KOSMOS
PROBLEMY NAUK BIOLOGICZNYCH

Tom 64 2015
Numer 2 (307)
Strony 305–317

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

KATARZYNA NAWROT-CHORABIK

Zakład Fitopatologii Leśnej, Mykologii i Fizjologii Drzew
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Al. 29-Listopada 46, 31-425 Kraków
E-mail: rlnawrot@cyf-kr.edu.pl

ZASTOSOWANIE TKANKI KALUSA W BIOTECHNOLOGII DRZEW LEŚNYCH: BADANIA *IN VITRO*

WPROWADZENIE

W wielu laboratoriach na całym świecie rozwinięto nowe kierunki badań użytecznych dla leśnictwa. Wprowadzanie nowych metod biotechnologicznych, wśród których można wyróżnić somatyczną embriogenezę, jest jedną z przyczyn postępu nauk leśnych. Metoda ta daje potencjalnie wysoką wydajność mikrorozmnażania (otrzymywanie w krótkim okresie wartościowego i wyselekcjonowanego materiału sadzeniowego) (VALLEDOR i współaut. 2007), jak również zapewnia inne możliwości dzięki udziałowi kalusa. Tkanka kalusa umożliwia bowiem prowadzenie badań patogeniczności na poziomie embrionalnym (HENDRY i współaut. 1993, NAWROT-CHORABIK i współaut. 2011, NAWROT-CHORABIK 2014) oraz uzyskiwanie metabolitów wtórnych (MULABAGAL i TSAY 2004). Krioprezerwacja kalusa (MISSON i współaut. 2006, HARGREAVES i MENZIES 2007, NAWROT-CHORABIK i SITKO 2014) i uzyskiwanie roślin transformowanych (WALTERS i współaut. 2005) stało się dochodowe. Stąd istnieje duże zainteresowanie metodą somatycznej embriogenezy i pośrednio otrzymanym dzięki niej kalusem.

Kalus jako tkankę przyranną w warunkach naturalnych można uzyskać u gatunków drzewiastych *in vitro* na izolowanych fragmentach roślin, tzw. eksplantatach. Wyhodowany kalus ma postać bezkształtnej masy. Zbudowany jest z dobrze uwodnionych komórek, a w zależności od rodzaju i potencjału regeneracyjnego (embriogenny i nieembriogenny) oraz gatunku rośliny, przybiera różną barwę i strukturę (luźną lub zwartą). W metodzie somatycznej embriogenezy zainicjowane komórki kalusa mają zdolność totipotencji, czyli nieograniczonej predyspozycji komórek do dzielenia się, z możliwością odtworzenia całego organizmu.

Intensywne badania naukowe nad udoskonalaniem i potencjalnymi możliwościami metody somatycznej embriogenezy ważnych gospodarczo gatunków drzew dotyczą: *Abies* (SALAJ i SALAJ 2003/4; NAWROT-CHORABIK 2008, 2009), *Picea* (MIHALJEVIĆ i JELASKA 2005, KLIMASZEWSKA i współaut. 2010), *Pinus* (KLIMASZEWSKA i współaut. 2001, LELU-WALTER i współaut. 2008), *Taxus* (NHUT i współaut. 2007), *Acer* (ĎURKOVIČ i MIŠALOVÁ 2008), *Castanea* (CORREDOIRA i współaut. 2003), *Quercus* (TORIBO i współaut. 2005), *Salix* (NAUJOKS 2007) i *Ulmus* (MALÁ i współaut. 2007, ĎURKOVIČ i MIŠALOVÁ 2008). Mikrorozmnażając większość wymienionych gatunków uzyskano kalus drzew o preferowanych cechach siewek somatycznych na nim zaindukowanych. Stworzyło to duże możliwości nie tylko mikrorozmnażania dla celów komercyjnych, np. produkcja stroiszu i choinek bożonarodzeniowych dzięki zakładaniu powierzchni plantacyjnych jodły kaukaskiej (MISSON i współaut. 2006), ale również opracowano procedury i metody, które po odtworzeniu mogą przyczynić się do otrzymania kalusa pożądanych gatunków drzew. Kalus i kultury komórkowe otrzymane metodą somatycznej embriogenezy stanowią materiał wyjściowy dla rozwoju wielu gałęzi

przemysłu, np. uzyskiwanie taxolu z *Taxus* sp. dla farmacji (CUSIDÓ i współaut. 1999, DAS i współaut. 2008). W medycynie i kosmetologii kalus znalazł również zastosowanie, gdyż z *Juglans regia* uzyskano juglon, jeden z najsilniejszych w przyrodzie związków antyseptycznych (BOŁONKOWSKA i współaut. 2011), oraz z *Aesculus hippocastanum* saponinę, tj. źródło substratów do syntezy leków steroidowych oraz hormonów (SPARG i współaut. 2004).

W kalusie hodowanym przez wiele lat zmienia się stabilność genetyczna, która w mikrorozmnażaniu na skalę gospodarczą jest niekorzystna ze względu na prawdopodobieństwo zmian cech morfologicznych w wyhodowanych *in vitro* roślinach. Dlatego przy wprowadzaniu na plantacje materiału sadzeniowego pochodzącego z hodowli *in vitro* wymagane są długoterminowe obserwacje wzrostu i rozwoju dużej liczby siewek somatycznych, reprezentujących znaczną liczbę genotypów, u których brak jest zmienności somaklonalnej (NAWROT-CHORABIK 2009). Zmienność taka polega na zachodzących zmianach genotypowych i fenotypowych w potomnym materiale roślinnym, co w przypadku mikrorozmnażania drzew zaburza niezmienność gatunku. W badaniach nad metabolitami wtórnymi otrzymanymi z kalusa nie jest to element decydujący, ponieważ głównym ich celem jest otrzymanie dużej ilości czystego związku organicznego. Chcąc uzyskać metabolity wtórne z kalusa lub prowadzić innego typu badania biotechnologiczne należy skoncentrować się na optymalizacji składu pożywek dla danego gatunku oraz pasażować kalus dla szybkiej jego proliferacji. W obu przypadkach powinny być jednak spełnione podstawowe założenia hodowli *in vitro* (zewnętrzne warunki hodowli, prawidłowa dezynfekcja materiału roślinnego i inne), aby w efekcie finalnym wartościowe gatunki drzew mogły być produkowane w celach komercyjnych w laboratoriach kultur tkankowych.

Dotychczas badania w kulturach tkankowych prowadzone są m.in. w Stanach Zjednoczonych Ameryki (Plant Tissue Cultures Lab, West Lafayette) oraz Kanadzie, gdzie PARK (2001) włączył do programu hodowli i selekcji drzew leśnych somatyczne siewki świerka białego (*Picea glauca*), gatunku najbardziej rozpowszechnionego w tym kraju. Eksperyment prowadzone są także w Wielkiej Brytanii (Date Palm Developments), w Izraelu (Ginosa Tissue Culture Nurseries Ltd.), we Włoszech (Department of Plant Production Di.Pro.Ve.) oraz we Francji, gdzie materiał sadzeniowy *Pinus pinaster* wykorzystano do zakładania upraw leśnych (CYR i KLIMASZEWSKA 2002). Należy zaznaczyć, że produkcja siewek somatycznych jest bardzo opłacalna. W Polsce badania nad mikrorozmnażaniem drzew metodą somatycznej embriogenezy prowadzone są głównie w Instytucie Badawczym Leśnictwa w Warszawie nad modrzewiem europejskim (*Larix decidua*) (SZCZYGIEŁ 2005) oraz zróżnicowaniem genetycznym czereśni ptasiej (*Prunus avium*) i jarzębu brekinii (*Sorbus torminalis*), z możliwością ich plantacyjnej uprawy w celu uzyskania wysokowartościowego surowca drzewnego (SZCZYGIEŁ i WOJDA 2008). W Instytucie Dendrologii PAN w Kórniku, m.in. w Pracowni Biologii Rozmnażania i Genetyki Populacyjnej, prowadzone są badania nad somatyczną embriogenezą wybranych gatunków drzew iglastych i liściastych (np. z rodzajów *Picea* i *Fagus*) (HAZUBSKA-PRZYBYŁ i współaut. 2013a), a także krioprezerwacją uzyskanej tkanki kalusowej i zarodków somatycznych (HAZUBSKA-PRZYBYŁ i współaut. 2010, 2012, 2013b). W Zakładzie Fitopatologii Leśnej, Mykologii i Fizjologii Drzew Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie również trwają prace nad uzyskiwaniem kalusa embriogennego i nieembriogennego. Metoda somatycznej embriogenezy okazała się odpowiednia dla prowadzenia mikrorozmnażania i dalszych eksperymentów biotechnologicznych z włączeniem krioprezerwacji kalusa i zarodków somatycznych (NAWROT-CHORABIK i SITKO 2014). U gatunków z rodzaju *Abies*: *A. alba* (NAWROT-CHORABIK 2008), *A. grandis* (NAWROT-CHORABIK 2007), *A. nordmanniana* (NAWROT-CHORABIK 2015a) oraz na *Pinus sylvestris* i *P. nigra* (NAWROT-CHORABIK 2015b) i *Picea abies* (dane niepubl.) uzyskano kalus, który wykorzystano m.in. do badań kultur dwuorganizmowych *in vitro* (hodowle dualne: kalus-grzyb) (NAWROT-CHORABIK 2014) oraz badań odporności na stres powodowany przez metale ciężkie.

Celem niniejszej pracy jest przestawienie danych na temat możliwości wykorzystania kalusa namnożonego metodą somatycznej embriogenezy drzew. Omówiona zostanie metoda embriogenezy, podczas której powstaje ta tkanka przyranna, oraz etapy somatycznej embriogenezy u drzew z uwzględnieniem stosowanych pożywek i sposobów dezynfekcji materiału roślinnego i rola jaką spełnia kalus pośrednio uzyskany tą metodą (pośrednia embriogeneza somatyczna).

Wszystkie te aspekty pomogą wskazać przyszłe kierunki badań w kulturach *in vi-*

tro oraz zwrócić uwagę na znaczenie kalusa i jego wkładu w rozwój biotechnologii drzew leśnych. Omówiona metoda uzyskiwania kalusa na drodze somatycznej embriogenezy, jako alternatywny sposób wegetatywnego rozmnażania drzew (SZCZYGIEŁ 2005), pokazuje konieczność i perspektywę jej stosowania dla zachowania zagrożonych gatunków drzew ważnych gospodarczo i ekologicznie, co znajduje przełożenie na podwyższenie produktywności leśnej.

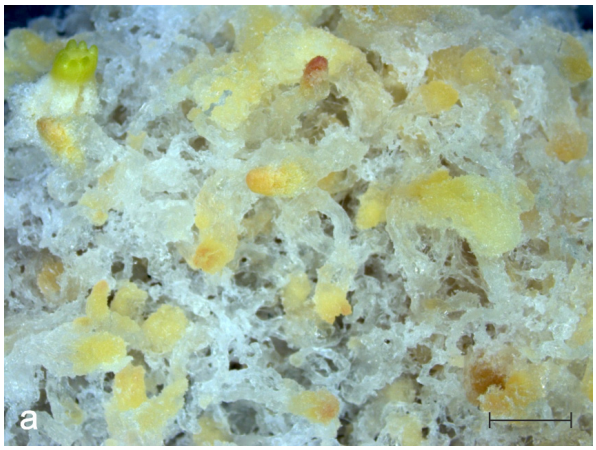
METODA SOMATYCZNEJ EMBRIOGENEZY DO UZYSKANIA TKANKI KALUSA DRZEW LEŚNYCH

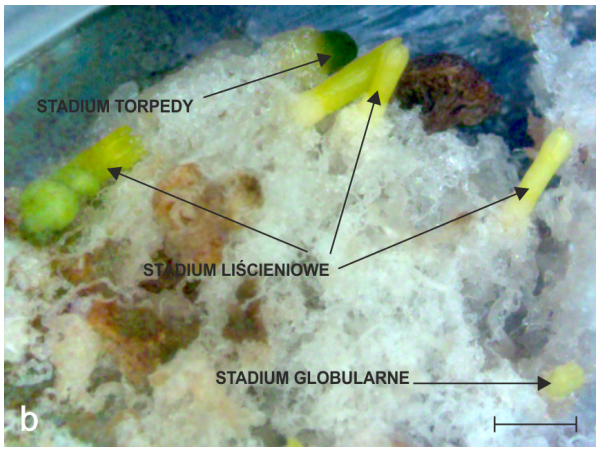
DEZYNFEKCJA MATERIAŁU ROŚLINNEGO DRZEW

Optymalizacja metody dezynfekcji eksplantatów w przypadku drzew leśnych jest trudna ze względu na duże zasiedlenie większości roślin przez bakterie i grzyby, m.in. endofityczne (KOWALSKI i KEHR 1992, NAWROT-CHORABIK i JANKOWIAK 1999). Procedurę dezynfekcji należy przygotować dla konkretnego gatunku drzewa, a nawet rodzaju eksplantatu pierwotnego (zarodków zygotycznych izolowanych z nasion, megagametofitów, fragmentów liści, pąków i innych), dla którego środek chemiczny będzie odpowiednio dostosowany w zwalczaniu drobnoustrojów. Prowadząc dezynfekcje eksplantatów drzew leśnych należy postępować wieloetapowo. Dezynfekcja eksplantatów niektórych gatunków drzew, jak np. z rodziny *Fagaceae* (buk, dąb), jest bardzo uciążliwa (KRAJ i współaut. 1999) m.in. ze względu na duże, twarde nasiona i inne fragmenty pokryte w znacznym stopniu drobnoustrojami. Ponadto, podczas prowadzenia dezynfekcji w środku odkażającym, wskazane jest równomierne wytrząsanie w nim nasion celem lepszej penetracji substancji czynnej. Do roztworów dezynfekujących warto dodawać substancje zmniejszające napięcie powierzchniowe i ułatwiające penetrację powierzchni materiału roślinnego, np. Tween 80. W szczególnych przypadkach materiał roślinny dodatkowo dezynfekuje się roztworami fungicydów lub antybiotyków. Dodawanie tego typu związków może jednak powodować obniżenie współczynnika inicjacji kalusa, gdyż substancje te zmniejszają aktywność podziałową komórek. Skuteczną metodę dezynfekcji nasion drzew leśnych zawarto w publikacji NAWROT-CHORABIK (2014).

SKŁAD POŻYWEK

Istotnym elementem dla uzyskania oczekiwanych efektów hodowli *in vitro* kalusa drzew jest wybór pożywki wzbogaconej w regulatory wzrostu, których rodzaj i stężenia ustala się dla danego gatunku. Każdy etap metody somatycznej embriogenezy wymaga modyfikacji pożywki podstawowej, wyrażającej się głównie zmianami w stężeniach hormonów roślinnych. Pożywki stosowane dla gatunków drzewiastych są bogate w makro- i mikroelementy, witaminy, źródło węgla oraz regulatory wzrostu, a niekiedy źródło aminokwasów (enzymatyczny hydrolizat kazeiny). Gatunki drzew nagozalążkowych preferują stałą konsystencję pożywki, a w bioreaktorach do produkcji masowej, płynną. Odczyn pożywki powinien oscylować w zakresie pH od 5,7 do 5,8. Makroelementy (N, K, P, Ca, Mg, S) i mikroelementy (Fe, Cu, Zn, Mn, B, Mo, I, Al) dodawane są w postaci soli nieorganicznych (STEFANIAK 2004). Niezbędne do proliferacji kalusa drzew są także witaminy: tiamina (witamina B_1), kwas nikotynowy (witamina B_3), pirydoksyna (witamina B_6), kwas foliowy (witamina B_9), myo-inozytol (odmiana izomeryczna witaminy B_8, prekursor witamin) i biotyna (witamina H). Źródłem węgla w pożywce są dwucukry, głównie sacharoza. Węglowodany są także stabilizatorami równowagi osmotycznej podłoża, przez co wpływają na pobieranie substancji warunkujących rozwój komórek embriogennych. Jako substancje zestalające pożywki stałe dla drzew leśnych najczęściej stosuje się Phytagel, Agargel, rzadziej już agar (naturalny ekstrakt z krasnorostów). Stężenie tych substancji w pożywce jest ważne ze względu na prawidłowość rozwoju kalusa. Zbyt duże stężenie utrudnia dyfuzję, a co za tym idzie, zmniejsza dostępność substancji odżywczych dla komórek, natomiast zbyt niskie stężenie sprzyja występowaniu „szklistości" eksplantatów, tzn. kalus jest zbyt uwodniony, cechują go anomalia anatomiczne i fizjologiczne (STEFANIAK 2004). Szczególne znaczenie w pierwszych etapach embriogenezy ma proporcja współdziałających ze sobą auksyn i cytokinin. Obecność auksyn: 2,4–D (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy), IBA (kwas indolilo-3-masłowy), picloram (kwas 4-amino-3,5,6-trichloropikolinowy) jest niezbędna do indukcji so-





Ryc. 1. Proces somatycznej embriogenezy z uwzględnieniem rozwoju kolejnych faz somatycznych embrionów.

Kalus embriogenny jodły kaukaskiej (*A. nordmaniana*) z zarodkami somatycznymi w stadium globularnym (a); torpedy (b); liścieniowym (c). Bar = 1 mm, 2 mm (a, b, c).

matycznej embriogenezy oraz ukorzeniania zarodków somatycznych w stadium liścieniowym. Rola auksyn polega na stymulacji różnicowania komórek eksplantatów pierwotnych, co prowadzi do wyzwolenia w komórkach potencjału embriogennego. Komórki takie szybko dzielą się i tworzą skupiska komórek zarodkowych. Cytokininy: BA (benzyloaminopuryna), KIN (kinetyna), TDZ (thidiazuron), sprzyjają proliferacji kalusa i powstawaniu zarodków somatycznych w stadium globularnym. Cytokininy stymulują biosyntezę kwasów nukleinowych, białek strukturalnych i enzymatycznych, hamują aktywność rybonukleaz i proteaz dynamizują podziały komórkowe (STEFANIAK 2004). W dalszych etapach somatycznej embriogenezy stosowany jest inhibitor — kwas abscysynowy (ABA) (NAWROT-CHORABIK 2008), który powoduje dojrzewanie somatycznych zarodków poprzez stadia: globularne, sercowate, torpedy i liścieniowe (Ryc. 1), a w końcowym etapie ich rozwój w siewki. Kwas abscysynowy zwiększa ponadto odporność komórek na warunki stresowe.

EKSPLANTATY PIERWOTNE I INICJACJA KALUSA

Eksplantat pierwotny jest to wyjściowy materiał roślinny wyłożony na pożywkę, czyli fragment rośliny inicjujący kulturę *in vitro* (pozostałe fragmenty roślinne nazywamy eksplantatami wtórnymi) (ZENKTELER 1984, SZCZYGIEŁ 2005). W metodzie somatycznej embriogenezy stosuje się kilka typów eksplantatów pierwotnych: (i) dojrzałe zarodki zygotyczne izolowane z dojrzałych nasion drzew, (ii) megegametofity, czyli niedojrzałe nasiona pobrane z niedojrzałych szyszek z zarodkiem i bielmem, (iii) pąki, (iv) igły lub liście, (v) korzenie drzew oraz (vi) protoplasty komórkowe (Tabela 1). Przy wyborze eksplantatu pierwotnego należy wziąć pod uwagę wiek tkanek i organów rośliny macierzystej. Najkorzystniej jest pobierać młode organy, które mają większy potencjał rozwojowy. Największą skuteczność embriogenezy uzyskuje się z nieprzechowywanych megagametofitów i z nasion „świeżych" (czas przechowywania nasion głównie drzew iglastych należy ograniczyć do jednego roku). Ważna jest również lokalizacja w roślinie i orientacja eksplantatu pierwotnego na pożywce oraz sposób jego zagłębienia. Przykładem mogą być zarodki zygotyczne, które powinny być usytuowane na pożywce zestalonej w pozycji horyzontalnej, istnieje bowiem zróżnicowanie rozwoju eksplantatu na pożywce, co wynika z naturalnej biegunowo-

Tabela 1. Rodzaj eksplantatu pierwotnego, środek dezynfekujący oraz rodzaj pożywki dla inicjacji kalusa *in vitro* metodą somatycznej embriogenezy gatunków drzew nagozalążkowych na podstawie danych literaturowych.

Nazwa rodzajowa	Eksplantat pierwotny	Środek dezynfekujący/ czas dezynfekcji	Pożywka do inicjacji
Abies	zarodki izolowane z dojrzałych nasion, megagametofity	podchloryn sodu NaOCl 5–10% (5-30 min.)	SH[1], MCM[2],
Larix	megagametofity, zarodki izolowane z dojrzałych nasion	nadtlenek wodoru H_2O_2 36% (15 min.)	MSG[3]
Picea	zarodki izolowane z dojrzałych nasion, liścienie, pąki liściowe, protoplasty	podchloryn sodu 10% (15 min.) podchloryn wapnia 7% (20 min.)	MS[4], BM-3[5]
Pinus	zarodki izolowane z dojrzałych nasion,	nadtlenek wodoru 7–12% (5–15 min.)	DCR[6], LV[7], BM-3[5]
Taxus	zarodki izolowane z dojrzałych nasion	podchloryn sodu NaOCl 5–10% (5–30 min.), podchloryn wapnia $Ca(OCl)_2$ 5–10% (5–30 min.)	MS, WPM[8]

[1]Schenk i Hildebrit (1972), [2]Bornman i Jansson (1981), [3]Becwar i współaut. (1990), [4]Murashige i Skoog (1972), [5]Gupta i Durzan (1986), [6]Gupta i Durzan (1985), [7]Litvay i współaut. (1985), [8]Lloyd i McCown (1981)

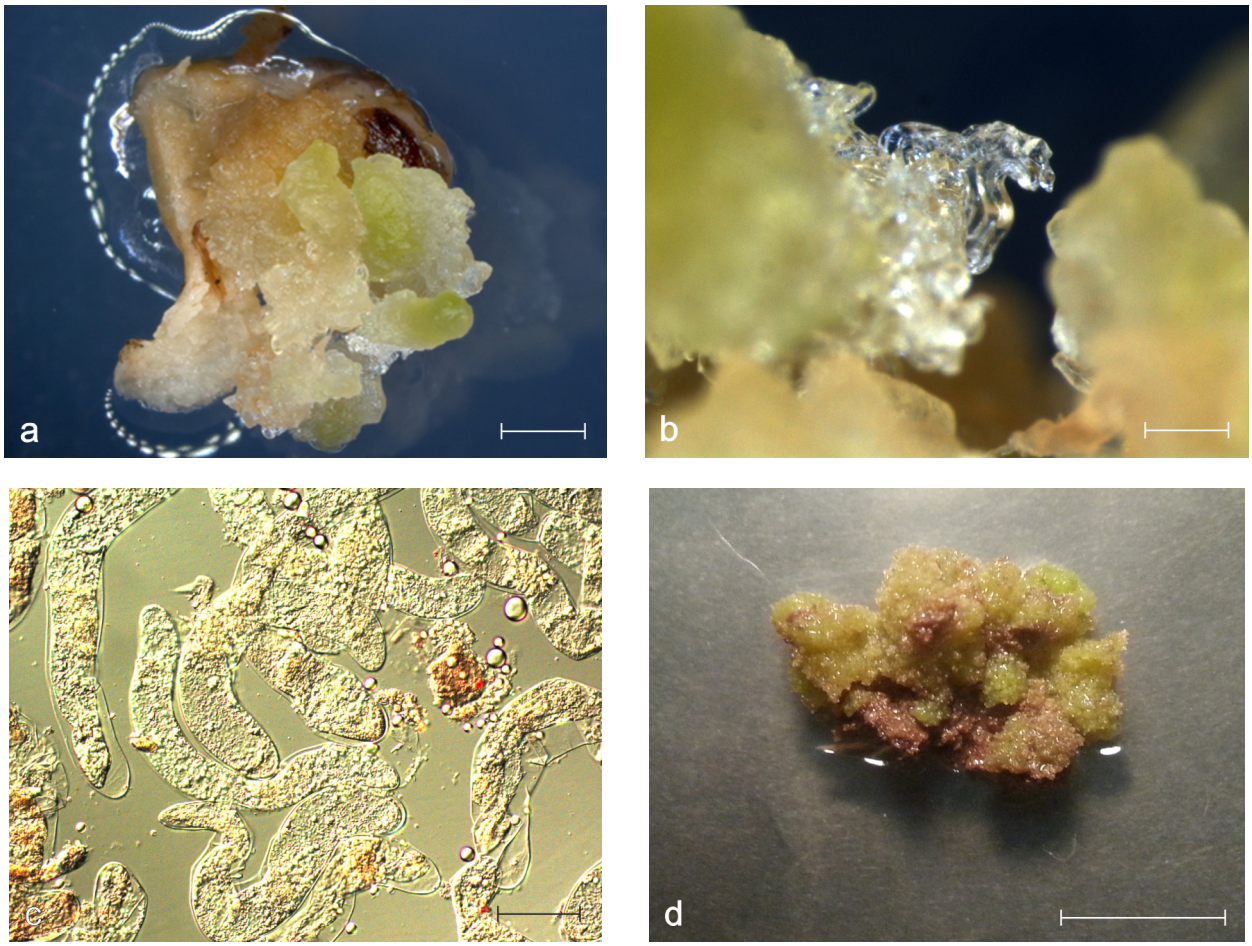
ści fragmentów roślinnych. Innym, ważnym czynnikiem jest termin pobrania eksplantatów. W naszej strefie klimatu umiarkowanego pąki należy pobrać wczesną wiosną, megagametofity na przełomie czerwca i lipca (w zależności o warunków pogodowych w danym roku nasiennym) z zamkniętych szyszek, natomiast dojrzałe zarodki zygotyczne izoluje się z nieprzechowywanych nasion. W ten sposób uzyskuje się stosunkowo wysoką wydajność kalusa embriogennego (np. u *Abies alba* 6,0 %), który w dalszym ciągu hodowli *in vitro* jest zdolny do namnażania w szybkim czasie i w dużej ilości (Nawrot-Chorabik 2008). U *Pinus sylvestris* nasiona powinny być wyłuszczone z zamkniętych szyszek, krótko przechowywanych (2–3 dni) w temp ok. 24°C (Nawrot-Chorabik 2015). Związane jest to z okresem maksymalnego natężenia większości przemian metabolicznych i aktywności enzymatycznej komórek obserwowanym wiosną. Co ciekawe, zdolność formowania kalusa przez eksplantaty *Populus alba* utrzymuje się na wysokim poziomie od wiosny do jesieni, maleje jedynie zimą (Stefaniak 2004).

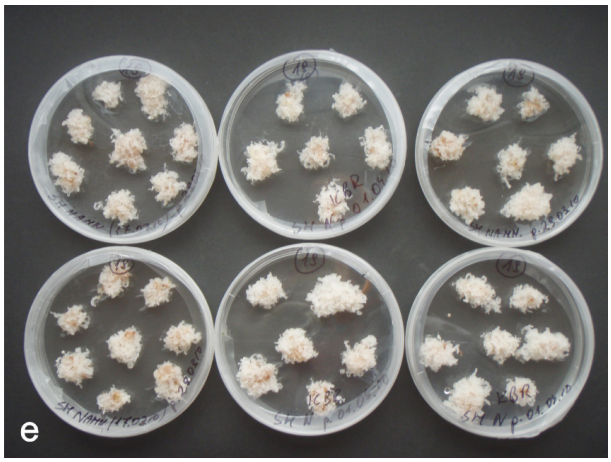
FENOTYPOWE CECHY KALUSA DRZEW LEŚNYCH

Kalus drzew leśnych po zainicjowaniu na eksplantacie jest niejednorodny, tzn. do około 3 tygodnia hodowli *in vitro* pewne jego sektory różnią się cechami morfologicznymi (barwą: biała, jasno-kremowa, zielona; konsystencją: fragmenty gęste i rzadsze; strukturą) (Ryc. 2a). Po pierwszym pasażu tkanka kalusa staje się jednolita. Kalus embriogenny jest przeźroczysty, biały lub kremowy, o konsystencji kleistej, miękkiej, wilgotnej, strukturze luźnej, kłaczkowatej (Ryc. 2a–c, e). Kalus nieembriogenny jest barwy od żółtej do zielonej, konsystencji twardej, suchej, strukturze upakowanej, zwartej i powierzchni nierównej, wręcz grudkowatej (Ryc. 2d).

ETAPY METODY SOMATYCZNEJ EMBRIOGENEZY I WARUNKI HODOWLI IN VITRO Z UDZIAŁEM TKANKI KALUSA

Metoda somatycznej embriogenezy jest procesem pięcioetapowym. Tkanka kalusa embriogennego drzew ma swój udział w trzech pierwszych etapach. Tkanka kalusa nieembriogennego po inicjacji podlega pro-





Ryc. 2. Zainicjowany kalus embriogenny na zarodku zygotycznym sosny zwyczajnej (*P. sylvestris*)

(a); charakterystyczny, uwodniony kalus embriogenny drzew nagozalążkowych na przykładzie sosny zwyczajnej (b); wydłużone komórki embriogenne jodły pospolitej (*A. alba*) (c); kalus sosny zwyczajnej (*P. sylvestris*) z widocznymi brązowymi fragmentami będącymi wynikiem wytworzonych polifenoli (d); proliferowane klony jodły kaukaskiej (*A. nordmaniana*), genotyp nr 19 (e). Bar = 1 mm, 2 mm (a, b), 1 µm (c), 10 mm (d).

liferacji i nie ulega przekształceniom organogenetycznym.

1. Inicjacja kalusa jest to proces wyzwolenia zdolności embriogenetycznej pojedynczej komórki lub grupy komórek. Na eksplantacie pierwotnym powstaje kalus embriogenny mający u drzew postać kłaczkowatej, dobrze uwodnionej masy. Pierwsze powstające komórki embriogenne nazywamy PEM (ang. proembryogenic masses). Kalus embriogenny narasta na pożywce ok. 2–3 tygodnie od inicjacji, a następnie powstaje ECM (ang. embryogenic cell masses), nazwana też ESM (ang. embryogenic suspensor mass) (Ryc. 1c). Tworzy bezkształtną masę szybko dzielących się komórek zróżnicowanych po względem wielkości i kształtu (od komórek izometrycznych po luźno związane, duże komórki). Kalus zainicjowany na danym eksplantacie nazywany jest linią, która stanowi genotyp o pojedynczym garniturze chromosomów. W tej fazie należy określić, czy ka-

lus jest embriogenny. W tym celu barwi się go acetokarminem, a prazarodki obserwuje pod mikroskopem (GUPTA i DURZAN 1987). W kalusie gatunków drzew nagozalążkowych widoczne są strefy mas embriogennych, czyli małe komórki, których jądra wybarwiają się na czerwono oraz długie, bezbarwne komórki suspensora, o małych jądrach i dużych wakuolach (Ryc. 1c). Etap tworzenia kalusa zachodzi w ciemności; wskazana jest podwyższona do ok. 75% wilgotność powietrza i temperatura 24–25°C.

2. Proliferacja kalusa niezbędna jest do uzyskania odpowiedniej ilości tkanki embriogennej. Namnażanie komórek zachodzi w wyniku pasaży kalusa (co 2-3 tygodnie) na świeże pożywki o składzie identycznym lub zmienionym w stosunku do składu pożywki inicjacyjnej. Zwiększenie stężenia cytokinin ma korzystny wpływ na kalogenezę, gdyż regulatory te stymulują podziały komórkowe. Dodawany do pożywki enzymatyczny hydrolizat kazeiny, szczególnie w przypadku gatunków drzew nagozalążkowych, korzystnie wpływa na proliferacje kalusa (NAWROT-CHORABIK 2008). Nie wszystkie linie kalusa są embriogenne i zdolne są do intensywnej proliferacji. Tylko pewne genotypy charakteryzują się wysoką wydajnością embriogenezy (Ryc. 1e). Pochodzenie materiału roślinnego, głównie nasion, ma zasadniczy wpływ na zdolności embriogenetyczne kalusa. W fazie tej formują się również pierwsze somatyczne zarodki w stadium globularnym (Ryc. 2a). W przypadku drzew okrytozalążkowych znaczenie w procesie indukcji zarodków na namnożonym kalusie ma również sam eksplantat, np. liść. Młodsze, najbardziej wewnętrzne tkanki liścia (stanowiące eksplantat pierwotny) produkują kalus z zarodkami somatycznymi w dużej ilości, natomiast zewnętrzne części liścia produkują go znacznie mniej. Zarodki mogą być indukowane bezpośrednio na zewnętrznym fragmencie liścia (TRIGIANO i GRAY 2011). Etap ten, podobnie jak poprzedni, zachodzi bez udziału światła.

3. Konwersja zarodków somatycznych uformowanych na kalusie embriogennym. Zjawisko konwersji określa się jako rozwój somatycznych embrionów w rośliny o identycznym genotypie jak eksplantat pierwotny, zdolnych do wzrostu i rozwoju *ex vitro*, wykształconych morfologicznie, tj. z korzeniem, pąkiem szczytowym i pierwszymi organami asymilacyjnymi (BECWAR i współaut. 1989). Rzadziej konwersję definiuje się jako przeżywalność zregenerowanych siewek po wysadzeniu i adaptacji do warunków *ex vitro*. Konwersja w przypadku metody somatycznej embriogenezy drzew leśnych odnosi się do kolejnych stadiów rozwoju somatycznych zarodków. Wyróżniamy stadium: globularne, sercowate, torpedy, wczesno-liścieniowe i liścieniowe (Ryc. 2). Prawidłowe dojrzewanie zarodków zawierających zgromadzone substancje zapasowe zapewnia powodzenie hodowli *in vitro*. Zarodki ostatniej fazy rozwojowej, tj. liścieniowe, muszą mieć podobną morfologię do zarodków zygotycznych. U roślin drzewiastych rozwój zarodka rozpoczyna się od małego skupiska komórek embriogennych nazwanych prioembriogennymi masami (PEM I), zbudowanych z komórek o gęstej cytoplazmie, sąsiadujących z pojedynczą, zwakuolizowaną komórką wykazującą tendencje do wydłużania. Z grupy komórek o gęstej cytoplazmie rozwijają się kolejne, wydłużone komórki, które tworzą PEM II. Następnie formują się duże agregaty komórek klasyfikowane jako PEM III (VON ARNOLD i CLAPHAM 2008). Zmniejszenie ilości auksyn i cytokinin niekiedy stymuluje różnicowanie somatycznych zarodków, ale niezbędne do uzyskania formy liścieniowej zarodka jest dodanie do pożywki kwasu abscysynowego. Pierwszą, widoczną reakcją zarodków somatycznych na kwas abscysynowy jest zmiana ich barwy (zarodki bezbarwne). Od tego momentu zarodek zaczyna się wydłużać i tworzyć liścienie. Podczas konwersji zarodków somatycznych ma miejsce ekspresja genów, których uruchomienie we właściwym czasie zapewnia prawidłową budowę i dalszy rozwój zarodka (GRUSZCZYŃSKA i RAKOCZY-TROJANOWSKA 2007). Indukcja oraz wzrost komórek somatycznych może być pobudzany przez dodanie odpowiednich hormonów, które oddziałują na białka wrażliwe na hormony. Na przykład kwas abscysynowy wykazuje działanie względem białka LEA (ang. late-embryogenesis abundant protein). Do genów kodujących białka wrażliwe na hormony należą m.in. *GH3, PIN, ARF, SAUR*. Do prawidłowego przebiegu somatycznej embriogenezy niezbędne są geny regulujące zarówno poszczególne etapy, jak również cały proces. Należą do nich transkrypcyjne czynniki związane z somatyczną embriogenezą, takie jak LEC, BBM, WUC, AGL15, które zapewniają właściwy rozwój zarodka somatycznego (YANG i ZHANG 2011). Konwersja zarodków wymaga udziału światła.

4. Ryzogeneza, czyli ukorzenianie zarodków somatycznych w stadium liścieniowym

zachodzi częściowo w ciemności. Zarodki z wykształconymi liścieniami widoczne są w tkance kalusa embriogennego, gdzie kiełkują i rozwijają się w siewki somatyczne. Takie zarodki przenosi się na pożywki do kiełkowania. Najczęściej są one ubogie w makro- i mikroelementy oraz cukier, często pozbawione regulatorów wzrostu. Do pożywek tych czasami wprowadza się auksynę [kwas 4-(3-indolilo) masłowy (IBA)] spełniającą funkcję ukorzeniacza. Zdolność do kiełkowania somatycznych embrionów otrzymanych metodą somatycznej embriogenezy jest stosunkowo niska i wynosi średnio ok. 15% (CORNU i GEOFFRION 1990, SALAJOVA i współaut. 1995).

5. Aklimatyzacja somatycznych siewek do warunków zewnętrznych prowadzona jest *ex vitro* w świetle. Jest ona trudna. Młode siewki drzew są wiotkie, gdyż wtórna tkanka merystematyczna, kambium, nie wytwarza jeszcze drewna. Niewielkie liście, skąpo pokryte kutikulą oraz słabo wykształcony system korzeniowy mogą doprowadzić do zamierania siewek. Aby uniknąć takiej sytuacji należy zapewnić siewkom stabilność, np. w doniczkach celulozowo-torfowych, oraz optymalne oświetlenie przypominające warunki naturalne. Zakres światła białego pokrywa się z zakresem światła fotosyntetycznie czynnego (ang. photosynthetically active radiation, PAR) o długości fal 400–700 nm. W takich warunkach zachodzi indukcja syntezy chlorofilu, rozwoju chloroplastów oraz formownie organów przybyszowych z komórek kalusa. Szczegółowe warunki zewnętrzne hodowli *in vitro* opisano w pracach WOŹNY i PRZYBYŁ (2004) i NAWROT-CHORABIK (2012).

WYKORZYSTANIE KALUSA W BIOTECHNOLOGII ROŚLIN

Biotechnologia roślin wykorzystuje różne metody m.in. dla poprawy jakości roślin, zwiększenia ich odporności na czynniki stresowe i otrzymania substancji wtórnych przydatnych człowiekowi. Pierwsze badania dotyczyły opracowaniem metod mikrorozmnażania roślin uprawnych. W latach 50. XX w. otrzymano pierwsze zarodki somatyczne marchwi (STEWARD 1958), a siedem lat później zarodki drzewa sandałowego (*Santalum album*) (RAO 1965). Po raz pierwszy kalus drzew iglastych uzyskano u *Picea abies* (HAKMAN i współaut. 1985, CHALUPA 1995), a zsekwencjonowanie DNA pierwszej rośliny uprawnej, ryżu, miało miejsce dopiero w 2002 r. (GOFF i współaut. 2002).

Kalus embriogenny i nieembriogenny, jako tkanka powstająca w pośredni sposób podczas somatycznej embriogenezy, pierwotnie był wykorzystany do badań nad metabolitami wtórnymi. Hodowle kalusa prowadzone są na pożywkach zestalonych lub płynnych, czyli tzw. kulturach zawiesinowych. Z zawiesinowych kultur *in vitro* gatunków drzewiastych łatwiej pozyskuje się metabolity wtórne, w porównaniu z pożywkami zestalonymi. Produkowane przez kalus metabolity wykorzystywane są w farmakologii do produkcji leków, jako naturalne barwniki i środki zapachowe, a nawet pestycydy (BOURGAUD i współaut. 2001). Od lat 90. kultury tkankowe drzew nabrały znaczenia, szczególnie w poznawaniu szlaku biosyntezy paclitaxelu (Taxol) u rodzaju *Taxus* (WANG i współaut. 2001). Elicytory, czyli różne organizmy lub związki [biotyczne (grzyby, mikroorganizmy) i abiotyczne (światło UV, zamrażanie, pewne związki chemiczne np. herbicydy)] biorą udział w regulacji procesów zachodzących w komórce w odpowiedzi na zagrożenia zewnętrzne. Odgrywają pewną rolę przy tworzeniu wtórnych metabolitów. Jak podaje CLINE i COSCIA (1988), niezależnie od fitohormonów zawartych w pożywce, homogenat grzyba *Dendryphion penicillatum* stymulował powstawanie alkaloidu sangwinaryny do wartości 460 μg/g świeżej masy kalusa maku, co w porównaniu z hodowlą kontrolną (40 μg/g) ponad 10-krotnie zintensyfikowało jego produkcję. Alkaloid ten ma zastosowanie w zapobieganiu i ochronie przed rakiem skóry. Innym przykładem jest zastosowanie preparatów grzybowych z *Aspergillum niger* i *Rhizopus oryzae*, które prócz tego, że powodowały 3-krotnie większą produkcję przeciwbólowego glikozyd plumbaginy w kulturze zawiesinowej rośliny kwitowej *Plumbago rosea*, to zwiększały o ok. 10% uwalnianie produktu do pożywki (KOMARAIAH i współaut. 2002). Drzewa z rodzaju *Betula*, *Salix*, *Populus* wytwarzają: monoterpeny i izoproteidy (u brzozy) oraz glikozydy fenolowe (u rodziny Salicaceae), które znalazły nie tylko zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym, ale również mają silne działanie odstraszające zwierzęta roślinożerne. Przed rozwinięciem liści poziom niektórych metabolitów znacząco wzrasta (do 7,9%), po

czym pod koniec lipca gwałtownie spada (do 0,3%) (PALO 1984). Znaczyłoby to, że rośliny ewolucyjnie wykształciły mechanizm obronny przed intruzem, jednak nie jest on do końca poznany. Metabolity wtórne wytwarzane są intensywnie przez grzyby. Zagadnienie to badali u grzybów endofitycznych SCHULZ i współaut. (2002). Grzyby te wytwarzają izoenzymy niezbędne do kolonizacji rośliny-gospodarza i dobrze rozwijają się w apoplaście jej komórek. Grzyby i rośliny żyjące w tzw. mutualizmie czerpią z niego obopólne korzyści, gdyż endofity kolonizujące korzenie np. modrzewia uzyskują substancje odżywcze, a drzewo dzięki grzybowi jest zabezpieczone przed owadami roślinożernymi. Jeśli jednak równowaga mutualizmu zostanie zaburzona, mogą pojawić się objawy chorobowe drzewa powodowane przez grzyby (SCHULZ i współaut. 2002). Ponadto grzyby endofityczne produkując metabolity wtórne pełnią rolę mykobiontów. W ten sposób syntetyzowane są fenole, izokumaryny, terpenoidy i inne (TKACZ 2000, TAN i ZOU 2001). Dotychczasowe wyniki badań wskazują na słuszność prowadzenia dalszych badań nad kontrolą syntezy metabolitów wtórnych zarówno w komórkach roślin, jak i grzybów. Zasadne wydaje się również prowadzenie analiz pod kątem obniżania kosztów ekstrakcji i oczyszczania metabolitów wtórnych. Uzyskane wyniki pozwolą na poszerzenie wiedzy w zakresie badań: fizjologiczno-biotechnologicznych (hodowla kalusa nieembriogennego przy użyciu metody somatycznej embriogenezy), fitopatologicznych (określenie stopnia wirulencji grzybów na podstawie tempa ich wzrostu i zmian fenotypu kalusa) oraz biochemicznych (analiza białek produkowanych przez kalus w warunkach stresowych, prowadzona metodą SDS-PAGE).

Kalus nieembriogenny jest niezbędny do założenia kultur dualnych *in vitro* z udziałem grzybów o różnych właściwościach troficznych (NAWROT-CHORABIK 2013, 2014). Nawrot-Chorabik i współpracownicy (dane niepubl.) badali, które grzyby wywołują w kalusie charakterystyczne reakcje obronne. Wyniki pokazały, że kalus nieembriogenny *Pinus sylvestris* poddany czynnikowi stresowemu (grzyb należący do silnych patogenów), w odpowiedzi wytworzył białka o niskiej masie cząsteczkowej, które prawdopodobnie należą do roślinnych białek odpornościowych typu PR (ang. pathogenesis related). Potwierdzenie tych sugestii wymaga dalszych badań.

Do założenia kultur dualnych wykorzystuje się klony kalusa, które wyprowadzono z poszczególnych genotypów (linii), a namnożono dzięki metodzie somatycznej embriogenezy (NAWROT-CHORABIK 2013). Daje to możliwość wyboru genotypów roślin, które są odporne na dany patogen i które w wyniku dalszych analiz biotechnologicznych będzie można mikrorozmnożyć. Według NAWROT-CHORABIK (2014) kultury dualne *in vitro* (kalus-grzyb) mogą posłużyć w przyszłości do przygotowania wiarygodnych testów do oceny patogeniczności i stopnia zagrożenia ze strony grzyba. Ta biotechnologiczna metoda może przyczynić się także do poznania szlaków metabolicznych substancji wtórnych wytwarzanych zarówno przez kalus, jaki i endofityczne grzyby.

Kalus embriogenny uzyskany metodą somatycznej embriogenezy można przechowywać w ciekłym azocie. Technika krioprezerwacji jest uznawana za najlepszą metodę długoterminowego przechowywania tkanek roślinnych hodowanych *in vitro.* Podczas przechowywania przez długi czas materiału roślinnego w niskiej temperaturze zatrzymaniu ulegają podziały komórkowe i procesy metaboliczne. Tak właśnie przechowywane są: kalus, zarodki somatyczne, pyłek, pąki i nasiona drzew. Stosunkowe niskie koszty metody krioprezerwacji oraz niewielka powierzchnia przechowywania pozwalają na stałe powiększanie banków genów i wzbogacanie ich o nowe, cenne genotypy zagrożonych gatunków drzew, ważnych gospodarczo oraz ekologicznie (NAWROT-CHORABIK i SITKO 2014). Warunkiem powodzenia krioprezerwacji jest podniesienie tolerancji tkanek na stres dehydratacji i stres wywołany rehydratacją po rozmrożeniu. Przeżycie komórek w procesie dehydratacji i mrożenia zapewnia stan niekrystaliczny, tj. witryfikacji. Podczas stresu dehydratacji najbardziej narażone na uszkodzenia są białkowo-lipidowe błony cytoplazmatyczne, gdyż wielonienasycone kwasy tłuszczowe fosfolipidów błonowych łatwo ulegają peroksydacji. Ponadto podczas mrożenia i rozmrażania materiału roślinnego może dojść do spontanicznych mutacji, mogą zajść zmiany biochemiczne oraz strukturalne na poziomie komórkowym. Dlatego proces krioprezerwacji powinien odbywać się według ściśle określonej procedury (NAWROT-CHORABIK i SITKO 2014), a materiał roślinny dokładnie przeanalizować zarówno przed, jak i po procesie mrożenia (NAWROT-CHORABIK 2009). BERJAK i PAMMENTER (2013) zazna-

czają, że przechowywanie kultur *in vitro* w ciekłym azocie, to jedyny sposób skutecznej ochrony materiału roślinnego podczas długoterminowego przetrzymywania, pozwalający na utrzymywanie niskiej zawartości wody w tkankach zarodków i osi zarodkowych w nasionach kategorii *orthodox*, czyli wytrzymałych na wysokie odwodnienie. Do kategorii tej należą nasiona drzew rodzaju *Populus* i *Salix*.

Kalus embriogenny i nieembriogenny może być również wykorzystywany w badaniach biotechnologicznych nad wpływem metali ciężkich na drzewa leśne. Analizy wpływu miedzi, ołowu i kadmu prowadziła Nawrot-Chorabik (dane niepubl.), potwierdzając wcześniejsze wyniki AGRAWAL i SHARMA (2006), mówiące iż ołów i kadm powodują silniejsze aniżeli pozostałe metale zaburzenia w metabolizmie komórkowym. Pamiętać należy, że zbyt wysokie stężenie ołowiu powoduje nie tylko choroby roślin, ale przede wszystkim niszczy środowisko przyrodnicze.

Wprawdzie kalus drzew zaindukowany *in vitro* metodą somatycznej embriogenezy jest poddawany intensywnym badaniom, jednak wiele zagadnień nadal pozostaje nierozwiązanych. Szczególnie ważne jest opracowanie takiej metody embriogenezy, aby uzyskany *in vitro* kalus był jak najlepszej jakości. Badania biochemiczne powinny obejmować analizę białek wytwarzanych przez kalus, które kodowane są przez geny odpowiedzialne za poszczególne procesy biochemiczne i fizjologiczne. Będzie to niewątpliwie pomocne dla rozwoju selekcji, hodowli, fizjologii i biologii molekularnej drzew leśnych oraz użyteczne dla różnych gałęzi gospodarki.

ZASTOSOWANIE TKANKI KALUSA W BIOTECHNOLOGII DRZEW LEŚNYCH: BADANIA *IN VITRO*

Streszczenie

Kalus występujący w warunkach *ex vitro* jako tkanka przyranna jest obiektem badaniach biotechnologicznych *in vitro* takich jak: uzyskiwanie metabolitów wtórnych, analiza patogeniczności na poziomie embrionalnym, krioprezerwacja materiału roślinnego, uzyskiwanie roślin transformowanych i analiza wpływu metali ciężkich na rośliny. Kalus otrzymuje się m.in. metodą somatycznej embriogenezy i organogenezy *in vitro* jako jej pośredni efekt. Istnieje duże zainteresowanie otrzymaniem kalusa drzew leśnych. Kalus roślin drzewiastych zaindukowany w warunkach *in vitro* pod wpływem elicitorów w postaci grzybów produkuje metabolity wtórne: monoterpeny i izoproteidy z *Betula* sp. oraz glikozydy fenolowe u rodziny Salicaceae. Substancje te znalazły zastosowanie nie tylko w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym, ale również mają silne działanie odstraszające zwierzęta roślinożerne. Kultury dualne *in vitro* wykazały, że kalus nieembriogenny poddany wpływowi czynników stresowych (grzyb patogeniczny) wytwarza białka odpornościowe o niskiej masie cząsteczkowej. Daje to podstawę do oceny stopnia patogeniczności grzyba na poziomie embrionalnym. Krioprezerwacja kalusa embriogennego znajduje szerokie zastosowanie w rozszerzaniu banku genów. Badano także wpływ metali ciężkich na kalus.

THE USE OF CALLUS TISSUE IN FOREST TREE BIOTECHNOLOGY: STUDIES *IN VITRO*

Summary

Callus, occurring *ex vitro* as wound tissue, is a subject of extensive biotechnological *in vitro* research, including: obtainment of secondary metabolites, pathogenicity studies at embryonic level, cryopreservation of plant material, obtainment of transformed plants and influence of heavy metals on plants. Callus can be obtained, among others, as an indirect effect of somatic embryogenesis and organogenesis *in vitro*. Hence, there is considerable interest in application of this method in forest trees and in callus obtained as a result thereof. Callus of woody plants, induced in vitro under the effect of elicitors in the form of fungi, produces secondary metabolites, such as: monoterpenes and isoprenoids in *Betula* sp. and phenolic glycosides in the family Salicaceae. These secondary metabolites have been used not only in the pharmaceutical and cosmetic industries, but also as strong repelling agents against herbivores. On the other hand, studies in dual *in vitro* cultures have shown that non-embryogenic callus of e.g. *Pinus sylvestris* subjected to a stress factor such as pathogenic fungus, produces in response low molecular weight proteins classified as PR-type (pathogenesis related) immune proteins. These observations give the basis for the assessment of pathogenicity and the level of threat posed by the fungus at the cellular level. Also, cryopreservation of embryogenic callus is widely used, among others, in gene bank reservoirs of valuable plant genotypes. Biotechnological studies involving callus of different forest tree species complement and support the development of disciplines such as physiology, phytopathology or plant breeding and selection.

LITERATURA

AGRAWAL V., SHARMA K., 2006. *Phytotoxic effects of Cu, Zn, Cd and Pb on in vitro regeneration and concomitant protein changes in Holarrhena antidysenterica.* Biol. Plant. 50, 307–310.

BECWAR M. R., NAGMANI R., WANN S. R., 1990. *Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (Pinus taeda).* Can. J. Forest Res. 20, 810–817.

BECWAR M. R., NOLAND T. J., WYCKOFF J. L., 1989. *Maturation, germination and conversion of Norway spruce (Picea abies L.) somatic embryos to plants.* In Vitro Cell. Devel. Biol. Plant 25, 575–580.

BERJAK P., PAMMENTER N. W., 2013. *Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds.* Front. Plant Sci. 4, 1–9.

BOŁONKOWSKA O., PIETROSIUK A., SYKŁOWSKA-BARANEK K., 2011. *Roślinne związki barwne i ich właściwości biologiczne oraz możliwości wytwarzania w kulturach in vitro.* Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego 1, 1–27.

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 Essances Forestieres. Fontaineblau, AFOCEL, 41–53.

BOURGAUD F., GRAVOT A., MILESI S., GONTIER E., 2001. *Production of plant secondary metabolites: a historical perspective.* Plant Sci. 161, 839–851.

CHALUPA V., 1995. *Somatic embryogenesis in birch (Betula pendula Roth.).* [W:] *Somatic Embryogenesis in Woody Plants.* JAIN S. M., GUPTA P. K., NEWTON R. J. (red.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2, 207–220.

CLINE S. D., COSCIA C. J., 1988. *Stimulation of sanguinarine production by combined fungal elicitation and hormonal deprivation in cell suspension cultures of Papaver bracteatum.* Plant Physiol. 86, 161–165.

CORNU D., GEOFFRION C., 1990. *Aspects de l'embryogenese somatique chez le meleze.* Bulletin de la Société Botanique de France, 137, 25–34.

CORREDOIRA E., BALLESTE A., VIEITEZ A. M., 2003. *Proliferation, maturation and germination of Castanea sativa Mill. Somatic embryos orginated from leaf explants.* Ann. Bot. 92, 129–136.

CUSIDÓ R. M., PALAZÓN J., NAVIA-OSORIO A., MALLOL A., BONFILL M., MORALES C., PI OL M. T., 1999. *Production of Taxol and baccatin III by a selected Taxus baccata callus line and its derived cell suspension culture.* Plant Scie. 146, 101–107.

CYR D. R., KLIMASZEWSKA K., 2002. *Conifer somatic embryogenesis: II Applications.* Dendrobiology 48, 41–49.

ĎURKOVIČ J., MIŠALOVÁ A., 2008. *Micropropagation of temperate noble hardwoods: An overview.* Funct. Plant Sc. Biotechnol. 2, 1–9.

GOFF S. A., RICKE D., LANG T.-H. i współaut., 2002. *A draft sequence of the rice genome (Oryza sativa L. ssp. japonica.).* Science 296, 92–100.

GRUSZCZYŃSKA A., RAKOCZY-TROJANOWSKA M., 2007. *Charakterystyka genów ulegających ekspresji podczas somatycznej embriogenezy u roślin.* Biotechnologia 1, 96–106.

GUPTA P. K., DURZAN D. J., 1985. *Shoot multiplication from mature trees of Douglas – fir (Pseudotsuga menziesii) and sugar pine (Pinus lambertiana).* Plant Cell Rep. 4, 177–179.

GUPTA P. K., DURZAN D. J., 1986. *Plantlet regeneration via somatic embryogenesis from subcultured callus of mature embryos of Picea abies (Norway spruce).* In Vitro Cell. Devel. Biol. Plant 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.

HAKMAN I., FOWKE L. C, VON ARNOLD S., ERIKSSON T., 1985. *The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of Picea abies (Norway spruce).* Plant Sci. 38, 53–59.

HARGREAVES C., MENZIES M., 2007. *Organogenesis and cryopreservation of juvenile radiata pine.* [W:] *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits.* JAIN S. M., HÄGGMAN H. (red.). Springer-Verlag 6, 51–66.

HAZUBSKA-PRZYBYŁ T., CHMIELARZ P., MICHALAK M., BOJARCZUK K., 2010. *Cryopreservation of embryogenic tissues of Picea omorika (Serbian spruce).* Plant Cell Tiss. Org. Cult. 102, 35–44.

HAZUBSKA-PRZYBYŁ T., CHMIELARZ P., MICHALAK M., DERING M., BOJARCZUK K., 2012. *Vitrification metod of ambryogenic tissues of spruce trees (Picea spp.).* Biotechnologia 93, 242.

HAZUBSKA-PRZYBYŁ T., CHMIELARZ P., MICHALAK M., DERING M., BOJARCZUK K., 2013a. *Survival and genetic stability of Picea abies embryogenic cultures after cryopreservation using a pregrowth-dehydration method.* Plant Cell Tiss. Org. Cult. 113, 303–313.

HAZUBSKA-PRZYBYŁ T., RATAJCZAK E., KALEMBA E. M., BOJARCZUK K., 2013b. *Growth regulators and guaiacol peroxidase activity during the induction phase of somatic embryogenesis in Picea species.* Dendrobiology 69, 77–86.

HENDRY S. J., BODDY L., LONSDALE D. 1993. *Interactions between callus cultures of European beech, indigenous ascomycetes and derived fungal extracts.* New Phytol. 123, 421–428.

KLIMASZEWSKA K., PARK Y.-S., OVERTON C., MACEACHERON I., BONGA J. M., 2001. *Optimized somatic embryogenesis in Pinus strobus L.* In Vitro Cell. Devel. Biol. Plant 37, 392–399.

KLIMASZEWSKA K., OVERTON C., STEWART D., RUTLEDGE R. G., 2010. *Initiation of somatic embryos and regeneration of plants from primordial shoots of 10-year-old somatic white spruce and expression profiles of 11 genes followed during the tissue culture process.* Planta 233, 635–647.

KOMARAIAH P., AMRUTHA R.N., KAVI KISHOR P.B., RHAMAKRISHNA S., V. 2002. *Elicitor enhanced production of plumbagin in suspension cultures of Plumbagino rosea L.* Enzyme Microb. Technol. 31, 634–639.

KOWALSKI T., KEHR R. D. 1992. *Endophytic fungal colonization of branch bases in several forest tree species.* Sydowia 44, 137–168.

KRAJ W., DOLNICKI A., NAWROT-CHORABIK K., 1999. *Sterilisation of the explants from beech (Fagus sylvatica L.) for the in vitro cultures.* Biologia (Bratislava). S. Botany 54 (Suppl. 7), 33.

LELU-WALTER M. A., BERNIER-CARDOU M., KLIMASZEWSKA K., 2008. *Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of Pinus sylvestris (L.) through somatic embryogenesis.* Plant Cell Tiss. Org. Cult. 92, 31–45.

LITVAY J. D., VERMA, D. C., JOHNSON M. A., 1985. *Influence of loblolly pine (Pinus taeda L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of wild carrot (Daucus carota L.).* Plant Cell Rep. 4, 325–328.

LLOYD G., MCCOWN B., 1981. *Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, Kalmia*

latifolia , by use of shoot tip culture. Int. Plant Propag. Soc. 30, 421–427.

MALÁ J., CVIKROVÁ M., CHALUPA V., 2007. *Micropropagation of mature trees of Ulmus glabra, Ulmus minor and Ulmus laevis*. [W:] *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. JAIN S. M., HÄGGMAN H. (red.). Springer-Verlag 22, 237–248.

MULABAGAL V., TSAY H. S., 2004. *Plant cell cultures an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites*. Int. J. Applied Sci. Eng. 2, 29–48.

MIHALJEVIĆ S., JELASKA S. 2005. *Omorica spruce* (*Picea omorica*). [W:] *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. JAIN S. M., GUPTA P. (red.). Forestry Sciences. Springer-Verlag 77, 35–46.

MISSON J.-P., DRUART P., PANIS B., WATILLON B., 2006. *Contribution to the study of the maintenance of somatic embryos of Abies nardmaniana Lk: culture media and cryopreservation method*. Propag. Ornament. Plants 6, 17–23.

MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. 15, 473–494.

NAUJOKS G., 2007. *Micropropagation of Salix caprea L.* [W:] *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. JAIN S. M., HÄGGMAN H. (red.). Springer-Verlag 20, 213–220.

NAWROT-CHORABIK K., 2007. *Induction and development of Grand Fir (Abies grandis Lindl.) callus in tissue cultures*. Elect. J. Polish Agricult. Univ. 10, 1–11.

NAWROT-CHORABIK K., 2008. *Embryogenic callus induction and differentiation in silver fir (Abies alba Mill.) tissue culture*. Dendrobiology 59, 31–40.

NAWROT-CHORABIK K., 2009. *Somaclonal variation in embryogenic cultures of silver fir (Abies alba Mill.)*. Plant Biosyst. 143, 377–385.

NAWROT-CHORABIK K., 2012. *Somatic embryogenesis in forest plants*. [W:] *Embryogenesis* KEN-ICHI S. (red.). InTech open science Publisher, Rijeka, 20, 423–446.

NAWROT-CHORABIK K., 2013. *Możliwości wykorzystania kultur dualnych w praktyce leśnej*. Sylwan 157, 54–62.

NAWROT-CHORABIK K., 2014. *Interactions between embryogenic callus of Abies alba and Heterobasidion spp. in dual cultures*. Biol. Plant. 58, 363–369.

NAWROT-CHORABIK K., 2015a. *Plantlet regeneration through somatic embryogenesis Abies nordmanniana (Steven) Spach (Normanninir)*. J. For. Res. (w druku).

NAWROT-CHORABIK K., 2015b. *The effect of explant origin, media and growth regulators on the initiation and proliferation of embryogenic callus of Pinus sylvestris L. in somatic embryogenesis*. Phyton Horn (in press).

NAWROT-CHORABIK K., JANKOWIAK R., 1999. *Wstępne badania nad dezynfekcją eksplantatów jodły olbrzymiej (Abies grandis Lindl.) wykorzystywanych w kulturach in vitro do mikrorozmnażania jodły*. Zeszyty Naukowe AR z. 28, 39–50.

NAWROT-CHORABIK K., SITKO K., 2014. *The effect of abscicsic acid and dimethyl sulfoxide and different temperatures on the cryopreservation process of Abies nordmanniana (Steven) Spach embryogenic callus*. Phyton Horn. (Austria) 54, 275–284.

NAWROT-CHORABIK K., JANKOWIAK R., GRAD B., 2011. *Growth of two blue-stain fungi associated with Tetropium beetles in the presence of callus cultures of Picea abies*. Dendrobiology 66, 41–47.

NHUT D. T., HIEN N. T. T., DON, N.T., KHIEM D. V., 2007. *In vitro shoot development of Taxus wallichiana Zucc., a valuable medicinal plant*. [W:] *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. JAIN S.M., HÄGGMAN H. (red.). Springer-Verlag 10, 107–116.

PALO R. T., 1984. *Distribution of birch (Betula spp.), willow (Salix spp.), and poplar (Populus spp.) secondary metabolites and their potential role as chemical defense against herbivores*. J. Chem. Ecol. 10, 499–520.

PARK Y. S., 2001. *Implementation of somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment strategies*. Int.Conference Wood, Breeding, Biotechnology and Industrial expectations, Bordeaux, France, 106.

RAO P. S., 1965. *In vitro induction of embryonic proliferation in Santalum album L.* Phytomorphology 15, 175–179.

SALAJ T., SALAJ J. 2003/4. *Somatic embryo formation on mature Abies alba × Abies cephalonica zygotic embryo explants*. Biol. Plant. 47, 7–11.

SALAJOVA T., SALAJ J., JASIK J., KORMUTAK A., 1995. *Somatic embryogenesis in Pinus nigra Arn*. [W:] *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. JAIN S. M., GUPTA P. K., NEWTON R. J. (red.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 207–220.

SCHENK R. U., HILDEBRANDT A., C. 1972. *Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures*. Can. J. Bot. 50, 199–204.

SCHULZ B., BOYLE CH., DRAEGER S., RÖMMERT A.-K., KROHN K., 2002. *Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites*. Mycol. Res. 106, 996–1004.

SPARG S. G., LIGHT M. E., VAN STADEN J., 2004. *Biological activities and distribution of plant saponins*. J. Ethnopharmacol. 94, 219–243.

STEFANIAK B., 2004. *Roślinne komórki in vitro*. [W:] *Komórki roślinne w warunkach stresu. Tom II Komórki in vitro*. WOŹNY A., PRZYBYŁ K. (red.) Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 2004.

STEWARD F. C., 1958. *Growth and development of cultivated cells. III. Interpretations of the growth from free cell of carrot*. Am. J. Bot. 45, 709–713.

SZCZYGIEŁ K., 2005. *Somatyczna embriogeneza — alternatywny sposób uzyskiwania wyslekcjonowanego materiału sadzeniowego gatunków drzew iglastych*. Leśne Prace Badawcze 3, 71–92.

SZCZYGIEŁ K., WOJDA T., 2008. *Mikrorozmnażanie czereśni ptasiej (Prunus avium L.) i jej plantacyjna uprawa we Włoszech*. Leśne Prace Badawcze 69, 72–75.

TAN R. X., ZOU W. X., 2001. *Endophytes: a rich source of functional metabolites*. Nat. Prod. Rep. 18, 448–459.

TKACZ J. S., 2000. *Polyketide and peptide products of endophytic fungi: variations on two biosynthetic themes of secondarymetabolism*. [W:] *Microbial Endophytes*. BACON C. W., WHITE J. F. (red.). Marcel Dekker, New York, 263–294.

TORIBO M., CELESTINO C., MOLINAS M., 2005. *Cork oak, Quercus suber L.* [W:] *Protocol for somatic embryogenesis in woody plants*. JAIN S. M., GUPTA P. (red.). Forestry Sciences Springer-Verlag 77, 445–458.

TRIGIANO R. N., GRAY D. J., 2011. *Plant Development and Biotechnology*. Section IV Propagation and development concepts. CRC Press.

VALLEDOR L., RODRÍGUEZ R., SÁNCHEZ P., FRAGA M. F., BERDASCO M., HASBÚN R., RODRÍGUEZ J. L., PACHECO J. C., GARCÍA I., URIBE M. M., RÍOS D., SÁNCHEZ M., MATERÁN M. E., WALTER C., CAÑAL M. J. 2007. *Propagation of selected Pinus genotypes regardless of age*. [W:] *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. JAIN S. M., HÄGGMAN H. (red.). Springer-Verlag 13, 137–146

VON ARNOLD S., CLAPHAM D., 2008. *Spruce embryogenesis*. [W:] *Methods in molecular biology, Plant embryogenesis*. SUÁREZ M. F., BOZHKOV P. V. (red.). Humana Press, Inc. Totowa, NJ, United States. 427, 31–45.

WALTERS C., FIND J. I., GRACE L. J., 2005. *Somatic embryogenesis and genetic transformation in Pinus radiata*. [W:] *Protocol for somatic embryogenesis in woody plants*. JAIN S. M., GUPTA P. (red.). Forestry Sciences. Springer-Verlag 77, 11–24.

WANG CH., WU J., MEI X., 2001. *Enhancement of Taxol production and execration in Taxus chinensis cell culture by fungal elicitation and medium renewal*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55, 404–410.

WOŹNY A., PRZYBYŁ, K., 2004. *Komórki roślinne w warunkach stresu. Tom II Komórki in vitro.* Adam Mickiewicz University, 72–91.

YANG X., ZHANG X., 2011. *Developmental and molecular aspects of non zygotic (somatic) embryogenesis.* [W:] *Plant tissue culture, development, and biotechnology.* TRIGIANO R. N., GRAY D. J. (red.). CRC Press, 307–326.

ZENKTELER M., 1984. *Hodowla komórek i tkanek roślinnych*. PWN.