują, że uzupełnienie pożywki podstawowej o kwas abscysynowy (ABA) jest niezbędne dla dojrzewania somatycznych zarodków

modrzewia, podobnie jak wielu gatunków drzew iglastych (von Arnold i Hakman 1988; Misra 1994; Vagner i in. 1998; Filonova 2000a, b). Kwas abscysynowy odgrywa istotną rolę podczas rozwoju zygocytynych i somatycznych zarodków. Hormon ten ma wpływ na gromadzenie i syntezę substancji zapasowych oraz hamuje przedwczesne ich kiełkowanie jeszcze na kalusie oraz wpływa na późniejsze ich kiełkowanie (Roberts i in. 1990). Kwas abscysynowy hamuje proces namnażania tkanki embriogennej i wzrost większości linii kalusa. Tak długo, jak auksyny i cytokiny są obecne w podłożu, różnicowanie somatycznych zarodków jest zahamowane (Filonova i in. 2000a, b).

Dojrzewanie somatycznych zarodków *Larix leptoeuropaea* wyraźnie zależało od obecności egzogennej ABA w podłożu, a zawartość ABA w zarodkach skorelowana była ze stężeniem tego związku w podłożu do dojrzewania (Lelu i Label 1994). Na podłożu bez kwasu abscysynowego somatyczne zarodki wykazywały nienormalny rozwój (bez hipokotyli i wyodrębnionych liści). Uzupełnienie podłoża o ABA spowodowało natomiast rozwój zarodków o morfologii identycznej lub podobnej jak u zarodków zygocytynych. Po pasażu kultur na pożywkę uzupełnioną o kwas abscysynowy zarodki natychmiast absorbowały ten hormon, natomiast wyrosłe na pożywce bez ABA wykazywały jego brak lub znikomą ilość. Podobne wnioski wynikają również z doświadczeń Lelu ze współpracownikami (1994b). ABA w podłożu powoduje synchroniczny i prawidłowy rozwój somatycznych zarodków *Larix*×*leptoeuropaea*, a ich morfologia jest zbliżona do zarodków zygocytynych. Badania Gutmann i współautorów (1996) wykonane na kalusie tej samej linii potwierdziły, że do prawidłowego rozwoju zarodków dochodzi tylko wówczas, gdy przez 4 tygodnie kalus jest wyłożony na pożywkę uzupełnioną 60 mM ABA. Bez kwasu abscysynowego zarodki są nieprawidłowo rozwinięte. Tylko u zarodków wytworzonych na podłożu z ABA stwierdzono obecność białek zapasowych. Z badań Label i Lelu (2000) wynika, że ABA jest natychmiast pobierany przez tkankę po jej wyłożeniu na podłoże. Stwierdzono brak syntezy endogennej ABA podczas dojrzewania somatycznych zarodków *Larix*×*leptoeuropaea*. Podczas hodowli kultur na pożywce z ABA następowała akumulacja tego związku w zarodkach. Von Aderkas i in. (2001) badając poziom regulatorów wzrostu podczas dojrzewania somatycznych zarodków mieszańca *Larix kaempferi*×*L. decidua*, stwierdzili, że kultury hodowane na podłożu uzupełnionym 60 μM ABA wytworzyły somatyczne zarodki o znacznie wyższej zawartości kwasu abscysynowego niż zarodki zygocytynne. Cytowane badania prowadzone były na mieszańcach modrzewia i ograniczały się do jednej linii kalusa. W przypadku kalusa linii 69.18 (*Larix leptoeuropaea*) największą liczbę wykształconych somatycznych zarodków (z jednego grama świeżej masy kalusa) uzyskano również na podłożu uzupełnionym ABA, w stężeniu 60 mM z 1 mM IBA, podczas hodowli kultur na tym podłożu przez 3–4 tygodni. Była to linia wyjątkowa, o wysokiej zdolności do regeneracji somatycznych zarodków. Liczne zarodki wytworzone z tej linii kalusa charakteryzowały się wysoką zdolnością kiełkowania i adaptacji somatycznych siewek do warunków naturalnych. Z zai-

niczowanych linii polskich *Larix decidua* podobne właściwości miały dwie linie: 2920/II/8 (z której uzyskano dwie generacje kalusa) i linia 2920/II/1 (pochodzenie Nadl. Młynary). Przedłużenie okresu hodowli kultur modrzewia europejskiego (z 3 do 6 tygodni) na pożywce do dojrzewania spowodowało znaczne zwiększenie liczby somatycznych zarodków w stadium liścieniowym, co jednak wpływało negatywnie na ich kiełkowanie.

Stwierdzono wyraźny wpływ genotypu eksplantatu na proces dojrzewania somatycznych zarodków. O wpływie genotypu eksplantatu na proces somatycznej embriogenezy donosiły już wcześniejsze badania (Becwar i in. 1987, Becwar 1993, Cheliak i Klimaszewska 1991). Między innymi obszerne badania nad wpływem genotypu linii kalusa na wszystkie etapy somatycznej embriogenezy świerka białego (*Picea glauca*) zbadali Park i in. (1993, 1994, 1998). Z badań tych autorów wynika, że genotyp ma największy wpływ na inicjację tkanki embriogennej, a mniejszy na pozostałe fazy somatycznej embriogenezy.

Nie można w sposób jednoznaczny ustalić optymalnego stężenia ABA dla wszystkich badanych linii modrzewia europejskiego rodzimego pochodzenia. Niemniej stosowane stężenia ABA (20–60 mM z 1 mM IBA) dla większości badanych linii pozwoliły na uzyskanie dużej liczby somatycznych zarodków w stadium liścieniowym z jednego grama świeżej masy kalusa embriogenego (z kalusa linii macierzystych jak i II i III generacji).

Kiełkowanie somatycznych zarodków i adaptacja siewek do wzrostu i rozwoju w warunkach naturalnych

Nie stwierdzono wyraźnego wpływu stężenia ABA w podłożu do dojrzewania na kiełkowanie somatycznych zarodków i późniejszy rozwój zarodków w siewki. Podobne wyniki uzyskali wcześniej dla *Larix × leptoeuropaea* Label i Lelu (1994). Nie stwierdzono również korelacji między stężeniem ABA w pożywce do dojrzewania somatycznych zarodków a ich zdolnością kiełkowania. Wystąpił jednak wpływ tego związku na rozwój części nadziemnej siewek. W przeprowadzonych doświadczeniach obserwowano wpływ wieku somatycznych zarodków na ich kiełkowanie, zarówno linii polskich jak i francuskich. Lelu i in. (1994c) również stwierdzili wpływ okresu hodowli tkanki embriogennej na pożywce do dojrzewania na kiełkowanie somatycznych zarodków *Larix × leptoeuropaea*.

Adaptacja siewek somatycznych modrzewia europejskiego i linii z Francji przebiegała stosunkowo łatwo. Siewki somatyczne modrzewia zarówno europejskiego, rodzimych pochodzeń, jak i mieszańców uzyskanych z kalusa z Francji (szczególnie z linii nr 69.18) charakteryzują się wysoką zdolnością do adaptacji do warunków naturalnych i dobrym wzrostem już w pierwszym sezonie wegetacji.

Mało jest dotychczas badań nad somatyczną embriogenezą *Larix decidua*. Badania takie dotyczą mieszańców modrzewia europejskiego, ograniczając się na ogół do jednej linii. Najczęściej badaną jest linia numer 69.18 (zainicjowana na niedojrzałym zygotycznym zarodku *Larix × leptoeuropaea* Dengler w 1993 r. w INRA, w Orleanie), na której prowadzone są badania we Francji i Kanadzie.

Stabilność genetyczna kultur modrzewia europejskiego

Analizy RAPD jedno- i dwumiesięcznych siewek somatycznych modrzewia europejskiego II generacji i III generacji oraz kalusa embriogenego (I i II generacji) wskazywały na brak zmienności, określonej jako somaklonalna (Larkin i Swocroft 1981), badanego materiału.

Zmienność tą mogą powodować różne czynniki, np: długoterminowa hodowla kultur, duża częstotliwość pasaży, a zwłaszcza zastosowanie wysokich stężeń auksyny 2,4-D. Auksyna jest jednak niezbędna do inicjacji i namnażania kultur kalusa większości gatunków drzew iglastych, w tym i modrzewia. Weryfikacja stałości genetycznej roślin zregenerowanych metodą somatycznej embriogenezy jest szczególnie ważna, ze względu na długowieczność drzew oraz produkcję materiału sadzeniowego na skalę gospodarczą. Określenie tej zmienności jest również istotne, gdy eksplantaty pochodzą ze starszego materiału. Badania nad obecnością lub brakiem zmienności somaklonalnej mogą być prowadzone w różny sposób: na poziomie morfologicznym, cytologicznym, biochemicznym (izoenzymy, terpeny, antygeny) i molekularnym (markery DNA – RAPD i RFLP).

Stosując metodę analizy izoenzymatycznej Eastman i in. (1991) otrzymali takie same zymogramy dla linii matecznej kalusa, subklonów i somatycznych zarodków liścieniowych uzyskanych w somatycznej embriogenezie rodzimego świerka (*Picea glauca engelmannii*). Stwierdzono, że zastosowany system rozmnażania jest właściwy i może być stosowany w celu klonalnego rozmnażania rodzimego świerka. Podobnie Sułkowska i Szczygieł (1995) oraz Szczygieł i Sułkowska (1996), stosując analizy izoenzymatyczne wybranych linii kalusa embriogenego świerka pospolitego z różnych rodzimych proveniencji, kolejnych generacji kalusa (I, II, III) oraz kalusa embriogenego i zregenerowanych z niego somatycznych zarodków oraz jednomiesięcznych siewek, nie obserwowały zmian w zymogramach badanych kultur, co sugeruje na stabilność genetyczną badanego materiału. Fourre i in. (1997) stwierdzili brak somaklonalnej zmienności, stosując technikę RAPD (zbadano liczne próby i zastosowano wiele starterów) u 4 linii embriogennych świerka pospolitego namnażanych przez 4 lata. Ostatnie badania Harvengt i in. (2001) potwierdzają genetyczną stabilność na poziomie molekularnym między somatycznymi zarodkami uzyskanymi ze starszych eksplantatów (3-letnie igły siewek somatycznych) a zregenerowanymi siewkami i sadzonką mateczną. Wyniki te uzyskano na podstawie analiz 6 jądrowych markerów mikrosatelitarnych.

Zastosowana technika mnożenia modrzewia poprzez somatyczną embriogenezę nie wywołuje zatem zmienności somaklonalnej.

Ze względu na problem niewystarczającej ilości nasion koniecznych do odnowień populacji modrzewia w Polsce, badania nad jego somatyczną embriogenezą są istotne w celu uzyskania odpowiedniej liczby materiału sadzeniowego z wcześniej wyselekcjonowanych – ze względu na cechy przydatne dla leśnictwa – genotypów (Chałupka, informacja ustna).

5. WNIOSKI

1. Zastosowanie jako eksplantatu megagametofitu oraz uzupełnienie pożywki podstawowej (MSG) o 2,4-D (2 mg/l), BAP (1 mg/l) i zeatynę (1 mg/l) umożliwiło uzyskanie wysokiej frekwencji inicjacji kalusa embriogenego (35,7%) modrzewia europejskiego.

2. Najwyższą efektywność dojrzewania somatycznych zarodków uzyskano, gdy kultury hodowano przez 4 tygodnie na pożywce podstawowej (MSG) uzupełnionej ABA, w ilości 20–60 mM i 1 mM IBA (zależnie od genotypu), na świetle o niskim natężeniu (25–30 mE m⁻²s⁻¹).

3. Genotyp eksplantatu ma wyraźny wpływ na proces inicjacji tkanki embriogennej i dojrzewanie somatycznych zarodków.

4. Na dużą wydajność somatycznej embriogenezy modrzewia europejskiego wskazuje możliwość uzyskania kilku generacji kalusa embriogenego, dużej liczby somatycznych zarodków, a z nich siewek.

5. Analiza zmienności genetycznej, przy zastosowaniu techniki RAPD, wykazała brak zmienności somaklonalnej między kalusem embriogenym, siewkami somatycznymi i trzema generacjami badanych kultur modrzewia europejskiego.

6. Wysoka efektywność somatycznej embriogenezy modrzewia oraz wysoka zdolność adaptacji somatycznych siewek do warunków naturalnych wskazują na możliwość wykorzystania tej metody mnożenia na szerszą skalę.

*Serdecznie dziękuję Pani doc. dr hab. Krystynie Bojarczuk
za pomoc w przygotowaniu niniejszej pracy oraz
Pani Jolancie Bieniek za zaangażowanie w pracach laboratoryjnych.*

Praca została złożona 20.05.2005 r. i przyjęta przez Komitet Redakcyjny 20.06.2005 r.

MICROPROPAGATION OF EUROPEAN LARCH (*LARIX DECIDUA* MILL.) VIA SOMATIC EMBRYOGENESIS

Summary

The aim of this study was to apply modified method of somatic embryogenesis for multiplication of European larch (*Larix decidua* Mill.) Polish origin. Mature and immature zygotic embryos with endosperm (megagametophyte) were used for embryogenic tissue (callus) initiation. Embryonal tissue with mature zygotic embryos has not been obtained. Best results of callus induction were on the MSG basal medium supplemented with 2.4-D (2 mg/l), BAP (1 mg/l) and zeatin (1 mg/l). Megagametophyte (with the embryos at precotyledonary stage) as an explant showed a 35.7% frequency of embryogenic callus formation. Maturation of somatic embryos was achieved on MSG medium containing ABA within the range 20–60 μM with 1 μM IBA. After 3–4 weeks, cotyledonary somatic embryos on the maturation medium developed (on

average 226 per 1 g fresh weight of callus). Three generations of embryogenic tissue were obtained. The somatic embryos that developed from the embryogenic tissue were germinated and developed into plantlets. Germination of somatic embryos was performed on the MSG medium without the use of growth hormones and the germination rate for *L. decidua* was 48.9% for parent line, 70% for the second generation somatic embryos and 73% for *L. ×leptoeuropaea* Dengler. The embryogenic tissue initiation as well as somatic embryos maturation depended on the genotype of the explant. After 2 months, the plantlets with roots and primary needles were transferred onto the mixture of peat and sand or vermiculite (v:v, 1:1) and placed in the greenhouse and then in the nursery in Sękocin. After fall acclimation, somatic seedlings had similar growth and development over 3 growing seasons as zygotic seedlings. These results suggest the possibility for future use of this method as a good way for plant material production.

(transl. K. M.)

LITERATURA

- Becwar M. R. 1993: Conifer somatic embryogenesis. [W]: Clonal Forestry I. Genetics and Biotechnology (eds. M. R. Ahuja, W. J. Libby) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 200-223.
- 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., 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.
- Bornman C. H., Jansson E. 1981: Regeneration of plants from conifer leaf, with special reference to *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. Colloque International sur la Culture In Vitro des Essences Forestieres. Fontaineblau, AFOCEL. Nangis. 41-53.
- Cheliak W. M., Klimaszewska K. K. 1991: Genetic variation in somatic embryogenic response in open pollinated families of black spruce. *Theor. Appl. Genet.*, 82: 185-190.
- Cornu D., Geoffrion C. 1990: Aspects de l'embryogénèse somatique chez le mélèze. *Bull. Soc. Bot. Fr. Actual. Bot.*, 137: 25-34.
- Eastman P. A. K., Webster F. B., Pitel J. A., Roberts D. R. 1991: Evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) using culture morphology and isozyme analysis. *Plant Cell Rep.*, 10: 425-430.
- 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.
- Fourre J. L., Berger P., Niquet L., Andre P. 1997: Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce. Morphogenetic and molecular approaches. *Theor. Appl. Genet.*, 94: 159-169.
- 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., Durzan D. J. 1987: Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. *Bio/Technology*. 5: 147-151.
- Gutmann M., von Aderkas P., Label P., Lelu M. A. 1996: Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. *J. Exp. Bot.*, 47. 305: 1905-1917.
- Harvengt L., Trontin J. F., Reymond I., Canlet., Paques M. 2001: Molecular evidence of true-to-type propagation of 3-year old Norway spruce through somatic embryogenesis. *Planta*, 213. 5: 828-832.

- Hristoforoglu K., Schmidt J., Bolhar-Nordenkampf H. 1995: Development and germination of *Abies alba* somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 40: 277-284.
- Kim Y. W., Youn Y., Noh E. R. 1999: Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 55: 2.95-101.
- Klimaszewska K. 1989a: Recovery of somatic embryos and plantlets from protoplast cultures of *Larix×eurolepis*. *Plant Cell Rep.*, 8: 440-444.
- Klimaszewska K. 1989b: Plantlet development from immature zygotic embryos of hybrid larch through somatic embryogenesis. *Plant Sci. Limerick*. 63. 1: 95-103.
- Klimaszewska K., Devantier Y., Lachance D., Lelu M. A., Charest P. J. 1997: *Larix laricina* (tamarack): somatic embryogenesis and genetic transformation. *Can. J. For. Res.* 27: 538-550.
- Label P., Lelu M. A. 1994: Influence of exogenous abscisic acid on germination and plantlet conversion frequencies of hybrid larch somatic embryos (*Larix×leptoeuropaea*). *Plant Growth Regul.*, 15: 175-182.
- Label P., Lelu M. A. 2000: Exogenous abscisic acid fate during maturation of hybrid larch (*Larix×leptoeuropaea*) somatic embryos. *Physiol. Plant.*, 109: 456-462.
- Larkin P. J., Swocroft W. R. 1981: Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 60: 197-214.
- Lelu M. A., Klimaszewska K., Jones C., Ward C., von Aderkas P., Charest P. J. 1993: Embryogénèse somatique de l'épinette et du mélèze – guide des techniques de laboratoire. Rapport d'information PI-X-111F. Institut Forestier National de Petawawa. Chalk River (Ontario), Kanada.
- Lelu M. A., Label P. 1994: Changes in the levels of abscisic acid and its glucose ester conjugate during maturation of hybrid larch (*Larix×leptoeuropaea*) somatic embryos, in relation to germination and plantlet recovery. *Physiol. Plant.*, 92: 53-60.
- Lelu M. A., Klimaszewska K., Charest P. J. 1994a: 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., Ward C., Bastien C., Klimaszewska K., Charest P. J. 1994b: An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix×leptoeuropaea*): Part I. Somatic embryo maturation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 36: 107-115.
- Lelu M. A., Bastien K., Millet N., Charest P. J. 1994c: An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix×leptoeuropaea*): Part II. Control of germination and plantlet development. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 36: 117-127.
- Misra S. 1994: Conifer zygotic embryogenesis, somatic embryogenesis, and seed germination: Biochemical and molecular advances. *Seed Sci. Res.*, 4: 357-384.
- Murashige T., Skoog F. 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Nagmani R., Bonga J. M. 1985: Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. *Can. J. Rres.*, 15: 1088-1091.
- 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 forest breeding. *Theor. Appl. Genet.*, 86: 427-436.
- Park Y. S., Pond S. E., Bonga J. M. 1994: Initiation of 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. Plant.*, 34: 231-239.
- Roberts D. R., Flinn B. S., Webb D. T., Webster F., Sutton B. C. S. 1990: Abscisic acid and indole-3-butiric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce. *Physiol. Plant.*, 78: 335-360.
- Sułkowska M., Szczygieł K. 1995: Somaclonal variation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) Polish provenances. *Biol. Bull. (Suppl.)*. Poznań. 32: 23.

- Szczygiel K., Sułkowska M. 1996: Using izozyme analysis for estimation somaclonal variation during somatic embryogenesis of some Polish provenances of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). Materiały z konferencji 10th FESPP. From molecular to the plant: an integrated approach. Florencja. Plant Physiol. Biochem. (Special issue): 41.
- Thompson R. G., von Aderkas P. 1992: Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of western larch. Plant Cell Rep., 11. 8: 379-385.
- 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. 1992: Embryogenesis from protoplasts of haploid European larch. Can. J. For. Res., 22. 3: 397-402.
- Von Aderkas P., Bonga M. J., Nagmani R. 1987: Promotion of embryogenesis in cultured megagametophytes of *L. decidua*. Can. J. For. Res., 17: 1293-1296.
- Von Aderkas P., Bonga M. J. 1988: Formation of haploid embryoids of *Larix decidua*: early embryogenesis. Am. J. Bot., 75: 690-700.
- Von Aderkas P., Klimaszewska K., Bonga J. M. 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. Plant Physiol. Biochem. Edision scientifiques et medicales. Elsevier SAS, 39: 495-502.
- Von Arnold S., Hakman I. 1988: Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA). J. Plant Physiol., 132: 164-169.