

Danuta Kulpa

**Somatyczna embriogeneza w kulturach
chryzantemy wielkokwiatowej
(*Chrysanthemum x grandiflorum*
(Ramat.) Kitam.)**



Szczecin 2012

55581

Chęć.

Spis treści

03559



1. Wstęp	7
2. Przegląd literatury	9
2.1. Injeksja obywatelska	9
2.2. Injeksja kulturowa	9
2.3. Injeksja społeczna	11
2.4. Injeksja polityczna	12
2.5. Injeksja ekonomiczna	15
2.6. Injeksja kulturalna	16
2.7. Znaczenie edukacji	19
3. Materiały metodyczne	21
3.1. Injeksja kulturowa	21
3.2. Narzędzia i techniki	22
3.3. Narzędzia i techniki	24
3.4. Narzędzia i techniki	25
3.5. Narzędzia i techniki	26
3.6. Narzędzia i techniki	27
3.7. Narzędzia i techniki	28
3.8. Narzędzia i techniki	29
3.9. Narzędzia i techniki	30
3.10. Narzędzia i techniki	31
3.11. Narzędzia i techniki	32
3.12. Narzędzia i techniki	33
3.13. Narzędzia i techniki	34
3.14. Narzędzia i techniki	35
3.15. Narzędzia i techniki	36
3.16. Narzędzia i techniki	37
3.17. Narzędzia i techniki	38
3.18. Narzędzia i techniki	39
3.19. Narzędzia i techniki	40
3.20. Narzędzia i techniki	41
3.21. Narzędzia i techniki	42
3.22. Narzędzia i techniki	43
3.23. Narzędzia i techniki	44
3.24. Narzędzia i techniki	45
3.25. Narzędzia i techniki	46
3.26. Narzędzia i techniki	47
3.27. Narzędzia i techniki	48
3.28. Narzędzia i techniki	49
3.29. Narzędzia i techniki	50
3.30. Narzędzia i techniki	51
3.31. Narzędzia i techniki	52
3.32. Narzędzia i techniki	53
3.33. Narzędzia i techniki	54
3.34. Narzędzia i techniki	55
3.35. Narzędzia i techniki	56
3.36. Narzędzia i techniki	57
3.37. Narzędzia i techniki	58
3.38. Narzędzia i techniki	59
3.39. Narzędzia i techniki	60
3.40. Narzędzia i techniki	61
3.41. Narzędzia i techniki	62
3.42. Narzędzia i techniki	63
3.43. Narzędzia i techniki	64
3.44. Narzędzia i techniki	65
3.45. Narzędzia i techniki	66
3.46. Narzędzia i techniki	67
3.47. Narzędzia i techniki	68
3.48. Narzędzia i techniki	69
3.49. Narzędzia i techniki	70
3.50. Narzędzia i techniki	71
3.51. Narzędzia i techniki	72
3.52. Narzędzia i techniki	73
3.53. Narzędzia i techniki	74
3.54. Narzędzia i techniki	75
3.55. Narzędzia i techniki	76
3.56. Narzędzia i techniki	77
3.57. Narzędzia i techniki	78
3.58. Narzędzia i techniki	79
3.59. Narzędzia i techniki	80
3.60. Narzędzia i techniki	81
3.61. Narzędzia i techniki	82
3.62. Narzędzia i techniki	83
3.63. Narzędzia i techniki	84
3.64. Narzędzia i techniki	85
3.65. Narzędzia i techniki	86
3.66. Narzędzia i techniki	87
3.67. Narzędzia i techniki	88
3.68. Narzędzia i techniki	89
3.69. Narzędzia i techniki	90
3.70. Narzędzia i techniki	91
3.71. Narzędzia i techniki	92
3.72. Narzędzia i techniki	93
3.73. Narzędzia i techniki	94
3.74. Narzędzia i techniki	95
3.75. Narzędzia i techniki	96
3.76. Narzędzia i techniki	97
3.77. Narzędzia i techniki	98
3.78. Narzędzia i techniki	99
3.79. Narzędzia i techniki	100
3.80. Narzędzia i techniki	101
3.81. Narzędzia i techniki	102
3.82. Narzędzia i techniki	103
3.83. Narzędzia i techniki	104
3.84. Narzędzia i techniki	105
3.85. Narzędzia i techniki	106
3.86. Narzędzia i techniki	107
3.87. Narzędzia i techniki	108
3.88. Narzędzia i techniki	109
3.89. Narzędzia i techniki	110
3.90. Narzędzia i techniki	111
3.91. Narzędzia i techniki	112
3.92. Narzędzia i techniki	113
3.93. Narzędzia i techniki	114
3.94. Narzędzia i techniki	115
3.95. Narzędzia i techniki	116
3.96. Narzędzia i techniki	117
3.97. Narzędzia i techniki	118
3.98. Narzędzia i techniki	119
3.99. Narzędzia i techniki	120
3.100. Narzędzia i techniki	121
4. Wyniki	122
4.1. Wyniki	122
4.2. Wyniki	123
4.3. Wyniki	124
4.4. Wyniki	125
4.5. Wyniki	126
4.6. Wyniki	127
4.7. Wyniki	128
4.8. Wyniki	129
4.9. Wyniki	130
4.10. Wyniki	131
4.11. Wyniki	132
4.12. Wyniki	133
4.13. Wyniki	134
4.14. Wyniki	135
4.15. Wyniki	136
4.16. Wyniki	137
4.17. Wyniki	138
4.18. Wyniki	139
4.19. Wyniki	140
4.20. Wyniki	141
4.21. Wyniki	142
4.22. Wyniki	143
4.23. Wyniki	144
4.24. Wyniki	145
4.25. Wyniki	146
4.26. Wyniki	147
4.27. Wyniki	148
4.28. Wyniki	149
4.29. Wyniki	150
4.30. Wyniki	151
4.31. Wyniki	152
4.32. Wyniki	153
4.33. Wyniki	154
4.34. Wyniki	155
4.35. Wyniki	156
4.36. Wyniki	157
4.37. Wyniki	158
4.38. Wyniki	159
4.39. Wyniki	160
4.40. Wyniki	161
4.41. Wyniki	162
4.42. Wyniki	163
4.43. Wyniki	164
4.44. Wyniki	165
4.45. Wyniki	166
4.46. Wyniki	167
4.47. Wyniki	168
4.48. Wyniki	169
4.49. Wyniki	170
4.50. Wyniki	171
4.51. Wyniki	172
4.52. Wyniki	173
4.53. Wyniki	174
4.54. Wyniki	175
4.55. Wyniki	176
4.56. Wyniki	177
4.57. Wyniki	178
4.58. Wyniki	179
4.59. Wyniki	180
4.60. Wyniki	181
4.61. Wyniki	182
4.62. Wyniki	183
4.63. Wyniki	184
4.64. Wyniki	185
4.65. Wyniki	186
4.66. Wyniki	187
4.67. Wyniki	188
4.68. Wyniki	189
4.69. Wyniki	190
4.70. Wyniki	191
4.71. Wyniki	192
4.72. Wyniki	193
4.73. Wyniki	194
4.74. Wyniki	195
4.75. Wyniki	196
4.76. Wyniki	197
4.77. Wyniki	198
4.78. Wyniki	199
4.79. Wyniki	200
4.80. Wyniki	201
4.81. Wyniki	202
4.82. Wyniki	203
4.83. Wyniki	204
4.84. Wyniki	205
4.85. Wyniki	206
4.86. Wyniki	207
4.87. Wyniki	208
4.88. Wyniki	209
4.89. Wyniki	210
4.90. Wyniki	211
4.91. Wyniki	212
4.92. Wyniki	213
4.93. Wyniki	214
4.94. Wyniki	215
4.95. Wyniki	216
4.96. Wyniki	217
4.97. Wyniki	218
4.98. Wyniki	219
4.99. Wyniki	220
4.100. Wyniki	221
5. Dyskusja	222
5.1. Wyniki	222
5.2. Wyniki	223
5.3. Wyniki	224
5.4. Wyniki	225
5.5. Wyniki	226
5.6. Wyniki	227
5.7. Wyniki	228
5.8. Wyniki	229
5.9. Wyniki	230
5.10. Wyniki	231
5.11. Wyniki	232
5.12. Wyniki	233
5.13. Wyniki	234
5.14. Wyniki	235
5.15. Wyniki	236
5.16. Wyniki	237
5.17. Wyniki	238
5.18. Wyniki	239
5.19. Wyniki	240
5.20. Wyniki	241
5.21. Wyniki	242
5.22. Wyniki	243
5.23. Wyniki	244
5.24. Wyniki	245
5.25. Wyniki	246
5.26. Wyniki	247
5.27. Wyniki	248
5.28. Wyniki	249
5.29. Wyniki	250
5.30. Wyniki	251
5.31. Wyniki	252
5.32. Wyniki	253
5.33. Wyniki	254
5.34. Wyniki	255
5.35. Wyniki	256
5.36. Wyniki	257
5.37. Wyniki	258
5.38. Wyniki	259
5.39. Wyniki	260
5.40. Wyniki	261
5.41. Wyniki	262
5.42. Wyniki	263
5.43. Wyniki	264
5.44. Wyniki	265
5.45. Wyniki	266
5.46. Wyniki	267
5.47. Wyniki	268
5.48. Wyniki	269
5.49. Wyniki	270
5.50. Wyniki	271
5.51. Wyniki	272
5.52. Wyniki	273
5.53. Wyniki	274
5.54. Wyniki	275
5.55. Wyniki	276
5.56. Wyniki	277
5.57. Wyniki	278
5.58. Wyniki	279
5.59. Wyniki	280
5.60. Wyniki	281
5.61. Wyniki	282
5.62. Wyniki	283
5.63. Wyniki	284
5.64. Wyniki	285
5.65. Wyniki	286
5.66. Wyniki	287
5.67. Wyniki	288
5.68. Wyniki	289
5.69. Wyniki	290
5.70. Wyniki	291
5.71. Wyniki	292
5.72. Wyniki	293
5.73. Wyniki	294
5.74. Wyniki	295
5.75. Wyniki	296
5.76. Wyniki	297
5.77. Wyniki	298
5.78. Wyniki	299
5.79. Wyniki	300
5.80. Wyniki	301
5.81. Wyniki	302
5.82. Wyniki	303
5.83. Wyniki	304
5.84. Wyniki	305
5.85. Wyniki	306
5.86. Wyniki	307
5.87. Wyniki	308
5.88. Wyniki	309
5.89. Wyniki	310
5.90. Wyniki	311
5.91. Wyniki	312
5.92. Wyniki	313
5.93. Wyniki	314
5.94. Wyniki	315
5.95. Wyniki	316
5.96. Wyniki	317
5.97. Wyniki	318
5.98. Wyniki	319
5.99. Wyniki	320
5.100. Wyniki	321
6. Wnioski	322
7. Podsumowanie	323
8. Bibliografia	324
9. Załączniki	325

DANUTA KULPA

Somatyczna embriogeneza w kulturach chryzantemy wielkokwiatowej (*Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat.) Kitam.)

Recenzenci
EWA SAWICKA-SIENKIEWICZ
MAŁGORZATA ZALEWSKA



CZ.55581

DANUTA KULPA

Opracowanie redakcyjne
KRYSTYNA KAŻMIEROWSKA

Zdjęcie na okładce
DANUTA KULPA

WYDANO ZA ZGODĄ
REKTORA ZACHODNIOPOMORSKIEGO UNIWERSYTETU TECHNOLOGICZNEGO
W SZCZECINIE

ISBN 978-83-7663-138-7

Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego
w Szczecinie
70-311 Szczecin, al. Piastów 50, tel. 91 449-47-60, e-mail: wydawnictwo@zut.edu.pl
Druk PPH Zapół, Dmochowski, Sobczyk Sp.j., 71-062 Szczecin, al. Piastów 42, tel. 91 434-10-
21, e-mail: zarzad@zapol.com.pl

16/2013

Spis treści

1. Wstęp	7
2. Przegląd literatury	9
2.1. Inicjacja sterylnych kultur chryzantemy	9
2.2. Inicjacja kultur kalusowych	9
2.3. Namnażanie tkanki kalusowej	11
2.4. Somatyczna embriogeneza chryzantemy	12
2.5. Rola poliamin w przebiegu SE	15
2.6. Wpływ światła na prowadzenie kultur <i>in vitro</i>	16
2.7. Zmienność somaklonalna regeneratów	18
3. Materiał i metody badań	21
3.1. Inicjacja kultur kalusowych	21
3.2. Namnażanie tkanki kalusowej na pożywkach stałych	22
3.3. Namnażanie tkanki kalusowej na pożywkach płynnych	24
3.4. Inicjacja somatycznej embriogenezy w kulturach kalusowych	25
3.5. Inicjacja bezpośredniej somatycznej embriogenezy	26
3.6. Dojrzewanie i konwersja zarodków somatycznych	27
3.7. Analiza statystyczna wyników badań	28
3.8. Określenie zmienności genetycznej fragmentów kalusa i zregenerowanych roślin metodą ISSR-PCR	29
4. Wyniki	31
4.1. Inicjacja kultur kalusowych	31
4.2. Namnażanie tkanki kalusowej na pożywkach stałych	36
4.3. Namnażanie tkanki kalusowej na pożywkach płynnych	40
4.4. Inicjacja somatycznej embriogenezy w kulturach kalusowych	42
4.5. Inicjacja bezpośredniej somatycznej embriogenezy	47
4.6. Dojrzewania i konwersja zarodków somatycznych	52
4.7. Proponowany protokół pozyskiwania zarodków somatycznych chryzantemy wielokwiatowej w kulturach <i>in vitro</i>	55
4.8. Wpływ warunków prowadzenia kultury na zmienność somaklonalną określaną metodą ISSR-PCR	56
4.9. Ocena jednorodności genetycznej regeneratów uzyskanych na drodze pośredniej i bezpośredniej somatycznej embriogenezy	58
5. Dyskusja	61
5.1. Wpływ auksyn i BAP na prowadzenie kultur kalusowych	62
5.2. Wpływ auksyn i cytokininy BAP oraz składu mineralnego pożywki na inicjację somatycznej embriogenezy	64
5.3. Wpływ poliamin na prowadzenie kultur kalusowych i somatyczną embriogenezę	66
5.4. Wpływ światła na prowadzenie kultur kalusowych i somatyczną embriogenezę	68
5.5. Dojrzewanie i konwersja zarodków somatycznych	70
5.6. Stabilność genetyczna tkanek roślinnych oraz roślin zregenerowanych na drodze somatycznej embriogenezy	72
6. Wnioski	75
7. Piśmiennictwo	77
Summary	91
Zusammenfassung	93

Spis skrótów

- 2,4-D** – kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy
2iP – N⁶-D²-izopentenyloadenina
ABA – kwas abscysynowy
AC – węgiel aktywowany
B5 – pożywka Gamborga i wsp. (1968)
BAP – 6-benzyloaminopuryna
DIC – dicamba – kwas 2-metoksy-3,6-dichlorobenzoowy
EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy
GA₃ – kwas giberelinowy A₃
HC – hydrolizat kazeiny
IAA – kwas indolilo-3-octowy
IBA – kwas indolilo-3-masłowy
KIN – kinetyna
LS – pożywka Linsmaiera i Skooga (1965)
MS – pożywka Murashige'a i Skooga (1962)
NAA – kwas 1-naftylooctowy
NIR – najmniejsza istotna różnica
PA – poliaminy
PIK – pikloram – kwas 4-amino-3,5,6-trichloropikolinowy
PUT – putrescyna
SE – somatyczna embriogeneza
SH – pożywka Schenka i Hildebrandta (1972)
SM – sucha masa
SPM – spermina
SPMD – spermidyna
TBE – bufor boranowy
TDZ – tidiazuron

Somatyczna embriogeneza jest niezwykle skomplikowanym procesem, w którym na powstawanie i rozwój zarodka ma wpływ wiele różnych czynników. Jednym z nich jest nierówny rozkład w tkance roślinnej zawartość substancji, takich jak: regulatory wzrostu, liczne kanały przewodzenia soku czy miazgi, woda i nawet ruchomość eksplanatu wykorzystanego do jej substeracji. Istotną rolę ma również genotyp badanej rośliny – wyodrębnienie roślin na tym etapie mogą różnić się między sobą w przypadku blisko spokrewnionych gatunków.

Ekspozytami do założenia kultury, w której zachodzą procesy somatycznej embriogenezy, mogą być fragmenty tkanek roślinnej lub zarodki roślin w sterylnych warunkach

Wstęp

Chryzantema wielkokwiatowa (*Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat.) Kitam.) syn. *Dendranthema x grandiflora* (Ramat.) Kitam.) jest jedną z najbardziej popularnych roślin ozdobnych, drugą pod względem znaczenia ekonomicznego w Europie (Rout i Das 1997, Jerzy 2000, Rout i wsp. 2001, Teixeira da Silva 2003a, 2004, Zalewska 2005, Bhattacharya i Teixeira da Silva 2006, Chatterjee i wsp. 2006). Uprawiana jest na całym świecie od ponad 2000 lat, a hodowla twórcza, jak i uprawa prowadzona jest zarówno na masową skalę, jak i w małych, rodzinnych firmach ogrodniczych. Wszystkie, bardzo liczne obecnie odmiany chryzantemy wielkokwiatowej rozmnażane są wegetatywnie, konwencjonalnie lub też za pomocą mikrosadzonkowania w kulturach *in vitro*. Wciąż poszukuje się nowych metod rozmnażania roślin tego gatunku, które pozwolą na uzyskanie dużej liczby sadzonek w relatywnie krótkim okresie.

Metodą pozwalającą na uzyskanie populacji roślin tożsamyh genetycznie z rośliną mateczną jest somatyczna embriogeneza. Jest to proces, w którym dwubiegunowa struktura będąca zarodkiem przybyszowym formuje się z komórek somatycznych, a te nie są produktem fuzji gametycznej (Dudits i wsp. 1995, Stefaniak 2004). Przebiega ona zwykle wieloetapowo – od powstania masy proembriogenicznej, przez formowanie zarodka somatycznego, jego dojrzewanie aż do kiełkowania rośliny. Oprócz odmiennego pochodzenia komórek dających początek roślinie potomnej, przebieg somatycznej i zygotycznej embriogenezy jest często do siebie zbliżony, a nawet zachodzi identycznie. Ze względu na potencjalną wydajność tej metody, jak i możliwość automatyzacji produkcji zarodków somatycznych uzyskane rośliny produkowane są znacznie niższym kosztem od sadzonek uzyskanych drogą mikrorozmnażania w kulturach *in vitro*. Poza rozmnażaniem roślin metoda ta może być wykorzystywana w hodowli roślin, w procesie regeneracji tkanek transformowanych genetycznie lub produktów fuzji protoplastów czy też w badaniach nad biologią rozwoju (Kumar i wsp. 2003a, Furuta i wsp. 2004). Zarodki somatyczne są znakomitym materiałem do krioprezerwacji, stąd metoda ta jest powszechnie wykorzystywana w bankach genów i różnego rodzaju kolekcjach roślin (Martin i Gonzales-Benito 2005).

Somatyczna embriogeneza jest niezwykle skomplikowanym procesem, w którym na powstawanie i rozwój zarodków ma wpływ wiele różnorodnych czynników, takich jak: skład mineralny pożywki, a szczególnie zawartość makroelementów, zawartość w niej regulatorów wzrostu, fizyczne warunki prowadzenia kultury czy rodzaj, wiek a nawet wielkość eksplantatu wykorzystywanego do jej założenia. Istotne znaczenie ma również genotyp badanej rośliny – wymagania roślin na tym etapie mogą różnić się istotnie, nawet w przypadku blisko spokrewnionych gatunków.

Eksplantatami do założenia kultury, w której indukowane będą zarodki somatyczne, mogą być fragmenty tkanek rośliny matecznej lub roślin rosnących w sterylnych kulturach

in vitro (bezpośrednia somatyczna embriogeneza), bądź wcześniej zainicjowana i namnożona tkanka kalusowa (pośrednia somatyczna embriogeneza). Ten drugi sposób jest zwykle bardziej wydajny ze względu na możliwość namnożenia tkanki kalusowej na pożywkach płynnych w bioreaktorze i pozwala na uzyskanie w krótkim czasie ogromnej ilości zarodków somatycznych, jest jednak trudniejszy do przeprowadzenia.

Aby móc wdrożyć do użytku komercyjnego omawianą metodę należy opracować technikę otrzymywania sterylnych kultur, wyprowadzania i namnażania tkanki kalusowej oraz indukowania procesu somatycznej embriogenezy i regenerowania otrzymanych tą drogą zarodków somatycznych. Należy również określić wpływ czynników środowiskowych, działających w trakcie indukowania procesu na wystąpienie niepożądanego zmienności somaklonalnej w pokoleniu regeneratów.

Obecnie opublikowano jedynie nieliczne prace, w których badacze donoszą o formowaniu się zarodków somatycznych chryzantemy. Nie uwzględniają one jednak całości problemu i jego złożoności, dotyczą jedynie bezpośredniej somatycznej embriogenezy. Publikacje May i Trigiano (1991) i Pavingerovej i wsp. (1994) dodatkowo mówią o zdarzających się aberracjach rozwojowych w populacji uzyskanych tą drogą zarodków somatycznych, które mogły być wynikiem źle dobranych warunków środowiska. Dlatego też podjęto próbę określenia maksymalnie dużej liczby czynników mających wpływ na przebieg inicjacji i namnażania się kultur kalusowych oraz formowania i dojrzewania zarodków somatycznych. Stąd celem pracy było:

- wybranie pożywki optymalnej do inicjacji i namnażania kultur kalusowych chryzantemy wielkokwiatowej. Szczególną uwagę zwrócono na to jaki wpływ na przebieg tego procesu mają rzadko jak dotąd stosowane auksyny pikloramu i dicamby;
- określenie wpływu regulatorów wzrostu na inicjację somatycznej embriogenezy w kulturach kalusowych – rola poliamin (putrescyny, sperminy i spermidyny) w przebiegu tego procesu;
- ustalenie jaki wpływ mają warunki świetlne na prowadzenie kultury (natężenie natężenia kwantowego i barwa światła), na inicjację i namnażanie kultur kalusowych oraz na przebieg procesu somatycznej embriogenezy i kiełkowanie zarodków somatycznych;
- zdefiniowanie składu mineralnego pożywki oraz dodatków organicznych oraz ich wpływ na regenerację zarodków somatycznych;
- określenie jak zmieniają się tkanki roślinne i regeneranty powstałe w wyniku somatycznej embriogenezy w zależności od warunków regeneracji.

2. Przegląd literatury

2.1. Inicjacja sterylnych kultur chryzantemy

Eksplantaty służące do zakładania aksenicznych kultur *in vitro* mogą być izolowane z różnorodnych fragmentów chryzantem: kwiatów języczkowatych i rurkowatych (Hill 1968, Fujii i Shimizu 1990, Malaure i wsp. 1991, Mandal i Datta 2005, Barakat i wsp. 2010), jednowęzłowych fragmentów pędów (Earle i Langhans 1974, Jerzy i Lubomski 1989, Zalewska i wsp. 2010), 2–3 mm fragmentów pędów – TCLs – Thin Cell Layers (Annadana i wsp. 2000, Teixeira de Silva 2003b, 2003c), dna kwiatowego (Roest i Bokelmann 1975, Hattori 1992) oraz liści (Bhattacharya i wsp. 1990, Kaul i wsp. 1990). Na efektywność prowadzonej inicjacji kultur istotny wpływ mają warunki, w których rosły rośliny, ich zdrowotność oraz pora roku, w której przeprowadzamy inicjację (Zalewska i wsp. 2011).

Przed założeniem kultur fragmenty rośliny muszą zostać oczyszczone i odkażone. Bush i wsp. (1976) w tym celu zanurzali kwiatostany na 5 minut w 20-procentowym roztworze Chloroksu. Natomiast Fujii i Shimizu (1990) te same fragmenty roślin zanurzali w 20-procentowym roztworze NaOCl przez 20 minut, natomiast Mandal i wsp. (2000) oraz Datta i wsp. (2001) sterylizowali je w 70-procentowym etanolu oraz moczyli przez 2 minuty w 0,1-procentowym roztworze HgCl₂. Tę samą procedurę odkażania stosowali Bhattacharya i wsp. (1990), odkażając fragmenty liści. Natomiast May i Trigiano (1991) odkażali fragmenty liści, zanurzając je w 0,26-procentowym podchlorynie sodu i 0,1-procentowym (v/v) Tritonie X-100.

2.2. Inicjacja kultur kalusowych

Tkanka kalusowa w warunkach naturalnych powstaje wskutek uszkodzenia mechanicznego, np. przez owady lub mikroorganizmy. Indukowana w kulturach *in vitro* jest bezkształtną masą, zbudowaną z szybko się dzielących, niezróżnicowanych komórek, o barwie od białej do ciemnozielonej, z widocznymi przebarwieniami w innych kolorach (Möller i wsp. 2003, Schween i Schwenkel 2003, Winkelmann i Serek 2005). Może też charakteryzować się różną strukturą – od luźno zgrupowanych fragmentów komórek, poprzez strukturę grzełkowatą, aż po tkankę silnie zbitą o twardej, gładkiej powierzchni (Kintzios i wsp. 1996, Ramanayake i Wanniarachchi 2003, Huan i wsp. 2004).

Eksplantatami wykorzystywanymi do inicjacji kultur kalusowych mogą być fragmenty roślin rosnących w warunkach *in vivo* lub *in vitro*. Fragmenty roślin rosnących w warunkach szklarniowych charakteryzują się większą stabilnością genetyczną oraz energią wzrostu, jednak są skażone licznymi patogenami i trudno aklimatyzują się do warunków *in vitro*. Dlatego też większość badaczy przychyła się do opinii, że ze względu na sterylność oraz przystosowanie do warunków prowadzenia kultury lepszym eksplantatem pierwotnym będą fragmenty liści lub merystemy wierzchołkowe roślin rosnących wcześniej w kulturach *in vitro* (Sauve i wsp.

2004, Feyissa i wsp. 2005, Nowak i wsp. 2007). Jako eksplantaty do inicjacji kultur wykorzystuje się również fragmenty siewek, które kiełkują w sterylnych warunkach *in vitro* oraz ich hypokotyle i liścienie (Charrière i Hahne 1998, Lee i Lee 2003, Anjaneyulu i wsp. 2004). W przypadku kilku gatunków roślin, w tym również chryzantemy, bada się możliwość wykorzystania jako eksplantatów cienkich 2-milimetrowych warstw pędów (Teixeira da Silva i wsp. 2003a, 2003b, 2003c).

Do inicjacji kultur kalusowych większości gatunków roślin konieczna jest obecność regulatorów wzrostu w pożywce, szczególnie auksyn – NAA i 2,4-D oraz cytokinin – BAP i kinetyny. Bhattacharya i wsp. (1990) inicjowali kultury kalusowe chryzantem odmiany 'Birbal Sahni', wykorzystując jako eksplantaty pierwotne jednowęzłowe fragmenty pędów o długości 1 cm, fragmenty pędów pomiędzy węzłami oraz wierzchołki wzrostu o długości około 0,5 cm. Fragmenty roślin były wykładane na pożywki z dodatkiem IAA, 2,4-D i BAP w różnych kombinacjach. Za najbardziej korzystny dla inicjacji kalusa uznano dodatek $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ IAA i $0,2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP. Eksplantatami, na których szczególnie obficie tworzyła się tkanka kalusowa, były fragmenty liści.

Hitmi i wsp. (1999) do indukcji tkanki kalusowej wrotczyca dalmatyńskiego (*Chrysanthemum cinarariaefolium*) wykorzystywali dno kwiatowe izolowane z młodych kwiatostanów. Fragmenty te wykładano na pożywkę MS z dodatkiem NAA i BAP (od 0 do $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Fragmenty kwiatostanów wykorzystali również Fujii i Shimizu (1990) do inicjacji tkanki kalusowej złocienia różowego, obecnie wrotczyca różowego (*Tanacetum coccineum*, syn. *Chrysanthemum coccineum*), wykładając je na pożywki o składzie mineralnym według Murashige'a i Skooga (1962) i White'a (1943) z dodatkiem BAP i NAA. Badacze ci stwierdzili indukcję tkanki kalusowej w przypadku 80–90% eksplantatów wyłożonych na pożywki zawierające oba wymienione składy mineralne, o ile były uzupełnione jednocześnie BAP w stężeniu od 1 do $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ i NAA w stężeniu od 1 do $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Kulpa i wsp. (2004) określiły wpływ regulatorów wzrostu na inicjację tkanki kalusowej w badaniach, w których eksplantatami były fragmenty kwiatostanów i blaszek liściowych roślin rosnących w warunkach szklarniowych. Na podstawie przeprowadzonych badań autorki stwierdziły, że najlepsza do inicjacji tkanki kalusowej, niezależnie od rodzaju eksplantatów pierwotnych, jest pożywka MS uzupełniona NAA ($1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) i BAP ($2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Oprócz rodzaju eksplantatu pierwotnego oraz składu pożywek, na intensywność tworzenia się tkanki kalusowej może mieć również wpływ stymulacja dźwiękiem o odpowiednim natężeniu (Wang i wsp. 2002). Zhao i wsp. (2002) za korzystnie działające na inicjację tkanki kalusowej chryzantemy wielkokwiatowej uznali traktowanie eksplantatów pierwotnych dwa razy dziennie przez pół godziny dźwiękiem o intensywności 100 dB i częstotliwości 1000 Hz. Jak stwierdzili Liu i wsp. (2001), większy przyrost masy kalusa w stosunku do kultur nietraktowanych dźwiękiem był najprawdopodobniej spowodowany zwiększeniem przepuszczalności błony komórkowej, co powoduje zwiększoną absorpcję jonów K^+ .

2.3. Namnażanie tkanki kalusowej

Tkanka kalusowa roślin z rodziny *Asteraceae* namnażana jest głównie na pożywkach zestalonych agarem, o składzie według Murashige'a i Skooga (1962), uzupełnianych różną zawartością auksyn i cytokinin (Rehman i wsp. 2003, Koroch i wsp. 2003, Malarz i wsp. 2005, Ibrahim i wsp. 2011). Hitmi i wsp. (1999) do namnażania tkanki kalusowej wrotycza dalmatyńskiego wykorzystywali pożywki MS uzupełnione zróżnicowaną zawartością NAA i BAP. Stwierdzili oni, że korzystnie na namnażanie się tkanki kalusowej wpływa zwiększanie stężenia BAP i NAA powyżej $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

W jednej z pierwszych publikacji dotyczącej namnażania kalusa chryzantemy wielokwiatowej Hill (1968) wykładała fragmenty tej tkanki na pożywki z dodatkiem NAA i kinetyny (odpowiednio: 2 i $0,8 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Badania nad kulturami kalusowymi prowadzili również Roest i Bokelmann (1975). Określili oni wpływ takich czynników jak: zawartość w pożywce składników mineralnych, regulatorów wzrostu, cukrów i witamin na namnażanie się kalusa chryzantem i regenerację pędów. Stwierdzili oni, że pożywką optymalną do namnażania kalusa jest pożywka MS z dodatkiem 10% mleka kokosowego oraz NAA w stężeniu $0,01 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ i BAP w stężeniu $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Z kolei Bhattacharya i wsp. (1990) namnażali kalus roślin tego samego gatunku na pożywkach z dodatkiem auksyn i cytokinin w zróżnicowanych stężeniach. Za najlepsze warunki do namnażania kalusa uznali oni podłoże z dodatkiem 2,4-D ($2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Kalus wyłożony na pożywki uzupełnione BAP o stężeniu wyższym niż $0,4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ zamierał, natomiast stosowanie IAA w stężeniach wyższych niż $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ powodowało intensywną ryzogenezę.

Tkanka kalusowa, która jest odpowiednim eksplantatem do indukcji somatycznej embriogenezy, powinna mieć charakter embriogeny, czyli być zbudowana z małych komórek o dużych jądrach komórkowych. Powinna się też łatwo rozpadać i mieć gruzelkową strukturę (Jimenez 2005). Dlatego obok masy wykształconej tkanki kalusowej ważną cechą jest jej struktura i zabarwienie.

Aby zwiększyć intensywność tworzenia się oraz obniżyć koszt produkcji tkanki kalusowej, kultury mogą być prowadzone w bioreaktorach, jako kultury zawieszinowe na pożywkach płynnych. Zastosowanie bioreaktorów pozwalających na ścisłe kontrolowanie warunków prowadzenia kultury, manipulowanie nimi w czasie rzeczywistym, regulację wartości pH, stężenia tlenu i dwutlenku węgla, przedłużanie czasu jej trwania przez możliwość dozowania do zbiornika substancji odżywczych czy regulatorów wzrostu umożliwiła znacznie łatwiejsze i tańsze produkowanie dużej ilości tkanki kalusowej (Kozai i wsp. 1997). Światowa produkcja tkanek roślinnych w bioreaktorach wzrosła ponad dwukrotnie w ciągu ostatniej dekady i obecnie w ten sposób produkuje się jedną trzecią bioaktywnych metabolitów wtórnych na świecie (Sivakumar i wsp. 2005). Dlatego też prowadzonych jest wiele prac badawczych zmierzających do opracowania metod prowadzenia w ten sposób kultur w celu produkcji roślinnych metabolitów wtórnych, jak w przypadku *Panax notoginseng* (Hu i Zhong 2008), żeńszenia pięciolistnego (Wang i wsp. 2012), cisa pospolitego (*Taxus baccata*) – (Srinivasan

i wsp. 1995), winorośli właściwej (*Vitis vinifera*) – (Riedel i wsp. 2012), bielunia dziedzierzawy (*Datura stramonium*) – (Amdoun i wsp. 2009) czy mięty pieprzowej (*Mentha x piperita*) – (Chakraborty i Chattopadhyay 2008).

Obecnie brak jest wyników badań nad możliwością prowadzenia kultur kalusowych chryzantemy na pożywkach płynnych. W literaturze znane są jedynie pojedyncze próby hodowli kultur pędowych chryzantemy wielokwiatowej w bioreaktorach. Paek i wsp. (2001, 2005) oraz Hahn i Paek (2005) prowadzili mikrorozmnażanie tego gatunku w bioreaktorze kolumnowym – wprowadzali do pożywki pocięte fragmenty pędów, otrzymując w ten sposób kultury pędowe, na pożywkach płynnych, w sterylnych warunkach. Badania nad wpływem warunków prowadzenia tego typu kultur na wysokość i masę uzyskanych w ten sposób roślin prowadzili również Sivakumar i wsp. (2005). Stwierdzili oni, że ich wydajność była nieco większa od kultur tego typu prowadzonych na pożywkach zestalonych agarem.

Jak dotąd brak jest jednak doniesień mówiących o prowadzeniu kultur kalusowych chryzantemy na pożywkach płynnych. Nadal jednak jest to metoda stosunkowo słabo poznana i wymagająca wielu badań aby mogła zostać na szerszą skalę zastosowana komercyjnie. Przeszkodą jest tu duży koszt prowadzenia tego typu doświadczeń, problemy związane ze słabym poznaniem skomplikowanych relacji pomiędzy fizjologią tkanki roślinnej a fizycznymi warunkami prowadzenia kultury w bioreaktorze oraz wątpliwości dotyczące stabilności genetycznej namnażanych w ten sposób tkanek roślinnych (Paek i wsp. 2001).

2.4. Somatyczna embriogeneza chryzantemy

Somatyczna embriogeneza to proces biologiczny, podczas którego z komórek wegetatywnych formują się zarodki. Jest ona uważana za metodę pozwalającą na uzyskanie ogromnej liczby roślin potomnych, identycznych genetycznie jak roślina mateczna, w krótkim okresie (Malepszy i Wróblewski 1994, Wróblewski 1994, Merkele i wsp. 1995, Litz i Gray 1995). Zarodki somatyczne w trakcie swojego rozwoju przechodzą kolejne stadia rozwojowe (globularne, torpedy, serca i zarodka dojrzałego, nazywane czasami stadium laski), zwykle podobne do faz rozwojowych zarodków zygotycznych danego gatunku. Efektem końcowym procesu somatycznej embriogenezy jest kompletna, bipolarna roślina z wykształconymi liśćmi i korzeniem (Haccius 1978, Bach 2001).

W przypadku roślin z rodziny *Asteraceae* dobrymi eksplantatami do inicjacji procesu somatycznej embriogenezy są fragmenty kwiatostanów (Bush i wsp. 1976, Kintzios i Michalakakis 1999), siewek (Mandal i wsp. 2001, Mandal i Gupta 2003) lub liści (May i Trigiano 1991), hipokotyle i nierozwinięte pąki kwiatowe oraz cienkie fragmenty łodygi roślin. W przypadku innych gatunków zarodki somatyczne otrzymano również wykorzystując jako eksplantaty pierwotne fragmenty korzeni przybyszowych czy igły roślin iglastych. Zwykle jednak indukcję zarodków somatycznych prowadzi się w kulturach kalusowych. Zaletami tego typu

kultur jest ich sterylność, dostosowanie do warunków panujących podczas prowadzenia kultury oraz łatwość aplikacji regulatorów wzrostu (Selles i wsp. 1999).

Nabycie przez grupę komórek kompetencji do somatycznej embriogenezy, nazywane indukcją embriogeniczności, regulowane jest przez wiele czynników środowiskowych, z których najważniejsze to: zawartość substancji regulujących ciśnienie osmotyczne – cukrów (Ishii i wsp. 1998, Cheong i Pooler 2004, Anjaneyulu i wsp. 2004), zmiany pH podłoża (Cho i wsp. 2003), temperatura otoczenia (Ptak 2010) a nawet siła i częstotliwość dźwięku (Zhao i wsp. 2002). Czynnikiem indukującym proces somatycznej embriogenezy jest często stres, np. susza fizjologiczna wywołana przez nadmierną zawartość węglowodanów w pożywce. Mandal i Datta (2005) oceniali wpływ zawartości sacharozy (od 30 do 180 g · dm⁻³) oraz inozytolu (od 100 do 800 mg · dm⁻³) na częstość i liczbę tworzących się zarodków somatycznych w kulturach kwiatów języczkowatych chryzantem. Ocenili oni, że zwiększona, w stosunku do standardowo stosowanej, zawartość sacharozy i inozytolu (odpowiednio: 60 g · dm⁻³ i 800 mg · dm⁻³) wpłynęła korzystnie na kształtowanie się omawianej cechy.

W największym jednak stopniu na indukację zarodków somatycznych wpływa zawartość składników mineralnych (Southworth i Kwiatkowski 1991) i regulatorów wzrostu w podłożu (Kępczyński i Kępczyńska 2001, Miłkuła i Rybczyński 2001). Doniesienia mówiące o składzie regulatorów wzrostu, optymalnym do indukcji somatycznej embriogenezy, są często sprzeczne. Kumar i wsp. (2008c), inicjując kultury krokosza balwierskiego (*Carthamus tinctorius*), jednorocznej rośliny z rodziny *Asteraceae*, obserwowali SE w kulturach liści wyłożonych na pożywki bez regulatorów wzrostu, natomiast Mandal i Gupta (2003), inicjując kultury tej samej rośliny za najlepszą do indukcji SE uznali pożywkę z dodatkiem NAA w stężeniu 2,0 mg · dm⁻³. Zapotrzebowanie na regulatory wzrostu potrzebne do inicjacji somatycznej embriogenezy jest też w dużej mierze określone przez stopień rozwoju eksplantatu.

Regulatorami uznawanymi za szczególnie istotne na etapie inicjacji somatycznej embriogenezy są auksyny – stosowali je w swoich pracach niemal wszyscy badacze zajmujący się tą tematyką. Stymulują one odróżnicowanie w eksplantatach pierwotnych, co powoduje wyzwolenie w komórkach potencjału embriogennego – stają się one kompetentne do przekształcania się w zarodki somatyczne (Bach i wsp. 2000). Do najczęściej stosowanych należy 2,4-D do inicjacji SE w kulturach serduszki okazałej (*Dicentra spectabilis*), pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*) czy psianki ziemniaka (*Solanum tuberosum*) – (Lee i Lee 2003, Mahalakshmi i wsp. 2007, Sharma i wsp. 2007). Równie często do inicjacji nasion somatycznych stosowany jest dodatek do pożywki NAA – wykorzystano go do indukcji tego procesu u ogórka siewnego (*Cucumis sativus*) i rumianku pospolitego (*Matricaria chamomilla* syn. *Chamomilla recucita*) – (Kintzios i Michaelakis 1999, Elmeer i Hennerty 2008). Do rzadziej stosowanych auksyn należą: pikloram stosowany do mnożenia goździka ogrodowego (*Dianthus caryophyllus*) i pomidora drzewiastego (*Cyphomandra betacea*) – (Karami i wsp. 2007, Correia i wsp. 2012) oraz dicamba stosowana w przypadku lilii długokwiatowej (*Lilium longiflorum*) – (Tribulato 1997). Za najslabiej działającą auksynę w odniesieniu do omawianej cechy uważa się IAA, wykorzystywaną do pobudzenia formowania zarodków somatycznych

w kulturach floksa wiechowatego (*Phlox paniculata*), słonecznika zwyczajnego (*Heliantus annuus*) czy *Acacia mangium* (Xie i Hong 2001, Jain i wsp. 2002, Thomas i wsp. 2002).

Do pożywek, na etapie inicjacji somatycznej embriogenezy, dodawane są też (choć rzadziej niż auksyny) cytokiny: głównie BAP (Kumar i wsp. 2008c), czasami również TDZ (Gairi i Rashid 2004, Joshi i wsp. 2008) i kinetyna (El Abidine i wsp. 2008). Z badań wynika również, że dodatek do pożywki regulatorów wzrostu nowej generacji, takich jak: jasmony (Ruduś i wsp. 2001, 2006), poliaminy (Monteiro i wsp. 2002, de la Pena i wsp. 2008, Wu i wsp. 2009) czy brasinosteroidy (Aydin i wsp. 2006, Albrecht i wsp. 2008) sprzyja inicjacji somatycznej embriogenezy u niektórych gatunków roślin.

Po wprowadzeniu komórek w stan kompetencji i nadaniu im charakteru embriogenicznego dalsze prowadzenie kultur na pożywkach z dodatkiem auksyn jest niekorzystne (Wróblewski 1994). Auksyna, której obecność w pożywce jest niezbędna do namnażania masy embriogenicznej i indukowania somatycznej embriogenezy, jest równocześnie inhibitorem dalszego rozwoju zarodków somatycznych (de Vries i wsp. 1988, Nomura i Komamine, 1995, Filonova i wsp. 2000). Dlatego też w większości przypadków powstające zarodki będące we wczesnych etapach rozwojowych, zwykle stadium globularnym, muszą być przeniesione na pożywkę o odmiennym składzie, pozbawione auksyn (Zimmerman 1993).

Zarodki somatyczne nie mogą być przeniesione na nowe pożywki zanim nie osiągną odpowiedniego stadium rozwojowego. Dojrzewanie zarodków zygocytynych kończy się na ogół zwolnieniem tempa ich metabolizmu. Następuje redukcja wody z tkanek zarodka, który przechodzi w stan nieaktywny metabolicznie. Podczas stadium dojrzewania zarodki somatyczne gromadzą takie same substancje zapasowe jak zarodki zygocytynne oraz ulegają podobnym zmianom morfologicznym i biochemicznym (Merkele i wsp. 1995, Yeung 1995). Etap ten w kulturach *in vitro* indukowany jest pod wpływem niskiego potencjału osmotycznego w pożywce, zarówno u roślin okrytonasiennych (McKersie i Brown 1996), jak i nagona-siennych (Attree i Fowke 1993). Potencjał ten naśladuje stres wodny naturalnie występujący w klasycznych nasionach podczas późniejszych stadiów dojrzewania. To pozwala zarodkom na przeżycie odwodnienia, kiedy wilgotność może zostać zmniejszona poniżej 5%. Niski potencjał osmotyczny pożywki w warunkach kultur *in vitro* może spowodować dodatek różnych substancji, między innymi są to: cukry, glikol polietylenowy i dekstrany (Bozhkov i wsp. 1998). Jednym z często stosowanych tego typu zabiegów jest dodatek do pożywek aminokwasów, w tym hydrolizatu kazeiny. W przypadku niektórych gatunków w celu pobudzenia zarodków do dojrzewania konieczne jest potraktowanie embriogenicznej kultury ABA, zazwyczaj w stężeniu 10–50 μM (Dodeman i wsp. 1997).

Na dojrzewanie zarodków somatycznych mają także wpływ cytokiny. W przypadku rumianku pospolitego oraz szparaga lekarskiego najlepsza okazała się pożywka z dodatkiem kinetyny i NAA (Kintzios i Michaelakis 1999, Raimondi i wsp. 2001). Natomiast u goryczki wąskolistnej najkorzystniejszy wpływ na dojrzewanie zarodków miał dodatek do pożywki kombinacji PIK lub 2,4-D i BAP, zaś ich kiełkowanie było możliwe na pożywce pozbawionej regulatorów wzrostu lub zawierającej niewielki dodatek BAP (Bach i Pawłowska 2003).

Zawartość regulatorów wzrostu, optymalnych do indukowania zarodków somatycznych oraz ich późniejszego rozwoju w kulturach chryzantemy, jest jak dotąd słabo określona. Opublikowano jedynie nieliczne prace mówiące o bezpośredniej somatycznej embriogenezie. Tkankami roślinnymi, które pobudzano do formowania zarodków somatycznych, były jedynie fragmenty blaszek liściowych rosnących w warunkach szklarniowych lub *in vitro* lub fragmenty kwiatostanów. May i Trigiano (1991) indukowali somatyczną embriogenezę chryzantemy, wykładając fragmenty liści z roślin rosnących w warunkach *in vivo* na pożywkę z dodatkiem $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D i $0,2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP oraz zróżnicowaną zawartość sacharozy (od 3 do 18%). Kultury prowadzone były w zróżnicowanych warunkach świetlnych. Stwierdzono znaczne różnice w reakcji na zastosowane warunki indukowania somatycznej embriogenezy pomiędzy badanymi odmianami – tylko eksplantaty 12 z 23 ocenianych odmian wykształciło nieliczne zarodki somatyczne, a kompletne sadzonki zostały uzyskane w przypadku pięciu odmian.

Fragmenty blaszek liściowych, pobrane jednak z chryzantem wielkokwiatowych rosnących w warunkach *in vitro*, wykladały w swojej pracy na pożywki z dodatkiem cytokinin: BAP i kinetyny połączonych z 2,4-D Lema-Rumińska (2007) oraz Lema-Rumińska i Śliwińska (2009). Za najkorzystniejszą do indukcji somatycznej embriogenezy uznały one uzupełnienie pożywek kombinacją $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D i $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ KIN. Tanaka i wsp. (2000) inicjowali somatyczną embriogenezę, wykładając fragmenty kwiatostanów – kwiaty jęczyczkowate oraz młode liście na pożywki uzupełnione IAA, IBA, NAA, kinetyną, TDZ i BAP. Formowanie się zarodków obserwowali oni w przypadku obu zastosowanych w doświadczeniu eksplantatów pierwotnych. Mandal i Datta (2005) również indukowali somatyczną embriogenezę u tego gatunku, wykładając na pożywki kwiaty jęczyczkowate. Pavingerová i wsp. (1994) indukowali somatyczną embriogenezę u chryzantem, traktując ją jako metodę regeneracji tkanek transformowanych genetycznie. Procedura indukcji zarodków była nietypowa i obejmowała wytrząsanie przez 24 godziny liści w pożywce zawierającej 2,4-D, kinetynę, BAP, 2iP oraz GA_3 w temperaturze 28°C . Doprowadzono w ten sposób do formowania się zarodków somatycznych, z których jednak część wykazywała różnorodne aberracje rozwojowe.

2.5. Rola poliamin w przebiegu SE

Poliaminy, głównie spermidyna (SPMD), spermina (SPM) i ich prekursor putrescyna (PUT), są drobnocząsteczkowymi aminami alifatycznymi, które powszechnie występują w roślinach wyższych (Jankiewicz 1997). Mimo że nie poznano jeszcze dokładnego mechanizmu działania poliamin, wiemy że biorą one udział w takich procesach fizjologicznych jak: podziały komórkowe, indukcja kwitnienia i rozwój owoców czy metabolizm wtórny (Smith 1985, Bajaj i Rajam 1995, Bais i Ravishankar 2002, Kuznetsov i wsp. 2006, Liu i Moriguchi 2007, Kusano i wsp. 2007). Od dawna wiadomo również, że endogenne poliaminy są związane z odpornością roślin na różnego rodzaju stresy biotyczne oraz abiotyczne stresy środowiskowe, takie jak stres osmotyczny (Aziz i wsp. 1997), zasolenie podłoża (Aziz i wsp.

1999), jego zakwaszenie (Shen i wsp. 1994), obecność metali ciężkich (Groppa i wsp. 2001, 2003, Groppa i Benavides 2008) oraz promieniowanie UV (Kramer i wsp. 1992). Poliaminy są również przeciwutleniaczami chroniącymi błony komórkowe, kwasy nukleinowe i wielonienasycone kwasy tłuszczowe przed uszkodzeniami oksydacyjnymi (Lovaas 1991).

Dodatni wpływ poliamin na rozwój roślin obserwowano również w kulturach *in vitro*. Stwierdzono, że poziom endogennych poliamin zarówno sperminy i spermidyny, jak i ich prekursora putrescyny, istotnie wzrasta w czasie pierwszych 14 dni od inicjacji kultur kalusowych (Liu i Moriguchi 2007). Poziom endogennych poliamin został uznany za marker biochemiczny kompetencji do morfogenezy (Shoeb i wsp. 2001). Jak wynika z badań Aribaud i wsp. (1999) i Paul i wsp. (2009), jeżeli w tkance kalusowej obserwowano niski, stabilny poziom poliamin, bez nagłego zwiększenia się ich poziomu, to nie obserwowano różnicowania się komórek ani organogenezy.

Również dodatek egzogennych poliamin do pożywki działał korzystnie – indukował tworzenie się tkanki kalusowej i somatyczną embriogenezę w kulturach marchwi jadalnej (*Daucus carota*) – (Bradley i wsp. 1984, Takeda i wsp. 2002), drzewa kakowego (*Theobroma cacao*) – (Silva i wsp. 2009), bawełny kosmatej (*Gossypium hirsutum*) – (Sakhanokho i wsp. 2005), żeńszenia właściwego (*Panax ginseng*) – (Kevers i wsp. 2000, Monteiro i wsp. 2002) czy igławy brazylijskiej (*Araucaria angustifolia*) – (Silveira i wsp. 2006, Steiner i wsp. 2007). Zauważono jednocześnie, że zapotrzebowanie na poliaminy zmienia się podczas trwania procesu – ich nadmierna koncentracja w tkankach na etapie dojrzewania zarodków somatycznych może hamować przebieg procesu.

Wpływ poliamin na kaulogenezę i indukcję somatycznej embriogenezy jest jednak w dużej mierze uwarunkowany genetycznie. W przypadku niektórych gatunków bardziej istotny od zawartości poliamin jest stosunek putrescyny do spermidyny lub sperminy. W badaniach nad somatyczną embriogenezą ryżu siewnego (*Oryza sativa*) stwierdzono, że największą liczbę zarodków somatycznych w kulturach owsa obserwowano gdy stosunek putrescyny do spermidyny był jak 2 : 3 (Shoeb i wsp. 2001).

2.6. Wpływ światła na prowadzenie kultur *in vitro*

Standardowo w kulturach *in vitro* stosowane jest doświetlanie substytucyjne przez 16 godzin światłem fluorescencyjnym białym (*cool white*) o natężeniu $40\text{--}50 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$ lub kombinacją lamp LED o podobnym natężeniu (Kurilčik i wsp. 2008). Mimo że światło jest jednym z głównych czynników wpływających na morfogenezę i organogenezę w kulturach *in vitro*, temat ten jest jak dotąd słabo zbadany. Prowadzone badania ograniczają się zwykle jedynie do określenia wpływu ciemności lub zmiany długości czasu doświetlania kultur na rozwój roślin, jak w przypadku drzewoporca 'Second Love' (*Dendrobium sp.*) – (Ferreira i wsp. 2011), psianki ziemniaka (*Solanum tuberosum*) – (Pruski i wsp. 2001), *Huernia hystrix* (Amoo i wsp. 2009) czy eukaliptusa gałkowego (*Eucalyptus grandis*) – (Lainé i David 1993).

Doniesienia dotyczące wpływu doświetlania substytucyjnego kultur lub jego braku na indukcję zarodków somatycznych są często sprzeczne. Jak podaje Sato-Nara i wsp. (2004), światło nie jest zwykle niezbędne w czasie indukcji somatycznej embriogenezy i pierwszych etapów rozwojowych zarodków marchwi zwyczajnej (*Daucus carota*). W późniejszych etapach rozwojowych światło stymuluje produkcję białek związanych z fotosyntezą i jest skorelowane z kiełkowaniem kultur i zazielenieniem się zarodków somatycznych. Z badań Gaj (2004) wynika, że przetrzymywanie eksplantatów rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) w ciemności powoduje zwiększenie się częstości powstawania zarodków somatycznych. Natomiast z badań de la Pena i wsp. (2008) wynika, że wszystkie eksplantaty kawy kongijskiej (*Coffea canephora*), niezależnie od warunków świetlnych, wykształciły zarodki somatyczne, jednak ich liczebność spadła istotnie w przypadku kultur prowadzonych w ciemności. Jak podają Biswas i wsp. (2007), doświetlanie tkanki kalusowej poziomki truskawki (*Fragaria x ananassa*) powodowało istotne zmniejszenie się liczby powstających zarodków somatycznych, aż do niemal całkowitego zahamowania tego procesu w przypadku kultur doświetlanych światłem ciągłym. Niekorzystnie działa również doświetlanie światłem ciągłym na tworzenie się zarodków somatycznych fenkuła włoskiego (*Foeniculum vulgare*) – (Hunault i Maatar 1995). Natomiast z badań Raj Bhansali i wsp. (1990) wynika, że przetrzymywanie kalusa przez 20 dni w ciemności, a następnie wystawienie na ciągłe działanie światła, indukuje somatyczną embriogenezę w kulturach brzoskwiń zwyczajnych.

Mimo że istnieją doniesienia mówiące, że zastosowanie doświetlania substytucyjnego o odpowiedniej długości fali elektromagnetycznej (barwie światła) może znacznie zwiększyć intensywność mikrorozmnażania czy też wpłynąć na indukcję kultur kalusowych i możliwość pozyskiwania zarodków somatycznych, to temat ten jest nadal słabo poznany. Stwierdzono, że barwa światła wpływa na zmianę liczby pędów kątowych i przybyszowych sałaty głowiastej (*Lactuca sativa* var. *capitata*) – (Kadkade i Seibert 1977), pigwy pospolitej (*Cydonia oblonga*) – (D'Onofrio i wsp. 1998) czy mieszańców topoli białej i berlińskiej (*Populus alba* x *Populus berolinensis*) – (Wang i wsp. 2005), zmianę długości pędów chryzantemy wielokwiatowej i *Zantedeschia albomaculata* – (Latkowska i Chmiel 1996, Chang i wsp. 2003), indukcję kultur kalusowych czy masę namnożonej tkanki kalusowej świerka pospolitego (*Picea abies*) i dziurawca zwyczajnego (*Hypericum perforatum*) – (Latkowska i wsp. 2000, Pretto i Santarem 2000).

Doświetlanie substytucyjne światłem w zakresie dalekiej czerwieni, stosowanym łącznie z niebieskim, było najkorzystniejsze do namnażania pędów azoryny Vidala (*Azorina vidalii*) – (Moreira da Silva i Debergh 1997). Doświetlanie światłem o różnej barwie wpływało też istotnie na liczbę wykształcanych pędów bocznych sałaty głowiastej – światło czerwone i białe stymulowało ich przyrost, niebieskie ograniczało liczebność tworzących się pędów przybyszowych (Hunter i Burritt 2005). Również Heo i wsp. (2006) stwierdzili niekorzystny wpływ doświetlania substytucyjnego kultur winorośli właściwej (*Vitis vinifera*) światłem niebieskim na masę pędów oraz całych roślin namnażanych w kulturach *in vitro*.

Jeszcze słabiej poznany jest wpływ barwy światła na przebieg SE. Kvaalen i Appelgren (1999) oraz Latkowska i wsp. (2000) badali wpływ doświetlenia różnymi rodzajami światła na namnażanie się embriogenego kalusa i konwersję zarodków somatycznych świerka pospolitego. Stwierdzili oni, że światło niebieskie hamuje zarówno namnażanie tkanki embriogennej, jak i kiełkowanie zarodków somatycznych, zaś czerwone i daleka czerwień stymulują oba procesy. Negatywnie działało również doświetlanie standardowo stosowanymi w kulturach *in vitro* lampami Flora i fluorescencyjnymi, emitującymi światło białe.

W przypadku chryzantemy wielkokwiatowej doniesienia mówiące o wpływie doświetlenia substytucyjnego w trakcie prowadzenia kultur *in vitro* są naprawdą nieliczne. Latkowska i Chmiel (1996) badali wpływ światła o różnej długości na namnażanie się pędów chryzantem i ich ukorzenianie się w kulturach *in vitro*. Stwierdzili oni istotny wpływ barwy światła na rozwój roślin – światło czerwone wpływało korzystnie na wydłużanie się pędów badanej odmiany 'Escort', zaś światło niebieskie działało przeciwnie. Badania nad wpływem fotoperiodu na indukcję somatycznej embriogenezy prowadzili May i Trigiano (1991). Uznali oni, że fotoperiod jest czynnikiem decydującym o powodzeniu procesu somatycznej embriogenezy u tego gatunku rośliny.

2.7. Zmienność somaklonalna regeneratów

Odkąd prowadzone są kultury *in vitro* w populacji regeneratów obserwowane są zmiany ich cech morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych. Jak podają Larkin i Scowcroft (1981), zmienność somaklonalna to zmiany genetyczne powstałe w komórkach somatycznych rozmnażanych wegetatywnie. Termin ten określa zmiany stabilne, które przenoszone są na następne pokolenia na drodze rozmnażania płciowego (Preil 1986, Lee i Phillips 1988, Karp 1991, 1995). Zmienność somaklonalna charakteryzuje się nieprzewidywalnością powstających zmian. Niestety, wiele z nich jest niepożądanych (Bregitzer i Poulson 1995, Bregitzer i wsp. 1995, Jain 2001) lub znacznie obniża wartość użytkową regeneratów i ich potomstwa (Damiani i wsp. 1990, Gaj i wsp. 1994, Rakoczy-Trojanowska 1999). Dlatego też tak ważne jest kontrolowanie i wczesne wykrywanie zmienności somaklonalnej. W przypadku roślin ozdobnych mogą to być zmiany koloru i wielkości kwiatostanów (Khalid i wsp. 1989), zmiany kształtu, wielkości liści i ich przebarwienia, wolniejsze lub szybsze tempo wzrostu (Ahloowalia 1986, Ahmed i wsp. 2004), zdolność do ukorzeniania i zawiązywania pąków kwiatostanowych a także szybkość tworzenia pędów kwiatostanowych (Votruba i Kodyteck 1988, de Klerk 1990, Jain i de Klerk 1998, Rani i Raina 2000).

Głównymi czynnikami mającymi wpływ na wystąpienie zmienności somaklonalnej podczas rozmnażania roślin w kulturach *in vitro* jest metoda prowadzenia kultur, a zwłaszcza przejście przez fazę niestabilnej genetycznie kultury kalusowej (Skirvin 1978, Bouman i de Klerk 2001, Skucińska 2001) oraz powiązana z indukcją kultur kalusowych konieczność zastosowania wysokich stężeń egzogennych regulatorów wzrostu (Bouman i de Klerk 2001, Mohanty i wsp. 2008). Dodatek do pożywki od 15 do 30 mg · dm⁻³ BAP, przy standardowo

stosowanym od 0,5 do 5 mg · dm⁻³, spowodował wystąpienie zmian genetycznych w kulturach banana właściwego (*Musa paradisiaca*) i ryżu siewnego (Oono 1985, Gimenez i wsp. 2001). Podobny wpływ na tkanki roślin może mieć również wysoki poziom auksyn, stosowanych standardowo do indukcji tkanki kalusowej, jak to wystąpiło w przypadku kultur poziomych i truskawki (Nehra i wsp. 1992), soi zwyczajnej (*Glycine max*) – (Gesteira i wsp. 2002) czy bawełny kosmatej (Jin i wsp. 2008). Zmienność nie dotyczy jednak tylko roślin czy tkanek uzyskanych poprzez kultury kalusowe – wysoką zmiennością mogą się również charakteryzować somaklony uzyskane przez prowadzenie kultur pędowych na pożywkach o niskim poziomie regulatorów wzrostu lub też bez ich dodatku (Konan i wsp. 2009).

Zmiennością somaklonalną mogą charakteryzować się również rośliny zregenerowane w procesie somatycznej embriogenezy (Martins i wsp. 2004, Lopes i wsp. 2009, Anwar i wsp. 2010, Prado i wsp. 2010). May i Trigiano (1991) obserwowali liczne aberracje rozwojowe w populacji otrzymanych przez nich zarodków somatycznych chryzantemy, jednak nie udowodnili oni czy obserwowana zmienność ma charakter dziedziczny, czy też związana była z niewłaściwymi warunkami środowiskowymi, panującymi w trakcie powstawania zarodków.

Poziom obserwowanej zmienności skorelowany jest zwykle z długością okresu prowadzenia kultury oraz liczbą przeprowadzonych pasażi (Bairu i wsp. 2006, Etienne i Bertrand 2003). Jest to szczególnie istotne szczególnie w przypadku kultur zawieszinowych i kalusowych, w których poziom obserwowanej zmienności jest najwyższy. W przeciwieństwie do wyżej wymienionych przykładów występowania zmienności somaklonalnej w wyniku długiego okresu prowadzenia kultur, można przytoczyć badania Smykal i wsp. (2011), którzy prowadząc kultury pędowe grochu zwyczajnego (*Pisum sativum*) przez długi okres (24 lata) nie stwierdzili wystąpienia zmienności somaklonalnej w populacji namnożonych roślin. Jak podają Martins i wsp. (2004), pędy śliwy migdała (*Prunus dulcis* syn. *Amygdalus communis*) nawet po czterech i sześciu latach namnażania ich w kulturach *in vitro* charakteryzowały się stabilnością genetyczną. Podobne obserwacje poczynili Ryyanen i Aronen (2005), namnażając przez 70 miesięcy pędy brzozy brodawkowatej (*Betula pendula*).

Istotny wpływ na wystąpienie zmienności mają również warunki fizyczne prowadzenia kultury, takie jak temperatura, intensywność oświetlenia czy nawet rodzaj zamknięcia naczynia hodowlanego, który wpływa na gromadzenie się etylenu. Zmienność somaklonalną powstałą w wyniku prowadzenia kultur chryzantemy wielkokwiatowej w zróżnicowanych warunkach badali Martin i wsp. (2002). Powstałą zmienność określali oni metodą RAPD, a badania prowadzili na czterech odmianach chryzantemy. Zastosowanymi czynnikami w doświadczeniu było podwyższenie temperatury do 35°C, w której prowadzone były kultury, zastosowanie pożywki o zmniejszonej do 1/8 zawartości składników mineralnych czy też stosowanie innego rodzaju zamknięcia słoików, w których prowadzone były kultury. Na podstawie badań stwierdzili oni, że badane odmiany różniły się znacznie w reakcji na zastosowane czynniki – częstość osobników różniących się wzorem prążkowym od rośliny matecznej, w zależności od badanej odmiany, wahała się od 0 do 81%, a częstość występujących zmian była najwyższa w przypadku roślin regenerowanych w warunkach podwyższonej temperatury.

Wydaje się, że zjawisko zmienności somaklonalnej jest w ogromnym stopniu wynikiem współdziałania warunków prowadzenia kultury i genotypu rośliny matecznej oraz rodzaju tkanki inicjalnej wybranej do założenia kultur (Israeli i wsp. 1991, Kawiak i Łojkowska 2004). Jej wystąpienie jest najprawdopodobniej związane z uwarunkowaną genetycznie odpornością roślin na stres, stąd należy dobrać metody rozmnażania do danego genotypu i uważnie testować możliwości pojawienia się zmienności. Pierwsze sposoby oceny zmienności opierały się tylko na ocenach fenotypowych ilościowych i jakościowych (Saxena i wsp. 2000, Cote i wsp. 2001), jednak obserwacja cech morfologicznych często nie pozwala na wykrycie zmienności lub też wykrywana jest ona w późnych stadiach rozwojowych roślin.

Zmienność (bądź jednorodność) genetyczną obecnie oznacza się metodą cytometrii przepływowej (Śliwińska i Łukaszewska 2005, Śliwińska i Thiem 2007, Makowczyńska i wsp. 2008, Lema-Rumińska i Śliwińska 2009, Fiuk i wsp. 2010, Lema-Rumińska 2011) lub wykorzystując markery molekularne oparte na reakcji PCR. Najczęściej stosowane systemy markerowe DNA wykorzystywane w tym celu to RAPD (Yadav i wsp. 2006, Palombi i wsp. 2007, Jin i wsp. 2008, Elmeer i wsp. 2009, Mahmood i wsp. 2010), AFLP (Carolan i wsp. 2002) i SSR (Marum i wsp. 2009, Rodriguez-López i wsp. 2004). Niestety, metody te charakteryzują się wieloma ograniczeniami: niskim poziomem powielania przez RAPD, wysokim kosztem analizy w AFLP i koniecznością posiadania wiedzy na temat flankujących sekwencji w przypadku polimorfizmu SSR.

Metodą coraz częściej wykorzystywaną do określenia poziomu polimorfizmu badanych roślin jest metoda ISSR-PCR. Jest ona szybka i łatwa do wykonania, nie wymaga znajomości specyficznych sekwencji DNA, a ze względu na wysoką powtarzalność stosowana jest obecnie częściej niż metoda RAPD. W metodzie tej stosuje się jeden starter, na który składa się sekwencja powtórzona z nukleotydami selekcyjnymi, na końcu 3', które warunkują przyłączanie startera do miejsca styku mikrosatelity z unikatowym DNA (Zietkiewicz i wsp. 1994, Masojć 2001). Wykorzystano ją z powodzeniem do określenia zmienności somaklonalnej w kulturach kapusty warzywnej podgatunek kalafior (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) – (Leroy i wsp. 2001), herbaty chińskiej (*Camellia sinensis*) – (Thomas i wsp. 2006), banana właściwego (Ray i wsp. 2005, Lakshmanan i wsp. 2007), ryżu siewnego – (Ngezahayo i wsp. 2007), lili orientalnej (*Lilium orientalis*) – (Liu i Yang 2012), simondsji kalifornijskiej (*Simmondsia chinensis*) – (Kumar i wsp. 2011) czy tulipana ogrodowego (*Tulipa gesneriana*) – (Podwyszyńska i wsp. 2010).

3. Materiał i metody badań

Badania przeprowadzono w latach 2003–2009 w Laboratorium Kultur *in vitro*, Katedry Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin w Zachodniopomorskim Uniwersytecie Technologicznym w Szczecinie oraz w Botanicznym Centrum Badawczym w Przelewicach. Materiałem badawczym była chryzantema wielkokwiatowa (*Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat.) Kitam. syn. *Dendranthema x grandiflora* (Ramat.) Kitam.) odmiany 'Erica'. Przed założeniem kultury wykluczono chimeryczność tkanek wybranej do badań rośliny, oceniając jednorodność genetyczną metodą ISSR-PCR.

Założenie kultur aksenicznych

Do założenia sterylnych kultur wykorzystano jednowęzłowe fragmenty pędów, odkażane przez moczenie przez 30 sekund w 70-procentowym roztworze etanolu, a następnie przez 2 minuty w 0,1-procentowym roztworze HgCl_2 . Odkażone pędy płukano 3-krotnie w sterylnej wodzie destylowanej. Fragmenty pędów wykładano na pożywki inicjujące o składzie według Murashige'a i Skooga (1962) – MS, z dodatkiem $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ kinetyny i $0,02 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ IBA. Zainicjowane do wzrostu eksplantaty przekładano na pożywki MS, bez dodatku regulatorów wzrostu w celu ich namnożenia. Rośliny sukcesywnie przekładane na tę właśnie pożywkę stanowiły populację wyjściową do założenia kultur. Z eksplantatów wyłożonych na pożywki pobierano fragmenty i wykładano je na pożywkę Leifert and Weisers Sterylity Test Medium (Duchefa Biochemie) w celu sprawdzenia ich sterylności.

Na wszystkich etapach badań, o ile nie zaznaczono inaczej, pH pożywek ustalano na 5,7, 0,1 M roztworami NaOH i HCl. Wartość pH ustalano po dodaniu regulatorów wzrostu, ale przed ich autoklawowaniem. Następnie do roztworów dodawano $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy, $7 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ agaru i $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ inozytoli, podgrzewano i rozlewano po 30 ml do słoików o objętości 300 ml. Słoiki z pożywkami autoklawowano w temperaturze 121°C przez 20 minut. Kultury umieszczano w pokoju wzrostowym, o temperaturze $24 \pm 1^\circ\text{C}$ i doświetlano je przez 16 godzin na dobę białym światłem fluorescencyjnym, o natężeniu napromienienia kwantowego wynoszącym $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.1. Inicjacja kultur kalusowych

W pierwszym etapie badań określono wpływ wybranych czynników na inicjację tkanki kalusowej. W doświadczeniu tym na pożywki MS wykładano eksplantaty, którymi były fragmenty blaszek liściowych, pozbawione brzegów, o wymiarach $1 \times 1 \text{ cm}$, pobrane z roślin rosnących w kulturach *in vitro*, na pożywce MS. Eksplantaty nakłuwano kilkakrotnie końcówką skalpela, układano płasko dociskając stroną abaksjalną do pożywki. O ile nie zaznaczono inaczej, kultury doświetlano przez 16 godzin na dobę białym światłem fluorescencyjnym.

Doświadczenie założono w trzech powtórzeniach, na każdy rodzaj pożywki w powtórzeniu wykładano po 50 eksplantatów. Po sześciu tygodniach od założenia kultury przeprowadzono obserwacje, określając częstość eksplantatów, w przypadku których obserwowano wykształcanie się tkanki kalusowej oraz jej masę.

Badania na tym etapie podzielono na cztery części, w których określono:

Wpływ zawartości auksyn w pożywce na inicjację tkanki kalusowej

W doświadczeniu eksplantaty wykładano na pożywkę MS wzbogaconą o auksyny: 2,4-D, IAA, IBA, NAA, pikloram i dicambę, stosowane w stężeniu 0,5, 1, 2 i 4 mg · dm⁻³.

Wpływ dodatku do pożywki auksyn i BAP na inicjację tkanki kalusowej

Zbadano reakcję fragmentów blaszek liściowych na jednoczesne zastosowanie auksyn wpływających najkorzystniej na inicjację tkanki kalusowej w poprzednim doświadczeniu: NAA, pikloramu i dicamby, stosowanych samodzielnie lub łącznie z cytokiną BAP w stężeniu 4 mg · dm⁻³. Auksyny dodawano do pożywki w ilości 1, 2, 3 i 4 mg · dm⁻³.

Wpływ poliamin oraz warunków świetlnych prowadzenia kultury na inicjację tkanki kalusowej

Eksplantaty wykładano na pożywki uzupełnione poliaminami: putrescyną, spermidyną i sperminą, stosowanych w stężeniach: 0,5, 1, 2 i 5 mg · dm⁻³. Stosowano je samodzielnie oraz z kombinacją 4 mg · dm⁻³ NAA i BAP, uznaną za najkorzystniej wpływającą na kształtowanie się masy tkanki kalusowej w poprzednim doświadczeniu. Połowa z założonych kultur przez 16 godzin na dobę doświetlana była substytucyjnie białym światłem fluorescencyjnym, o natężeniu napromienienia kwantowego wynoszącym 40 μmol · m⁻² · s⁻¹, druga połowa prowadzona była w ciemności.

Wpływ barwy światła na inicjację tkanki kalusowej

W ostatnim doświadczeniu przeprowadzonym na tym etapie badań eksplantaty wykładano na pożywkę uznaną za najlepszą do indukcji kultur kalusowych w poprzednim doświadczeniu – MS z dodatkiem 4 mg · dm⁻³ NAA i BAP oraz 5 mg · dm⁻³ spermidyny. Słoiki z kulturami doświetlano substytucyjnie lampami TLD Philips 36 W o świetle białym (39–760 nm), czerwonym (247–760 nm), żółtym (550–588 nm), niebieskim (450–492 nm) i światłem mieszanym białym i czerwonym w stosunku 2 : 1 oraz prowadzono bez dostępu światła.

3.2. Namnażanie tkanki kalusowej na pożywkach stałych

W kolejnym etapie badań określono wpływ zawartości w pożywce regulatorów wzrostu (auksyn, BAP i poliamin) oraz warunków świetlnych prowadzenia kultury na namnażanie się tkanki kalusowej. W tym etapie na pożywki wykładano fragmenty tkanki kalusowej o masie około 0,1 g i średnicy około 2–3 mm. Doświadczenie założono w trzech powtórzeniach, w każdym po 250 fragmentów na jednym rodzaju pożywki. Po czterech tygodniach od założenia doświadczenia określono masę namnożonej tkanki kalusowej (g) oraz jej zabarwienie

i strukturę. Podobnie jak w poprzednim doświadczeniu, o ile nie zaznaczono inaczej, kultury doświetlano przez 16 godzin na dobę białym światłem.

W trakcie tego etapu badań założono pięć doświadczeń i określono:

Wpływ zawartości auksyn i BAP w pożywce na namnażanie się tkanki kalusowej

Fragmety tkanki kalusowej wykładano na pożywki MS uzupełnione $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ auksyn: 2,4-D, IAA, IBA, NAA, PIK i DIC stosowanymi łącznie z $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP. Pożywka MS bez dodatku regulatorów wzrostu była pożywką kontrolną.

Wpływ stężenia NAA i BAP w pożywce na namnażanie się tkanki kalusowej

Fragmety tkanki kalusowej wykładano na pożywki uzupełnione auksyną NAA o zróżnicowanych stężeniach (1, 2, 3, 4 i $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), której dodatek do pożywki spowodował, że namnażanie tkanki kalusowej zachodziło najintensywniej w poprzednim doświadczeniu. Stosowano ją łącznie z BAP w stężeniu 1, 2, 3, 4 i $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Wpływ dodatku do pożywki NAA, BAP i poliamin oraz warunków świetlnych prowadzenia kultury na namnażanie się tkanki kalusowej

Fragmety tkanki kalusowej wykładano na pożywkę, na której kalus namnażał się najintensywniej i charakteryzował się odpowiednią strukturą w poprzednim etapie badań ($3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP i $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA) z dodatkiem 1 i $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ putrescyny, sperminy i spermidyny. Połowa z założonych kultur doświetlana była przez 16 godzin światłem białym o natężeniu napromienienia kwantowego wynoszącym $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, druga połowa prowadzona była w ciemności.

Wpływ barwy światła na namnażanie się tkanki kalusowej

Fragmety tkanki kalusowej wykładano na pożywkę uznaną za najlepszą do namnażania tkanki kalusowej w poprzednim etapie badań – z dodatkiem $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP oraz $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ spermidyny i doświetlano światłem o różnej barwie – stosowano lampy TLD Philips 36 W o świetle białym, czerwonym, żółtym, niebieskim, mieszanym (światło białe i czerwone w stosunku 2 : 1) oraz prowadzono kultury bez dostępu światła.

Wpływ barwy światła stosowanego przez sześć miesięcy na namnażanie się tkanki kalusowej

Fragmety kalusa wykładano na pożywkę uznaną za najlepszą do namnażania kalusa chryzantemy (MS + $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA + $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP). Słoiki z założonymi kulturami umieszczano w warunkach identycznych jak w poprzednim doświadczeniu, czyli na półkach doświetlanych substytucyjnie lampami TLD Philips 36 W o świetle białym, czerwonym, żółtym i niebieskim oraz prowadzono bez dostępu światła. Co cztery tygodnie namnożoną tkankę kalusową dzielono na fragmenty i ponownie umieszczano na pożywkach w warunkach świetlnych identycznych jak w poprzednim pasażu. Kultury zakładano w sumie 6-krotnie, za każdym razem powtarzając powyższy schemat zakładania doświadczenia.

3.3. Namnażanie tkanki kalusowej na pożywkach płynnych

Wpływ składu mineralnego pożywki na namnażanie się tkanki kalusowej

Kultury zawiesinowe założono umieszczając 6 g rozdrobnionej tkanki kalusowej w kolbie stożkowej o pojemności 100 ml, zawierającej 20 ml pożywki MS z dodatkiem $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP, $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy. Co 10 dni powstałą w ten sposób zawiesinę dopełniano 10 ml świeżej pożywki. Po sześciu tygodniach prowadzenia kultury zawiesinę przeniesiono do kolby stożkowej o pojemności 200 ml i pasażowano cyklicznie co 14 dni, przez trzy miesiące. Kultury ustawiono w pokoju wzrostowym, w temperaturze $24 \pm 1^\circ\text{C}$, oświetlając przez 16 godzin światłem białym o natężeniu napromienienia kwantowego wynoszącego $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ i wytrząsano z intensywnością 120 obrotów na sekundę.

Następnie założoną kulturę przenoszono do bioreaktora Bioflo 110 firmy New Brunswick Scientific (fot. 1). Bioreaktor o objętości 5 dm^3 zawierał 2 dm^3 pożywki MS, LS i B5. Kulturę zakładano również na zmodyfikowanych pożywkach MS, uzupełniając je NH_4Cl oraz zmniejszając zawartość KNO_3 w taki sposób, aby stosunek jonów NH_4^+ do NO_3^- miał się jak 20 : 40 (kontrola, MS bez modyfikacji), 20 : 20 i 40 : 20.

Pożywki uzupełniono $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP i $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA. pH pożywki ustalano na 5,7 roztworami NaOH i HCl. Bioreaktor wraz z pożywką autoklawowano przez 20 minut w temperaturze 121°C .



Fot. 1. Bioreaktor Bioflo 110 w trakcie prowadzenia kultury

Pożywkę mieszano mieszadłem typu śruba okrętowa z prędkością 100 obrotów na minutę. Temperatura prowadzenia kultury ustalona została na $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Doświadczenie trwało 28 dni, a po jego zakończeniu określono zawartość świeżej i suchej masy namnożonego kalusa. Suchą masę kalusa określono przez suszenie namnożonej tkanki kalusowej w temperaturze $105 \pm 2^\circ\text{C}$ przez trzy godziny do uzyskania stałej masy. Każde z doświadczeń powtórzono trzykrotnie.

Co trzy dni pobierano zawiesinę o objętości 20 ml w celu określenia świeżej i suchej masy namnożonej tkanki kalusowej oraz zawartości sacharozy i jonów: PO_4^{3-} , NH_4^+ i NO_3^-

w pożywce. Próby zawirowywano w wirówce przy 10 000 obrotów przez 1 minutę i określano świeżą oraz suchą masę namnożonej tkanki kalusowej przez suszenie jej w temperaturze $105 \pm 2^\circ\text{C}$, przez trzy godziny do uzyskania stałej masy. Wartość namnożonej tkanki kalusowej uzyskano przez różnicę masy określonej po zakończeniu doświadczenia i masy tkanki kalusowej, którą inokulowano bioreaktor.

W pożywce pozostałej po odsączeniu tkanki kalusowej oznaczano zawartość sacharozy metodą polarymetryczną, zawartość azotu amonowego w pożywce metodą bezpośredniej nessleryzacji, zawartość azotu azotanowego metodą kolorymetryczną z salicylanem sodowym oraz fosforanów metodą kolorymetryczną z molibdenianem(VI) amonu. Badania zawartości składników mineralnych w pożywce zlecono Laboratorium Chemicznemu w Botanicznym Centrum Badawczym w Przelewicach.

3.4. Inicjacja somatycznej embriogenezy w kulturach kalusowych

Fragmety tkanki kalusowej o masie około 0,1 g i średnicy 2 mm, namnażanej wcześniej na pożywkach stałych MS z dodatkiem $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP oraz w bioreaktorze na pożywce płynnej, o tym samym składzie wykładano na pożywki w celu inicjacji procesu somatycznej embriogenezy. Doświadczenie prowadzono w trzech powtórzeniach, wykładając w każdym z nich na pożywkę po 100 fragmentów tkanki kalusowej obu typów. O ile nie zaznaczono inaczej, kultury doświetlano przez 16 godzin na dobę białym światłem fluorescencyjnym, o natężeniu napromienienia kwantowego wynoszącym $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Po 12 tygodniach prowadzenia kultury określano procent eksplantatów, w przypadku których obserwowano inicjację zarodków somatycznych oraz ich liczebność.

Na tym etapie badań przeprowadzono sześć doświadczeń, w których określono:

Wpływ zawartości auksyn i BAP w pożywce na indukcję somatycznej embriogenezy w kulturach kalusowych

Fragmety tkanki kalusowej wykładano na pożywki z dodatkiem auksyn – NAA, pikloramu i dicamby (2 i $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) oraz cytokiny BAP (1 , $2,5$ i $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Wpływ zawartości poliamin stosowanych łącznie z NAA i BAP w pożywce na indukcję somatycznej embriogenezy w kulturach kalusowych

Fragmety tkanki kalusowej wykładano na pożywki z dodatkiem poliamin: putrescyny, sperminy i spermidyny, stosowanej łącznie lub w kombinacji z regulatorami wzrostu, które wpływały najkorzystniej na somatyczną embriogenezę w poprzednim etapie rozwoju roślin – $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP.

Wpływ składu mineralnego pożywki na indukcję somatycznej embriogenezy w kulturach kalusowych

Testowano skład mineralny pożywek wykorzystanych do indukcji somatycznej embriogenezy. W doświadczeniu zastosowano MS, SH, B5 oraz modyfikacje tych pożywek, uzupełnianych $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ spermidyny, $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA, w połączeniu z $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP.

Wpływ barwy światła na indukcję somatycznej embriogenezy w kulturach kalusowych

Fragmety tkanki kalusowej wykładano na pożywkę uznaną za najlepszą do indukcji somatycznej embriogenezy w poprzednim etapie badań, czyli MS – z dodatkiem $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP oraz $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ spermidyny i doświetlano przez 16 godzin światłem o różnej barwie – białej, czerwonej, żółtej, niebieskiej i mieszaniną światła białego i czerwonego (w stosunku 2 : 1) oraz prowadzono kultury bez dostępu światła.

Dynamika indukcji zarodków somatycznych

Określono częstość formowania się zarodków somatycznych przez 12 tygodni trwania doświadczenia. Eksplantaty wykładano na pożywkę z dodatkiem $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ spermidyny, $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP i co tydzień, w trakcie obserwacji mikroskopowych, oceniano liczbę pojawiających się zarodków somatycznych. Połowa z wyłożonych eksplantatów pochodziła z kultur prowadzonych przy standardowo stosowanym fotoperiodzie (16 godzin doświetlania, 8 godzin ciemności), druga połowa – z kultur przetrzymywanych przez trzy ostatnie tygodnie przed założeniem doświadczenia w ciemności.

Wpływ przetrzymywania kultur w ciemności na indukcję somatycznej embriogenezy w kulturach kalusowych

Fragmety tkanki kalusowej namnażanej na pożywkę uznanej za najkorzystniejszą do proliferacji tkanki kalusowej, przetrzymywanej na etapie namnażania od 1 do 8 tygodni w ciemności, wykładano na pożywki bez dodatku regulatorów wzrostu, wystawione przez 16 godzin dziennie na działanie światła białego, o najwyższym natężeniu napromienienia kwantowego wynoszącym $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ przez 12 tygodni. Na etapie indukcji somatycznej embriogenezy (po wystawieniu ich na działanie światła) tkankę kalusową przenoszono na pożywkę MS bez dodatku regulatorów wzrostu.

3.5. Inicjacja bezpośredniej somatycznej embriogenezy

Podczas kolejnego etapu badań określono wpływ regulatorów wzrostu (auksyn, BAP i poliamin) na inicjację bezpośredniej somatycznej embriogenezy. Eksplantatami do założenia doświadczenia były fragmenty blaszek liściowych o wymiarach $1 \times 1 \text{ cm}$, pobrane z chryzantem rosnących w kulturach *in vitro*, na pożywkę MS, bez regulatorów wzrostu. Na każdy rodzaj pożywek wykładano po 100 blaszek liściowych w powtórzeniu, a doświadczenie zakładano w trzech powtórzeniach. Po 12 tygodniach od założenia kultury przeprowadzono obserwacje, określając częstość eksplantatów, w przypadku których obserwowano formowanie się zarodków somatycznych i ich liczbę. Wszystkie kultury prowadzono w pokoju wzrostowym, w podanych wcześniej warunkach i, o ile nie zaznaczono inaczej, kultury doświetlano przez 16 godzin na dobę białym światłem fluorescencyjnym, o natężeniu napromienienia kwantowego wynoszącym $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Na tym etapie badań przeprowadzono pięć doświadczeń i określono:

Wpływ auksyn i BAP na indukcję bezpośredniej somatycznej embriogenezy

Określono reakcje eksplantatów, którymi były fragmenty blaszek liściowych, na jednoczesne zastosowanie auksyn: NAA, pikloramu i dicamby z BAP w stężeniu 1, 2 lub 5 mg · dm⁻³. Auksyny dodawano do pożywek w ilości 2 i 4 mg · dm⁻³.

Wpływ poliamin oraz NAA i BAP na indukcję bezpośredniej somatycznej embriogenezy

Określono reakcje fragmentów liści na zastosowanie poliamin: putrescyny, sperminy i spermidyny w połączeniu z 4 mg · dm⁻³ NAA i 2 mg · dm⁻³ BAP. Poliaminy dodawano do pożywki w ilości 1 i 5 mg · dm⁻³.

Wpływ składu mineralnego pożywki na indukcję bezpośredniej somatycznej embriogenezy

Określono reakcje fragmentów roślinnych na skład mineralny pożywki. Eksplantaty wykładano na pożywki SH, B5, MS oraz modyfikacjach pożywki MS: o zawartości makroelementów zmniejszonej o połowę w stosunku do MS, zwiększonej dwukrotnie zawartości NH₄NO₃ lub KNO₃. Pożywki uzupełniano 5 mg · dm⁻³ spermidyny, 4 mg · dm⁻³ NAA i 2 mg · dm⁻³ BAP.

Wpływ barwy światła na indukcję bezpośredniej somatycznej embriogenezy

Eksplantaty liściowe wykładano na pożywkę uzupełnioną 5 mg · dm⁻³ spermidyny, 4 mg · dm⁻³ NAA i 2 mg · dm⁻³ BAP i doświetlano substytucyjnie przez 16 godzin światłem o różnej długości fali elektromagnetycznej – stosowano lampy TLD Philips 36 W o świetle białym, czerwonym, żółtym, niebieskim oraz świetle mieszanym (białym i czerwonym w stosunku 2 : 1) oraz prowadzono kultury bez dostępu światła.

Dynamika indukcji zarodków somatycznych

Na tym etapie badań określono częstość formowania się zarodków somatycznych przez 12 tygodni trwania doświadczenia. Połowa z wyłożonych eksplantatów pochodziła z kultur pędowych prowadzonych przy standardowo stosowanym 16-godzinnym okresie doświetlania, druga połowa – z kultur przetrzymywanych przez trzy ostatnie tygodnie przed założeniem doświadczenia w ciemności. Eksplantaty wykładano na pożywkę z dodatkiem 5 mg · dm⁻³ spermidyny, 4 mg · dm⁻³ NAA, w połączeniu z 2 mg · dm⁻³ BAP i co tydzień, w trakcie obserwacji mikroskopowych, oceniano liczbę pojawiających się zarodków somatycznych.

3.6. Dojrzewanie i konwersja zarodków somatycznych

Na tym etapie badań na pożywki wykładano zarodki somatyczne formujące się na drodze bezpośredniej i pośredniej somatycznej embriogenezy, o długości około 2 mm, będące w stadium torpedy lub zarodka dojrzałego. Na każdą z pożywek wykładano po 50 zarodków, pojedynczo do probówek o pojemności 30 ml. Pożywki przygotowywano i sterylizowano podobnie jak w poprzednich etapach badań. Probówki z założonymi kulturami umieszczano w pokoju wzrostowym, w temperaturze 24°C i, o ile nie zaznaczono inaczej, doświetlano substytucyjnie światłem białym o natężeniu napromienienia kwantowego wyno-

szącym $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ przez 16 godzin. Po sześciu tygodniach określono procentowy udział kiełkujących zarodków somatycznych.

Wpływ składu mineralnego pożywki na konwersję zarodków somatycznych

Zarodki somatyczne zainicjowane na drodze bezpośredniej oraz pośredniej embriogenezy, o długości około 2 mm, wykładano na pożywkę regeneracyjną MS oraz modyfikacje tej pożywki: pożywkę o zmniejszonej o połowę zawartości wszystkich makroelementów oraz o zmniejszonej o połowę zawartości NH_4NO_3 i KNO_3 .

Wpływ węglowodanów na konwersję zarodków somatycznych

Podobnie jak w poprzednim doświadczeniu zarodki somatyczne otrzymane na drodze bezpośredniej i pośredniej somatycznej embriogenezy wykładano na pożywki MS o zmniejszonej o połowę zawartości makroelementów z dodatkiem sacharozy, fruktozy i glukozy w stężeniu od 15 do $60 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Wpływ hydrolizatu kazeiny i węgla aktywowanego na konwersję zarodków somatycznych

Podobnie jak w poprzednim doświadczeniu zarodki somatyczne otrzymane na drodze bezpośredniej i pośredniej somatycznej embriogenezy wykładano na pożywki MS o zmniejszonej o połowę zawartości makroelementów z dodatkiem $45 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy oraz od $0,1$ do $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ węgla aktywowanego i hydrolizatu kazeiny.

Wpływ światła na konwersję zarodków somatycznych

Zbadano wpływ światła o różnej barwie na konwersję zarodków uzyskanych na drodze bezpośredniej i pośredniej embriogenezy. Zarodki wykładano na pożywki MS o zmniejszonej o połowę zawartości makroelementów, z dodatkiem $45 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy. Kultury doświetlano światłem białym, czerwonym, żółtym, niebieskim, mieszanym (światło białe i czerwone w stosunku 2 : 1) oraz prowadzono bez dostępu światła.

Wpływ moczenia w roztworze ABA na konwersję zarodków somatycznych

Zarodki somatyczne otrzymane na drodze bezpośredniej i pośredniej somatycznej embriogenezy wykładano na pożywkę uznaną w poprzednich doświadczeniach za najlepszą do regeneracji zarodków somatycznych – pożywkę MS o zmniejszonej o połowę zawartości makroelementów z dodatkiem $45 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy. Przed wyłożeniem na pożywki izolowane zarodki somatyczne moczone przez 5 minut w roztworach od $0,1$ do $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ABA. Prace te prowadzono w warunkach sterylnych.

3.7. Analiza statystyczna wyników badań

Otrzymane we wszystkich etapach badań wyniki opracowano statystycznie, poddając je analizie wariancji. Do oceny różnic między średnimi zastosowano test Tukeya, wyliczając półprzedziały ufności na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Wartości procentowe przekształcono, wykorzystując transformację Blissa. Średnie różniące się istotnie oznaczono w tabelach kolejnymi literami alfabetu.

3.8. Określenie zmienności genetycznej fragmentów kalusa i zregenerowanych roślin metodą ISSR-PCR

Materiałem badawczym do założenia doświadczenia były fragmenty roślin oraz tkanka kalusowa chryzantemy uzyskana w wyniku prowadzenia kultur w różnych warunkach. Analizowano wpływ rozmnażania chryzantem w kulturach *in vitro* na drodze sadzonek pędowych (przez rok), długość okresu prowadzenia kultur kalusowych (od jednego miesiąca do jednego roku) na częstość powstałych zmian. Badania prowadzono na próbach zbiorczych, powstałych z połączenia fragmentów tkanek 10 osobników danego rodzaju (tab. 1). Dodatkowo wyizolowano DNA z 50 regenerantów otrzymanych na drodze pośredniej i bezpośredniej somatycznej embriogenezy, według protokołu uznanego za najkorzystniejszy (rozdział 4.7) i analizowano każdą z prób oddzielnie.

Izolację DNA przeprowadzono, wykorzystując zestaw Genomic DNA Prep Plus (A&A Biotechnology). Pomiar stężenia DNA przeprowadzono w spektrofotometrze GeneQuant RNA/DNA (Pharmacia LKB).

Tabela 1. Pochodzenie tkanek roślinnych, z których wyizolowano DNA

Numer próby	Rodzaj tkanki	Długość okresu trwania kultur
1	fragmenty rośliny matecznej (kontrola)	–
2	fragmenty roślin namnażanych na pożywce MS bez dodatku regulatorów wzrostu	1 rok
3	tkanka kalusowa namnażana na pożywce płynnej w bioreaktorze	3 pasáže łącznie 3 miesiące
4	tkanka kalusowa namnażana przez różny okres	1 miesiąc
5		6 miesięcy
6		1 rok
7	fragmenty blaszek liściowych 10 roślin zregenerowanych z zarodków somatycznych zaindukowanych na tkance kalusowej namnażanej na pożywkach stałych przez różny okres	1 miesiąc
8		6 miesięcy
9		1 rok
10	rośliny zregenerowane na drodze bezpośredniej somatycznej embriogenezy (eksplantaty – fragmenty blaszek liściowych)	–

Do badań wykorzystano 30 starterów ISSR-PCR ze specyficznym, selektywnym końcem 3', z czego 10 dawało produkty widoczne później na żelu agarozowym (tab. 2). Mieszanina reakcyjna o objętości całkowitej 25 μ l zawierała dd H₂O, 10 \times PCR bufor z (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂ (Fermentas MBI), 0,2 mM każdego z nukleotydów dNTP (2 mM) (Fermentas MB), 2,5 nM startera (Proligo) i 1 u Taq DNA polimerazy (Fermentas MBI) oraz 25 ng genomowego DNA. Po krótkim zwirowaniu mieszaniny reakcyjnej przenoszono ją do termocyklera (Eppendorf – Mastercycler), w którym odbywała się reakcja PCR. Stanowiła ona szereg cykli obejmujących denaturację nici DNA w temperaturze 94°C przez 420 sekund, przyłączenie starterów do pojedynczych nici DNA w temperaturze 37–72°C przez 45 sekund, syntezę

DNA z wykorzystaniem DTP i Mg oraz polimerazy Taq w temperaturze 72°C przez 120 sekund. Cykle były powtarzane 35 razy. Po ich zakończeniu produkt PCR inkubowano przez 7 minut (420 sekund) w temperaturze 72°C.

Tabela 2. Startery generujące produkty reakcji ISSR-PCR

Numer startera	Sekwencja startera (5'–3')	Temperatura przyłączenia (°C)
808	5'GAGAGAGAGAGAGAGAG3'	52
809	5' GAGAGAGAGAGAGAGAYG3'	53
812	5'GAGAGAGAGAGAGAGAC3'	52
816	5'AGAGAGAGAGAGAGAGYGC3'	55
817	5'AGAGAGAGAGAGAGAGYGG3'	55
821	5'GAGAGAGAGAGAGAGAYC3'	55
827	5'ACACACACACACACACGG3'	55
830	5'TGTGTGTGTGTGTGG3'	52
835	5'AGAGAGAGAGAGAGAGYTT3'	53
855	5'AGAGAGAGAGAGAGAGYTT3'	53

Produkty reakcji ISSR-PCR rozdzielano w polu elektrycznym, w 2-procentowym żelu agarozowym przy stałym napięciu 65 V przez jedną godzinę. Elektroforezę przeprowadzono w aparacie Mini Sub-Cell GT (Bio-Rad) w obecności buforu 1 × TBE. Do kieszonek żelu nanoszono po 20 µl produktu ISSR wymieszanego buforem obciążającym (0,25% błękit bromofenolowy + 40% sacharoza). Wzorcem masowym był O'Range Ruler 200 bp DNA Ladder (Fermentas MBI). Produkty amplifikacji uwidaczniano w obecności bromku etydyny (EtBr) na transiluminatorze UV Foto 21 (Fotodyne). Obrazy elektroforetyczne otrzymane w świetle UV zostały sfotografowane aparatem Polaroid (DS-34) – program komputerowy Diversity One (Pharmacia Biotech). Produkty uznane za nieobecne u jednych genotypów, a widoczne u innych, uznano za polimorficzne. Podobieństwo genetyczne obliczone zostało przez współczynnik Jaccarda. Dendrogram podobieństwa genetycznego wykreślono na podstawie algorytmu skupień UPGMA, stosując program komputerowy Diversity One 1.3 (Pharmacia Biotech).

4. Wyniki

4.1. Inicjacja kultur kalusowych

Wpływ zawartości auksyn w pożywce na inicjację tkanki kalusowej

Zastosowane w doświadczeniu auksyny miały istotny wpływ zarówno na częstość eksplantatów inicjujących tkankę kalusową, jak i jej masę (tab. 3).

Tabela 3. Procentowy udział eksplantatów wykształcających tkankę kalusową oraz jej masa (g) na pożywkach o zróżnicowanej zawartości auksyn

Auksyna ($\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)	Procent eksplantatów wykształcających tkankę kalusową	Masa tkanki kalusowej (g)
kontrola	brak tkanki kalusowej	
2,4-D	0,5	26 fg
	1,0	35 efg
	2,0	60 de
	4,0	67 d
IAA	0,5	18 g
	1,0	27 fg
	2,0	38 ef
	4,0	48 e
IBA	0,5	28 fg
	1,0	31 efg
	2,0	30 fg
	4,0	32 efg
NAA	0,5	100 a
	1,0	100 a
	2,0	100 a
	4,0	100 a
PIK	0,5	88 abc
	1,0	92 ab
	2,0	100 a
	4,0	100 a
DIC	0,5	82 bc
	1,0	98 a
	2,0	100 a
	4,0	100 a

* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.

W przypadku fragmentów blaszek liściowych wyłożonych na pożywki uzupełnione NAA, niezależnie od stężenia auksyny, oraz dicambą i pikloramem w stężeniu 2 i 4 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, obecność tkanki kalusowej stwierdzono w przypadku wszystkich eksplantatów. Eksplantaty wyłożone na pożywki z dodatkiem IAA w najniższym stężeniu inicjowały tkankę kalusową z najniższą częstością (18%). Na pożywce kontrolnej – bez dodatku regulatorów wzrostu – nie obserwowano tworzenia się tkanki kalusowej. Tkankę kalusową o największej masie wykształciły eksplantaty liściowe wyłożone na pożywki z dodatkiem NAA w wyższym stężeniu – od 1 do 4 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ (od 0,87 do 0,98 g). Eksplantaty wyłożone na pożywki z dodatkiem IAA

w niższym stężeniu (od 0,5 do 2 mg · dm⁻³) oraz 2,4-D w najwyższym stężeniu wykształciły najmniejszą masę tkanki kalusowej (od 0,11 do 0,17 g).

Kalus pod wpływem NAA oraz 2,4-D miał jasnozielony kolor i gruzelkową strukturę. Kalus wykształcony na eksplantatach wyłożonych na pożywki z dodatkiem pikloramu i dicamby był kremowożółty, o zbitej strukturze i gładkiej, błyszczącej powierzchni. Tkanka kalusowa uzyskana na eksplantatach liściowych wyłożonych na pożywki dodatkiem IBA i IAA charakteryzowała się litą i twardą, ciemnozieloną powierzchnią.

Wpływ dodatku do pożywki auksyn i BAP na inicjację tkanki kalusowej

Eksplantaty liściowe wyłożone na pożywki z dodatkiem BAP, dodawanej do pożywek jako jedyny regulator wzrostu, nie wykształciły tkanki kalusowej (tab. 4).

Tabela 4. Procentowy udział eksplantatów wykształcających tkankę kalusową oraz jej masa (g) na pożywkach o zróżnicowanej zawartości auksyn i cytokininy BAP

Roślinne regulatory wzrostu (mg · dm ⁻³)	Udział eksplantatów wykształcających tkankę kalusową (%)	Masa tkanki kalusowej (g)	
BAP 4	brak inicjacji tkanki kalusowej		
NAA + BAP	1	100 a	0,71 bcd
	2	100 a	0,90 b
	3	100 a	0,87 b
	4	100 a	0,96 b
	1 + 4	100 a	0,81 bc
	2 + 4	100 a	0,92 b
	3 + 4	100 a	1,21 a
	4 + 4	100 a	1,25 a
PIK + BAP	1	96 a	0,20 hi
	2	97 a	0,26 ghi
	3	100 a	0,43 efghi
	4	100 a	0,20 hi
	1 + 4	92 a	0,17 i
	2 + 4	98 a	0,35 fghi
	3 + 4	100 a	0,40 efghi
	4 + 4	100 a	0,41 efgh
DIC + BAP	1	92 a	0,47 efg
	2	94 a	0,44 efg
	3	93 a	0,60 cde
	4	100 a	0,72 bcd
	1 + 4	100 a	0,42 efgh
	2 + 4	100 a	0,46 efg
	3 + 4	100 a	0,55 def
	4 + 4	100 a	0,59 cde

* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.

Procent eksplantatów wykształcających tkankę kalusową w przypadku pożywek uzupełnionych o auksyny lub kombinację auksyny i BAP nie różnił się od siebie istotnie. Stwierdzono natomiast istotny wpływ zastosowanych regulatorów wzrostu na masę tkanki kalusowej. Eksplantaty wyłożone na pożywkę z dodatkiem 3 i 4 mg · dm⁻³ NAA dodanych do pożywki równocześnie z 4 mg · dm⁻³ BAP wykształciły kalus o największej masie (odpowiednio:

1,21 i 1,25 g). Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu dodatku BAP w pożywce na indukcję tkanki kalusowej, kiedy regulator ten stosowano łącznie z pikloramem lub dicambą.

Kalus wykształcony na pożywkach z dodatkiem auksyn i BAP charakteryzował się jaśniejszą barwą niż kiedy indukowany był na pożywkach zawierających jedynie auksyny. W przypadku NAA miał gruzelkową strukturę, łatwo rozpadał się na mniejsze fragmenty. Kalus wykształcony na fragmentach wyłożonych na pożywki z dodatkiem pikloramu i dicamby był bardziej zbity i twardy.

Wpływ poliamin oraz warunków świetlnych prowadzenia kultury na inicjację tkanki kalusowej

Eksplantaty wykładane na pożywki z dodatkiem putrescyny, stosowanej jako jedyny regulator wzrostu zamierały – nie obserwowano w ich przypadku wykształcania się tkanki kalusowej. Natomiast dodatek sperminy i spermidyny, jako jedynego regulatora wzrostu, indukował kaulogenezę, choć masa wykształconej tkanki kalusowej była znacznie mniejsza od kontroli, czyli fragmentów roślin wykładanych na pożywkę uzupełnioną $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i BAP (tab. 5).

Reakcja eksplantatów na dodatek poliamin, stosowanych łącznie z pożywką uznaną za najkorzystniejszą do inicjacji kultur kalusowych w poprzednim doświadczeniu ($4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i BAP), była zróżnicowana. Częstość eksplantatów wykształcających tkankę kalusową na pożywkach z dodatkiem $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i BAP oraz putrescyny, sperminy i spermidyny była do siebie zbliżona i wahała się od 96 do 100%. Na kształtowanie się omawianej cechy nie miały również wpływu warunki świetlne. Obserwowano natomiast istotny wpływ zastosowanych regulatorów wzrostu, jak i warunków świetlnych prowadzenia kultury na kształtowanie się masy tkanki kalusowej. Dodatek do pożywek sperminy w niższych stężeniach (od $0,5$ do $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) nie miał wpływu na kształtowanie się masy tkanki kalusowej w stosunku do kontroli. Istotne jej zwiększenie w przypadku sperminy obserwowano dopiero przy wyższym stężeniu – $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Natomiast dodatek spermidyny do pożywki już w najniższym stężeniu ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) powodował istotne zwiększenie się masy tkanki kalusowej i rosła ona wraz ze wzrostem stężenia tego regulatora w pożywce. Największą masę tkanki kalusowej stwierdzono w przypadku eksplantatów wyłożonych na pożywki z $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ spermidyny oraz $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i BAP (fot. 2a).





Dodatni wpływ poliamin na inicjację tkanki kalusowej obserwowano jedynie w kulturach doświetlanych – w przypadku kultur prowadzonych w ciemności dodatek poliamin nie miał wpływu na kształtowanie się omawianej cechy.

Wpływ barwy światła na inicjację tkanki kalusowej


Eksplantaty liściowe, wykładane na pożywkę uznaną za najlepszą do indukcji kultur kalusowych w poprzednim etapie badań – z dodatkiem $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i BAP oraz $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ spermidyny i doświetlane światłem o różnej barwie różniły się istotnie masą wykształconej tkanki kalusowej (rys. 1). Doświetlanie kultur światłem białym stosowanym łącznie z czerwonym powodowało zwiększenie się masy indukowanego kalusa, w stosunku do standardowo stosowanego doświetlania światłem białym oraz wpływało korzystnie na jego


strukturę i barwę – przybierał on jaśniejszy kolor i charakteryzował się strukturą gruzelkową. Doświetlanie fragmentów liści światłem niebieskim powodowało brązowienie i zamieranie części kultur, a jego masa była najmniejsza. W kulturach tych obserwowano ryzogenezę – na fragmentach liści widocznych było od 5 do 10 korzeni. Kalus powstawał również w kulturach prowadzonych bez dostępu światła i charakteryzował się jasnokremową barwą (fot. 2b).

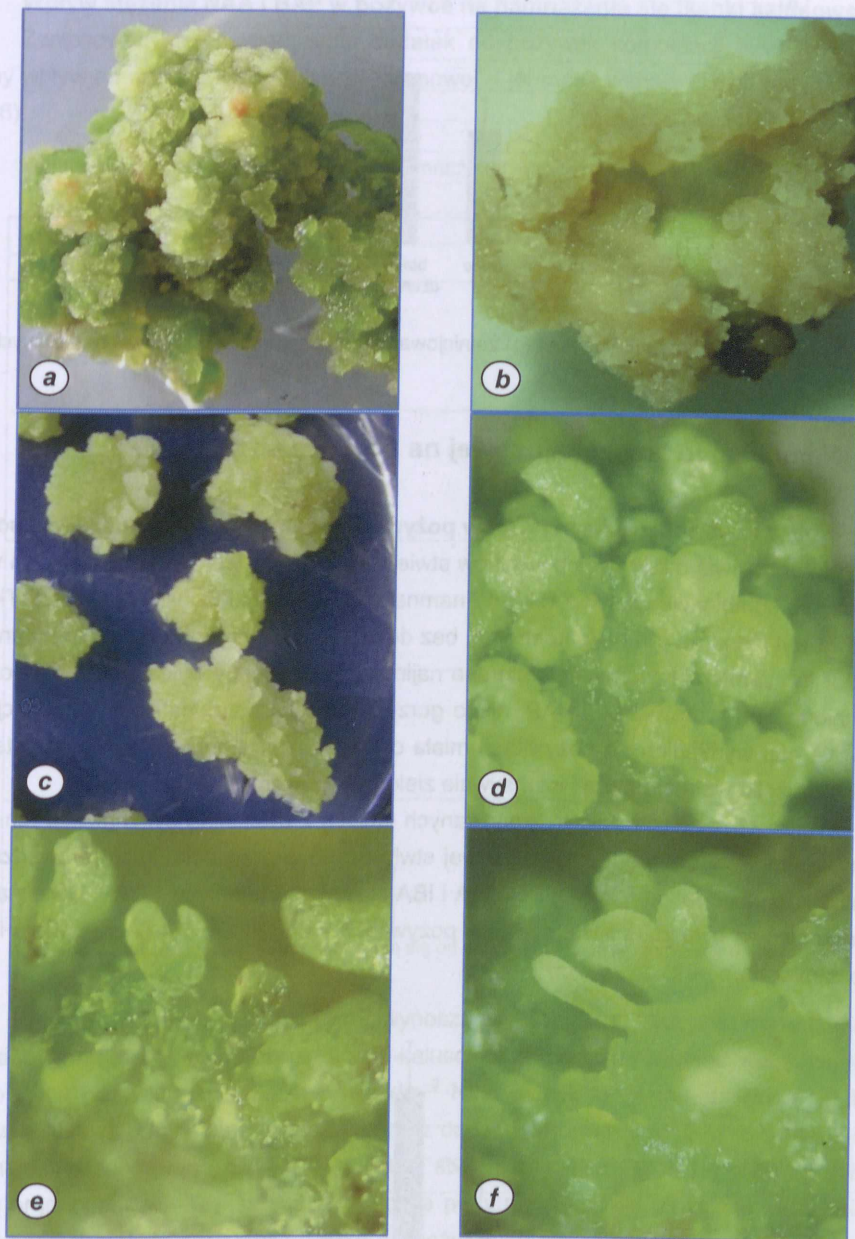
Tabela 5. Procentowy udział eksplantatów wykształcających tkankę kalusową (%) oraz jej masa (g) na pożywkach o zróżnicowanej zawartości poliamin oraz NAA i BAP

Regulatory wzrostu (mg · dm ³)	Udział eksplantatów wykształcających tkankę kalusową (%)			Masa tkanki kalusowej (g)		
			średnia			średnia
NAA + BAP (kontrola) 4,0 + 4,0	96,2 a	99,3 a	97,8 a	1,23 c	1,11 a	1,17 b
0,5	eksplantaty brązowiejące i zamierające, brak tkanki kalusowej					
1,0						
2,0						
Putrescyna 5,0						
+ NAA + BAP 0,5 + 4,0 + 4,0						
1,0 + 4,0 + 4,0	99,4 a	100,0 a	99,5 a	1,24 c	1,12 a	1,18 b
2,0 + 4,0 + 4,0	100,0 a	100,0 a	100,0 a	1,19 c	1,09 a	1,14 b
5,0 + 4,0 + 4,0	100,0 a	100,0 a	100,0 a	1,26 c	1,10 a	1,18 b
0,5	5,4 cc	2,5 c	4,0 c	0,11 f	0,10 c	0,11 d
1,0	5,9 bc	3,4 c	4,7 c	0,12 f	0,08 c	0,10 d
2,0	9,1 b	1,9 c	5,5 c	0,19 e	0,07 c	0,13 d
Spermina + 5,0	1,2 c	1,2 c	1,2 c	0,09 f	0,12 bc	0,11 d
NAA + BAP 0,5 + 4,0 + 4,0	100,0 a	100,0 a	100,0 a	1,24 c	1,09 a	1,17 b
1,0 + 4,0 + 4,0	98,8 a	100,0 a	99,4 a	1,30 bc	1,16 a	1,23 ab
2,0 + 4,0 + 4,0	100,0 a	100,0 a	100,0 a	1,39 b	1,14 a	1,27 ab
5,0 + 4,0 + 4,0	100,0 a	100,0 a	100,0 a	1,42 b	1,13 a	1,28 ab
0,5	15,0 b	16,2 b	15,6 b	0,21 e	0,21 b	0,21 c
1,0	21,5 b	19,1 b	20,3 b	0,31 d	0,24 b	0,28 c
2,0	19,4 b	19,9 b	19,7 b	0,29 d	0,19 b	0,24 c
Spermidyna 5,0	24,1 b	15,9 b	20,0 b	0,29 d	0,28 b	0,29 c
+ NAA + BAP 0,5 + 4,0 + 4,0	100,0 a	99,0 a	99,5 a	1,39 b	1,13 a	1,26 ab
1,0 + 4,0 + 4,0	100,0 a	100,0 a	100,0 a	1,42 b	1,17 a	1,30 ab
2,0 + 4,0 + 4,0	100,0 a	100,0 a	100,0 a	1,62 a	1,16 a	1,39 a
5,0 + 4,0 + 4,0	100,0 a	100,0 a	100,0 a	1,76 a	1,14 a	1,45 a
Średnia	66,4 r.n.	63,9 r.n.		0,92 a	0,76 b	

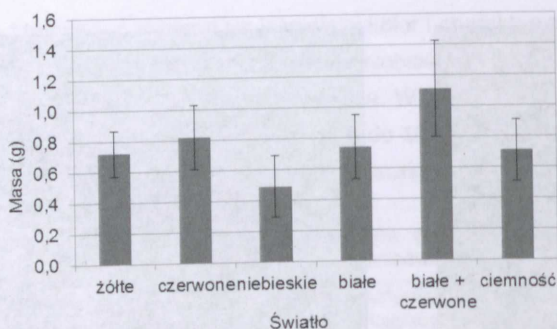
* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.

 – kultury doświetlane światłem białym przez 16 godzin

 – kultury prowadzone w ciemności



Fot. 2. Tkanka kalusowa wykształcona na fragmentach liści wyłożonych na pożywki MS z dodatkiem $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP i NAA oraz $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ SPDM, inicjowana w kulturach doświetlanych światłem białym (a) i prowadzonych w ciemności (b). Namnażanie kalusa na pożywce z dodatkiem $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ SPDM i $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ i $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP (c). Zarodki somatyczne zainicjowane w kulturach kalusowych na pożywce z dodatkiem $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP i $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA oraz $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ SPDM w stadium globularnym (d), sercowatym (e) i torpedy (f)



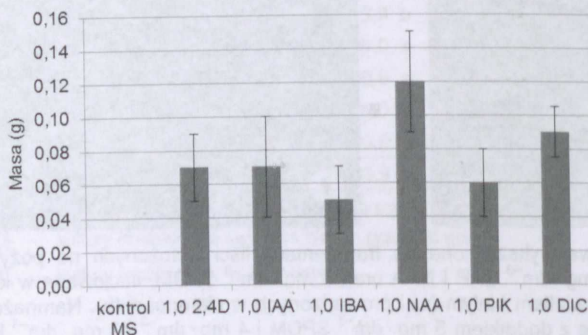
Rys. 1. Masa tkanki kalusowej (g) zainicjowanej na eksplantatach liściowych w różnych warunkach świetlnych

4.2. Namnażanie tkanki kalusowej na pożywkach stałych

Wpływ zawartości auksyn i BAP w pożywce na namnażanie się tkanki kalusowej

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono istotny wpływ zastosowanych w doświadczeniu kombinacji auksyn z BAP na namnażanie się tkanki kalusowej (rys. 2). Tkanka kalusowa wyłożona na pożywkę kontrolną, bez dodatku regulatorów wzrostu, nie namnażała się – żółkła i zamierała. Namnażała się ona najintensywniej, kiedy wykładano ją na pożywkę uzupełnioną $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i BAP, nieco gorzej na podłożu z dodatkiem kombinacji DIC i BAP. Na obu wymienionych pożywkach miała ona charakter embriogenny – charakteryzowała się gruzelkową strukturą i intensywnie zielonym kolorem.

Wpływ pozostałych auksyn stosowanych łącznie z cytokiną był znacznie mniej korzystny. Najmniejszą masę tkanki kalusowej stwierdzono w przypadku kultur prowadzonych na pożywkach z dodatkiem 2,4-D, PIK, IAA i IBA stosowanych łącznie z BAP. Wykształcona tkanka kalusowa była zbita i twarda, a na pożywkach z dodatkiem 2,4-D brązowieła i stopniowo zamierała.



Rys. 2. Masa tkanki kalusowej (g) namnażanej na pożywkach z dodatkiem zróżnicowanej zawartości regulatorów wzrostu

Wpływ stężenia NAA i BAP w pożywce na namnażanie się tkanki kalusowej

Zastosowany w doświadczeniu dodatek do pożywek kombinacji NAA i BAP miał istotny wpływ na namnażanie się tkanki kalusowej – jej masa wahała się od 0,09 do 0,82 g (tab. 6).

Tabela 6. Masa tkanki kalusowej (g) namnażanej na pożywkach z dodatkiem NAA i BAP w zróżnicowanych stężeniach

Regulatory wzrostu ($\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)		Masa tkanki kalusowej (g)
BAP	NAA	
1,0	1,0	0,09 h
	2,0	0,23 g
	3,0	0,18 gh
	4,0	0,17 gh
	5,0	0,11 h
2,0	1,0	0,21 gh
	2,0	0,24 g
	3,0	0,24 g
	4,0	0,19 gh
	5,0	0,16 gh
3,0	1,0	0,43 de
	2,0	0,48 d
	3,0	0,63 bc
	4,0	0,66 bc
	5,0	0,82 a
4,0	1,0	0,36 ef
	2,0	0,61 bc
	3,0	0,46 de
	4,0	0,27 fg
	5,0	0,71 ab
5,0	1,0	0,23 g
	2,0	0,36 ef
	3,0	0,52 cd
	4,0	0,59 c
	5,0	0,55 cd

* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.

Przy równym poziomie NAA i BAP wynoszącym $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ przyrost masy tkanki kalusowej był najniższy. Namnażanie tkanki kalusowej zachodziło najintensywniej, kiedy wyłożono ją na pożywki z dodatkiem $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA oraz 3 lub 4 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP (tab. 6). Tkanka kalusowa namnażana na pożywkach z dodatkiem $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP była nadmiernie uwodniona, obserwowano objawy wityfikacji, stwierdzono również w jej przypadku intensywną organogenezę – wykształcały się liczne pędy przybyszowe. Znacznie lepszymi właściwościami charakteryzowała się tkanka na pożywkach z dodatkiem niższego stężenia cytokininy – była intensywnie zielona, ale bez objawów wityfikacji i miała strukturę gruzelkową. Tkanka kalusowa namnażana na pożywkach o najwyższym stężeniu NAA ($5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) nie miała charakteru embriogennego – charakteryzowała się ciemnozielonym kolorem i zbitą strukturą, pod koniec prowadzenia kultury dochodziło w przypadku tego rodzaju kultur do

brązowienia i zamierania tkanki kalusowej. Dlatego też w dalszej części badań wykorzystano kombinację o niższym stężeniu tej auksyny: $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP.

Wpływ dodatku do pożywki NAA, BAP i poliamin oraz warunków świetlnych prowadzenia kultury na namnażanie się tkanki kalusowej

Tkanka kalusowa namnażana na pożywkę z dodatkiem putrescyny w stężeniu 1 i $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ żółkła i zamierała w ciągu dwóch tygodni od założenia kultury (tab. 7).

W przypadku kultur prowadzonych na pożywkach z dodatkiem 1 i $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ spermidyny i sperminy masa namnożonej tkanki kalusowej wahała się w przypadku kultur doświetlanych od 0,09 do $0,19 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, zaś w przypadku prowadzonych w ciemności od 0,11 do $0,19 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ (fot. 2c). Kalus charakteryzował się zieloną barwą i gruzełkową strukturą. Stosowanie dodatku poliamin w stężeniu 1 i $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ łącznie z $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP nie powodowało bardziej intensywnego wzrostu tkanki kalusowej, w porównaniu z pożywką uzupełnioną jedynie NAA i BAP w wymienionym stężeniu. Warunki świetlne prowadzenia kultury nie miały wpływu na masę namnożonej tkanki kalusowej.

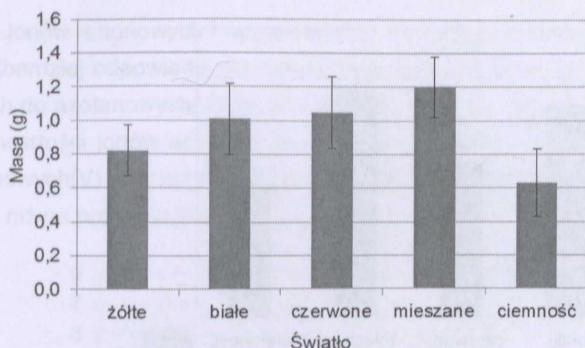
Tabela 7. Masa tkanki kalusowej (g) namnażanej na pożywkach z dodatkiem poliamin oraz NAA i BAP w zróżnicowanych warunkach świetlnych

Regulatory wzrostu ($\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)	Warunki świetlne		Średnia
	światło białe	ciemność	
NAA + BAP 4,0 3,0	0,80 a	0,74 a	0,77 a
Putrescyna + NAA + BAP 1,0 4,0 3,0 5,0 4,0 3,0	tkanka kalusowa żółknąca i zamierająca		
	0,82 a	0,71 a	0,77 a
	0,84 a	0,70 a	0,77 a
Spermina + NAA + BAP 1,0 4,0 3,0 5,0 4,0 3,0	0,19 b	0,16 b	0,18 b
	0,15 b	0,16 b	0,16 b
	0,93 a	0,71 a	0,82 a
	0,79 a	0,71 a	0,75 a
Spermidyna + NAA + BAP 1,0 4,0 3,0 5,0 4,0 3,0	0,09 b	0,11 b	0,10 b
	0,10 b	0,19 b	0,15 b
	0,79 a	0,73 a	0,76 a
	0,89 a	0,69 a	0,79 a
Średnia	0,58 r.n.	0,51 r.n.	

* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.

Wpływ barwy światła na namnażanie się tkanki kalusowej

Tkanka kalusowa namnażała się z różną intensywnością, kiedy doświetlano ją światłem o różnej barwie (rys. 3). Doświetlanie kultur światłem czerwonym powodowało zwiększenie się masy namnożonego kalusa oraz wpływało korzystnie na jego strukturę i barwę – przybierał on jaśniejszy kolor i charakteryzował się strukturą gruzełkową. Tkanka kalusowa wystawiona na działanie światła niebieskiego brązowiła i zamierała. Kalus namnażany w kulturach prowadzonych bez dostępu światła charakteryzował się jasnokremową barwą i luźną strukturą.



Rys. 3. Masa tkanki kalusowej (g) namnażanej w zróżnicowanych warunkach świetlnych

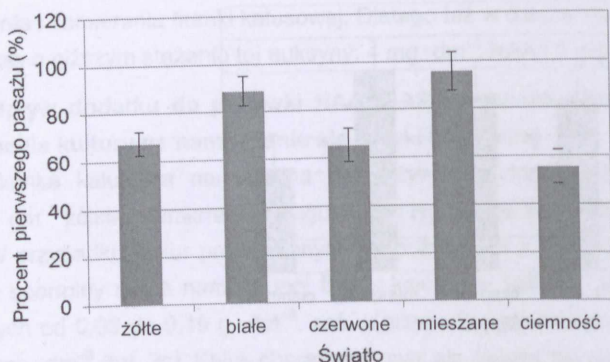
Wpływ barwy światła stosowanego przez sześć miesięcy na namnażanie się tkanki kalusowej

Stwierdzono zróżnicowaną reakcję tkanki kalusowej na długotrwałe namnażanie w kulturach doświetlanych substytucyjnie światłem o różnej barwie. Przez sześć miesięcy namnażania tkanki kalusowej w kulturach doświetlanych światłem białym oraz białym i czerwonym, stosowanymi jednocześnie, nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy kolejnymi pasażami (tab. 8). W przypadku kultur doświetlanych substytucyjnie światłem żółtym i czerwonym istotne obniżenie się intensywności mnożenia się tkanki kalusowej obserwowano po drugim miesiącu prowadzenia kultury. Największy spadek masy namnożonego kalusa stwierdzono w przypadku kultur prowadzonych bez dostępu światła – masa kalusa spadała do 55% masy kalusa uzyskanego w czasie pierwszego pasażu (rys. 4). Kultury doświetlane światłem niebieskim zamarły już po pierwszym pasażu.

Tabela 8. Masa tkanki kalusowej (g) namnażanej w zróżnicowanych warunkach świetlnych przez sześć miesięcy

Numer kolejnego pasażu	Światło					Ciemność
	żółte	białe	czerwone	mieszane	niebieskie	
1 (kontrola)	0,89 a	0,98 a	1,04 a	1,19 a	tkanka kalusowa zbrązowiła i zamarła	0,71 a
2	0,84 a	0,91 a	0,99 ab	1,15 a		0,62 ab
3	0,66 b	0,92 a	0,97 b	1,19 a		0,54 bc
4	0,64 b	0,89 a	0,87 bc	1,12 a		0,47 bcd
5	0,55 c	0,89 a	0,80 bc	1,10 a		0,39 cd
6	0,50 c	0,87 a	0,71 c	1,11 a		0,36 d

* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.

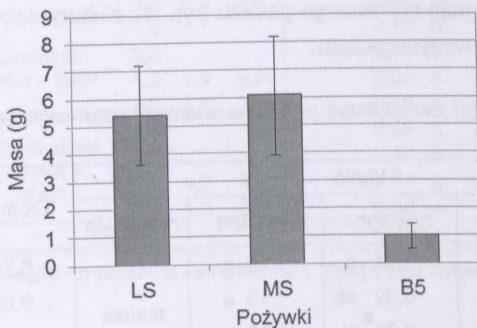


Rys. 4. Masa tkanki kalusowej (g) po sześciu miesiącach namnażania w zróżnicowanych warunkach świetlnych w procentach kontroli (masa tkanki kalusowej namnożonej po pierwszym pasażu)

4.3. Namnażanie tkanki kalusowej na pożywkach płynnych

Wpływ składu mineralnego pożywki na namnażanie się tkanki kalusowej

W doświadczeniu zastosowano pożywki polecane do prowadzenia kultur płynnych – MS, modyfikacje pożywki MS, pożywkę LS oraz pożywkę B5. Stwierdzono istotny wpływ składu mineralnego pożywki na namnażanie się tkanki kalusowej (rys. 5).

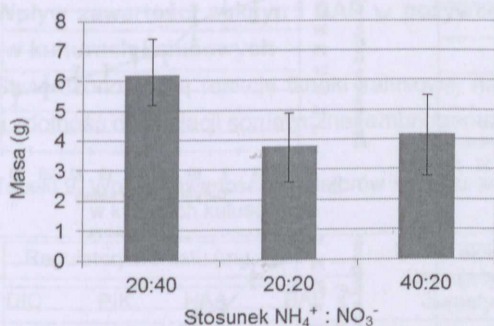


Rys. 5. Masa tkanki kalusowej (g) namnażanej na pożywkach płynnych o zróżnicowanym składzie mineralnym

Kalus namnażany na pożywce B5 po tygodniu od założenia kultury zaczął brązowieć i zamierać. Tkanka kalusowa na pożywce MS mnożyła się bardziej intensywnie niż na pożywce LS, charakteryzowała się też jasnozielonym zabarwieniem, jednak różnice nie były istotne statystycznie.

W kolejnym doświadczeniu określono wpływ stosunku jonów amonowych do azotanowych na masę namnażanej tkanki kalusowej. Stwierdzono istotny wpływ zawartości w po-

żywe jonów amonowych i azotanowych(V) na masę namnożonej tkanki kalusowej (rys. 6). Za najbardziej odpowiedni do namnażania tkanki typu kultur przyjęto stosunek jonów amonowych do azotanowych(V) jak 20 : 40, czyli taki, jaki obecny jest w pożywce MS. Zwiększenie zawartości jonów amonowych w pożywce, jak również zmniejszenie zawartości jonów azotanowych(V), nie wpłynęło korzystnie na masę namnożonej tkanki kalusowej – była ona niższa niż na pożywce MS.



Rys. 6. Masa tkanki kalusowej (g) namnażanej na pożywkach płynnych o zróżnicowanej zawartości jonów amonowych i azotanowych(V)

Dynamika namnażania się tkanki kalusowej w kulturach zawieszinowych

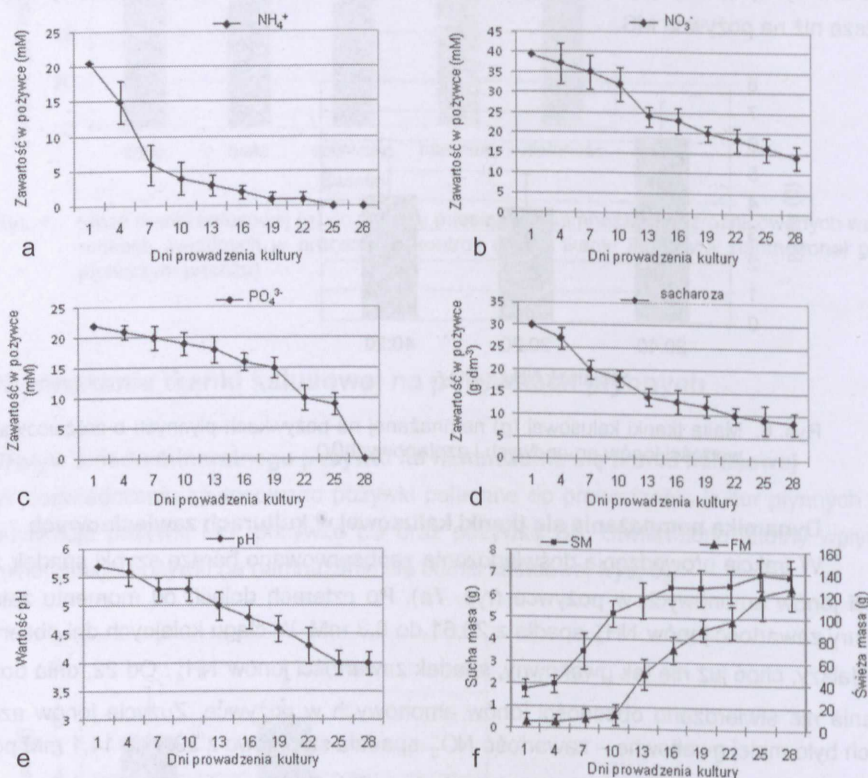
W trakcie prowadzenia doświadczenia zaobserwowano bardzo szybki spadek zawartości jonów amonowych w pożywce (rys. 7a). Po czterech dniach od momentu założenia kultury zawartość jonów NH_4^+ spadła z 20,61 do 6,3 mM. W ciągu kolejnych dni obserwowano dalszy, choć już nie tak gwałtowny, spadek zawartości jonów NH_4^+ . Od 22. dnia doświadczenia nie stwierdzano obecności jonów amonowych w pożywce. Zużycie jonów azotanowych było mniej gwałtowne – zawartość NO_3^- spadała stopniowo z 39,4 do 14,1 mM po czterech tygodniach prowadzenia doświadczenia (rys. 7b). Podczas pierwszych dni prowadzenia doświadczenia obserwowano gwałtowny spadek zawartości jonów fosforanowych(V) w pożywce. Po sześciu dniach poziom jonów PO_4^{3-} spadł z wyjściowego 1,25 do 0,51 mM, zaś po 12 dniach osiągnął wartość 0,15 mM. Od 18. dnia nie stwierdzano obecności jonów fosforanowych(V) w pożywce (rys. 7c).

pH roztworu zmieniało się wraz z wyczerpywaniem się jonów amonowych – obserwowano ciągły spadek jego wartości w trakcie trwania doświadczenia. Od 13. dnia prowadzenia doświadczenia pH roztworu spadło poniżej 5,0, natomiast w 22. dniu spadło do 4,0 (rys. 7d). Zawartość sacharozy obniżyła się istotnie z 30,0 do $14,32 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ po sześciu dniach prowadzenia doświadczenia (rys. 7e). Po zakończeniu doświadczenia stwierdzono, że pożywka zawiera jedynie $8,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy.

Sucha i świeża masa namnożonej tkanki kalusowej rosła w trakcie prowadzenia doświadczenia. Wyjściowo zawiesinę inokulowano $6 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ tkanki kalusowej, początkowo przy-

rost masy był wolny, a zawiesina weszła w fazę szybszego wzrostu. Po czterech tygodniach prowadzenia kultury sucha masa tkanki wynosiła $6,8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, zaś świeża $128,1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

W czasie prowadzenia kultur kalusowych na pożywkach płynnych nie obserwowano zachodzenia procesu somatycznej embriogenezy.



Rys. 7. Zmiany zawartości jonów amonowych (a), azotanowych (b), ortofosforanowych (c), sacharozy (d) i pH (e) w pożywce oraz świeża i sucha masa w trakcie namnażania tkanki kalusowej w bioreaktorze

4.4. Inicjacja somatycznej embriogenezy w kulturach kalusowych

Wpływ prowadzenia kultur w ciemności oraz metody namnażania tkanki kalusowej na indukcję somatycznej embriogenezy w kulturach kalusowych

Obserwując fragmenty tkanki kalusowej, niezależnie od sposobu ich uzyskania (namnażanie na pożywkach stałych lub płynnych), wyłożone na pożywki z dodatkiem wszystkich wymienionych w tym rozdziale pożywek i umieszczone w ciemności przez cały okres indukcji somatycznej embriogenezy nie stwierdzono formowania się zarodków somatycznych.

W przypadku tkanek namnażanych w bioreaktorze, po wyłożeniu ich na pożywki stałe, na etapie inicjacji somatycznej embriogenezy obserwowano intensywne mnożenie się tkanki kalusowej, ale nie stwierdzono pojawiania się zarodków somatycznych, niezależnie od warunków świetlnych, jak i regulatorów wzrostu zastosowanych na tym etapie. Dlatego też poniżej zaprezentowano wyniki dotyczące jedynie tkanki kalusowej namnażanej na pożywkach stałych, w kulturach doświetlanych światłem białym przez 16 godzin dziennie.

Wpływ zawartości auksyn i BAP w pożywce na indukcję somatycznej embriogenezy w kulturach kalusowych

Stwierdzono różną reakcję tkanki kalusowej na skład pożywek, czego efektem była zmienna zdolność do inicjacji somatycznej embriogenezy (tab. 9):

Tabela 9. Wpływ zawartości regulatorów wzrostu w pożywce na somatyczną embriogenezę w kulturach kalusowych

Regulatory wzrostu ($\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)				Udział eksplantatów formujących zarodki somatyczne (%)	Liczba zarodków somatycznych wykształconych na eksplantacie
DIC	PIK	NAA	BAP		
kontrola – brak regulatorów wzrostu				0 e	0 d
			1,0	0 e	0 d
			2,5	0 e	0 d
			5,0	0 e	0 d
2,0				3,7 e	1,2 cd
4,0				1,0 e	1,0 d
	2,0			0 e	0 d
	4,0			0 e	0 d
		2,0		3,3 e	1,3 cd
		4,0		0 e	0 d
2,0			1,0	22,3 cd	11,1 b
4,0			1,0	7,5 de	7,1 bc
	2,0		1,0	27,1 bcd	6,9 bc
	4,0		1,0	30,1 bc	5,6 bcd
		2,0	1,0	86,1 a	20,3 a
		4,0	1,0	7,9 de	5,2 bcd
2,0			2,5	29,6 bc	7,9 b
4,0			2,5	19,7 cde	1,7 cd
	2,0		2,5	26,5 bc	6,5 bc
	4,0		2,5	0 e	0 d
		2,0	2,5	43,6 b	8,9 b
		4,0	2,5	0 e	0 d
2,0			5,0	0 e	0 d
4,0			5,0	0 e	0 d
	2,0		5,0	0 e	0 d
	4,0		5,0	0 e	0 d
		2,0	5,0	0 e	0 d
		4,0	5,0	0 e	0 d

* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.

W przypadku eksplantatów wyłożonych na pożywkę bez regulatorów wzrostu nie obserwowano zachodzenia procesu somatycznej embriogenezy. Brak zarodków somatycznych stwierdzono również w przypadku eksplantatów wyłożonych na pożywki z dodatkiem BAP,

jako jedyne regulatora wzrostu. W przypadku pożywek uzupełnionych jedynie auksynami tworzenie się zarodków somatycznych obserwowano, gdy fragmenty tkanki kalusowej wykładano na podłoża z dodatkiem dicamby oraz NAA, jednak udział eksplantatów, w przypadku których obserwowano inicjację somatycznej embriogenezy, był niski (od 1,0 do 3,7%). Niewielka była również w tym przypadku liczba wykształconych zarodków – od 1,0 do 1,3 na jednym fragmencie tkanki kalusowej (tab. 9). W przypadku pożywek z dodatkiem pikloramu nie obserwowano indukcji somatycznej embriogenezy.

Dodatek BAP, w najniższym stężeniu $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ przy jednoczesnej obecności w pożywce auksyn (DIC, PIK i NAA), powodował zwiększenie się udziału eksplantatów formujących zarodki somatyczne oraz ich liczbę. Najwyższą częstość somatycznej embriogenezy stwierdzono w przypadku fragmentów tkanki kalusowej wyłożonych na pożywkę z dodatkiem $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i niższego z zastosowanych stężeń BAP – $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ – w przypadku tej kombinacji regulatorów wzrostu inicjację somatycznej embriogenezy obserwowano u 86,1% eksplantatów, na każdym z nich zaobserwowano średnio 20–30 zarodków somatycznych (tab. 9).

Dodatek do pożywki BAP stosowanej łącznie z auksynami: DIC, PIK i NAA w wyższym stężeniu – $2,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ – powodował zmniejszenie się częstości eksplantatów inicjujących zarodki somatyczne, jak i zmniejszenie ich liczby. W przypadku fragmentów tkanki kalusowej wyłożonej na pożywkę z dodatkiem $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP nie obserwowano wykształcania się zarodków somatycznych.

Wpływ zawartości poliamin stosowanych łącznie z NAA i BAP w pożywce na indukcję somatycznej embriogenezy w kulturach kalusowych

Stwierdzono zróżnicowaną reakcję eksplantatów na dodatek poliamin do pożywki (tab. 10). Dodatek putrescyny, stosowanej jako jedyny regulator wzrostu, niezależnie od zastosowanego stężenia, wpłynął negatywnie na tkankę roślinną – brązowiła ona i zamierała. Zarodki somatyczne obserwowano w przypadku fragmentów tkanki kalusowej wyłożonych na pożywkę z dodatkiem sperminy, stosowanej jako jedyny regulator wzrostu, jednak zarówno częstość zachodzenia tego procesu, jak i liczebność wykształconych zarodków, była niska. Natomiast dodatek do pożywek sperminy w stężeniu $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ stosowanej łącznie z NAA i BAP powodował zwiększenie się częstości inicjacji zarodków somatycznych.

Najkorzystniej na indukcję somatycznej embriogenezy działała spermidyna kiedy stosowano ją jako jedyny regulator wzrostu, w stężeniu $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ zarodki somatyczne obserwowano w przypadku 62,4% wyłożonych eksplantatów. Ich liczebność nie była jednak zbyt wysoka (od 2,7 do 5,8 zarodków na jednym eksplantacie). Najwyższą częstość eksplantatów inicjujących zarodki somatyczne oraz ich liczebność stwierdzono w przypadku kultur prowadzonych na pożywkę z dodatkiem $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ spermidyny, stosowanej łącznie z $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP (fot. 2d, e, f).

Tabela 10. Wpływ poliamin na somatyczną embriogenezę w kulturach kalusowych

Regulatory wzrostu (mg · dm ⁻³)	Udział eksplantatów formujących zarodki somatyczne (%)	Liczba wykształconych zarodków somatycznych na eksplantacie	
kontrola – brak regulatorów wzrostu	tkanka kalusowa żółknąca i zamierająca		
NAA + BAP	2,0 1,0	82,5 b	
		40,1 a	
Putrescyna + NAA + BAP	1,0 5,0	tkanka kalusowa żółknąca i zamierająca	
	1,0 2,0 1,0	85,3 ab	39,1 a
	5,0 2,0 1,0	79,1 b	33,1 a
Spermina + NAA + BAP	1,0 5,0	3,4 e	1,7 b
	1,0 2,0 1,0	11,2 e	2,1 b
	5,0 2,0 1,0	85,3 ab	40,1 a
		91,7 a	43,8 a
Spermidyna + NAA + BAP	1,0 5,0	43,2 d	2,7 b
	1,0 2,0 1,0	62,4 c	5,8 b
	5,0 2,0 1,0	90,8 a	43,1 a
		91,2 a	46,7 a

* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.

Wpływ składu mineralnego pożywki na indukcję somatycznej embriogenezy w kulturach kalusowych

Wykształcanie się zarodków somatycznych obserwowano w przypadku wszystkich zastosowanych w doświadczeniu składów mineralnych pożywek. Za najlepszy skład mineralny uznano pożywkę MS. Częstość indukcji zarodków somatycznych na tej pożywce była co prawda nieco niższa niż w przypadku zmodyfikowanej pożywki MS o zwiększonej dwukrotnie zawartości NH_4NO_3 , jednak jakość wykształconych zarodków była wyższa. Zarodki wykształcające się na pożywce o zwiększonej zawartości NH_4NO_3 i KNO_3 były często zniekształcone, bardzo jasne i nadmiernie uwodnione (tab. 11).

Tabela 11. Wpływ składu mineralnego pożywki na somatyczną embriogenezę w kulturach kalusowych

Pożywka	Udział eksplantatów formujących zarodki somatyczne (%)	Liczba wykształconych zarodków somatycznych na eksplantacie
MS	85,3 a	42,3 a
½ makro MS	40,3 d	14,6 b
2 × NH_4NO_3 MS	89,6 a	12,9 b
2 × KNO_3 MS	76,3 c	21,1 b
SH	4,5 e	2,0 c
B ₅	2,5 e	3,2 c

* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.

Somatyczna embriogeneza zachodziła ze znacznie niższą częstością, gdy eksplantaty wykładano na pożywkę MS, o zmniejszonej o połowę zawartości makroelementów, a nie zachodziła niemal wcale, gdy wykładano je na pożywkę B₅ – na pożywce tej zarodki somatyczne wykształciły się jedynie na 2,5% eksplantatów kalusowych oraz pożywkę SH – 4,5%.

Wpływ barwy światła na indukcję somatycznej embriogenezy w kulturach kalusowych

Stwierdzono istotny wpływ barwy światła na indukcję zarodków somatycznych – zachodziła ona z największą częstością, gdy kalus wystawiony był na działanie światła białego stosowanego łącznie z czerwonym. Liczebność zarodków somatycznych wykształconych na jednym fragmencie tkanki kalusowej była w tym przypadku najwyższa. Doświetlanie substytucyjne światłem niebieskim powodowało zamieranie tkanki kalusowej i brak oznak zachodzącej somatycznej embriogenezy. Hamująco na zajęcie procesu somatycznej embriogenezy działał również brak światła podczas samego indukowania somatycznej embriogenezy, jednak w przypadku tym nie obserwowano zamierania tkanki kalusowej (tab. 12).

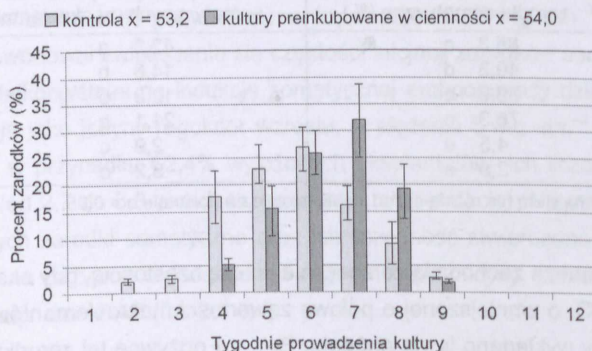
Tabela 12. Wpływ barwy światła na somatyczną embriogenezę w kulturach kalusowych

Światło	Udział eksplantatów formujących zarodki somatyczne (%)	Liczba wykształconych zarodków somatycznych na eksplantacie
Białe	86,3 b	41,3 a
Żółte	59,1 c	23,1 b
Czerwone	65,5 c	16,1 b
Mieszane (białe + czerwone)	100,0 a	55,1 a
Niebieskie	zamieranie tkanki kalusowej	
Brak (ciemność)	0,0 d	0,0 c

* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.

Dynamika indukcji zarodków somatycznych

Pierwsze zarodki somatyczne obserwowano po dwóch tygodniach od momentu założenia kultury, były one jednak bardzo nieliczne (2,1% sumy zainicjowanych zarodków po dwóch tygodniach i 2,9% po trzech). Istotne zwiększenie liczby formujących się zarodków somatycznych stwierdzono po czwartym tygodniu prowadzenia kultury, a ich największy procent po piątym i szóstym tygodniu prowadzenia kultury. Od 10. tygodnia nie obserwowano pojawiania się nowych zarodków (rys. 8).



Rys. 8. Częstość indukcji zarodków somatycznych w czasie trwania doświadczenia (x – średnia liczba zarodków formujących się na eksplantacie)

Przetrzymywanie tkanki kalusowej przed etapem inicjacji SE w ciemności przez dwa tygodnie nie spowodowało zwiększenia się liczebności zarodków inicjujących się na eksplantacie, ale zarodki tworzyły się w krótszym okresie, w sposób bardziej zsynchronizowany. Pierwsze formujące się zarodki zaobserwowano dwa tygodnie później niż w przypadku kultur prowadzonych w warunkach standardowo stosowanego fotoperiodu.

Wpływ przetrzymywania kultur w ciemności na indukcję somatycznej embriogenezy w kulturach kalusowych

Eksplantaty wyłożone na pożywkę MS bez regulatorów wzrostu, przetrzymywane przed rozpoczęciem etapu inicjacji SE bez dostępu światła przez trzy tygodnie, a następnie wystawione na działanie światła wykształcały zarodki z częstością 26,1% – średnio 5,2 na jednym fragmencie tkanki kalusowej. W przypadku kultur preinkubowanych w ciemności przez cztery tygodnie częstość, jak i liczba wykształconych zarodków, była znacznie niższa. W przypadku kultur preinkubowanych w ciemności przez 1–2 lub 5–8 tygodni nie obserwowano zachodzenia procesu somatycznej embriogenezy.

Tabela 13. Wpływ preinkubacji eksplantatów w ciemności na somatyczną embriogenezę w kulturach kalusowych

Tygodnie prowadzenia kultur w ciemności	Udział eksplantatów formujących zarodki somatyczne (%)	Liczba wykształconych zarodków somatycznych na eksplantacie
1	0 c	0 c
2	0 c	0 c
3	26,1 a	5,2 a
4	4,5 b	1,6 b
5	0 c	0 c
6	0 c	0 c
7	0 c	0 c
8	0 c	0 c

* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.

4.5. Inicjacja bezpośredniej somatycznej embriogenezy

Wpływ auksyn i BAP na indukcję bezpośredniej somatycznej embriogenezy

Stwierdzono istotny wpływ dodatku auksyn i BAP na częstość eksplantatów liściowych, w przypadku których obserwowano zachodzącą somatyczną embriogenezę, jak i na liczebność wykształconych zarodków. W przypadku pożywki kontrolnej, bez regulatorów wzrostu oraz pożywek uzupełnionych o BAP, pikloram i dicambę, stosowanych jako jedyny regulator wzrostu, nie obserwowano zarodków somatycznych. Zarodków somatycznych nie wykształciły również eksplantaty liściowe wyłożone na pożywki z dodatkiem BAP w najniższym stężeniu – $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz pikloramem i dicambą. Niewielką liczbę zarodków stwierdzono jedynie, kiedy stosowano najniższe stężenie BAP łącznie z NAA (tab. 14).

Tabela 14. Wpływ zawartości regulatorów wzrostu w pożywce na częstość fragmentów blaszek liściowych, na których formowały się zarodki somatyczne (%) oraz ich liczbę

Regulatory wzrostu ($\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)				Udział eksplantatów formujących zarodki somatyczne (%)	Liczba wykształconych zarodków somatycznych na eksplantacie
DIC	PIK	NAA	BAP		
kontrola – brak regulatorów wzrostu				0 d	0 c
			1,0	0 d	0 c
			2,0	0 d	0 c
			5,0	0 d	0 c
2,0	4,0		1,0	0 d	0 c
			2,0	0 d	0 c
2,0	4,0		1,0	0 d	0 c
			2,0	0 d	0 c
2,0	4,0	2,0	1,0	0 d	0 c
			2,0	0 d	0 c
2,0	4,0		1,0	0 d	0 c
			1,0	0 d	0 c
2,0	4,0	2,0	1,0	0 d	0 c
			1,0	0 d	0 c
2,0	4,0	4,0	1,0	3,4 cd	1,3 bc
			1,0	11,2 c	2,1 b
2,0	4,0		2,0	1,9 d	5,6 b
			2,0	2,3 d	4,5 b
2,0	4,0	2,0	2,0	1,1 d	1,2 bc
			2,0	1,3 d	1,4 bc
2,0	4,0	2,0	2,0	66,3 b	13,1 a
			2,0	100,0 a	17,6 a
2,0	4,0		5,0	0 d	0 c
			5,0	0 d	0 c
2,0	4,0		5,0	0 d	0 c
			5,0	0 d	0 c
2,0	4,0	2,0	5,0	0 d	0 c
			5,0	0 d	0 c
2,0	4,0	4,0	5,0	0 d	0 c
			5,0	0 d	0 c

* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.

Dodatek $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP do pożywek powodował istotne zwiększenie się częstości zachodzenia somatycznej embriogenezy, jak również wpływał korzystnie na liczebność wykształconych zarodków somatycznych. Obecność zarodków somatycznych stwierdzono nawet w przypadku pożywek z dodatkiem pikloramu i dicamby, choć zarówno liczebność zarodków, jak i częstość eksplantatów, w przypadku których obserwowano ich indukcję, nie była zbyt duża.

Wpływ poliamin oraz NAA i BAP na indukcję bezpośredniej somatycznej embriogenezy

Stwierdzono istotny wpływ poliamin: sperminy i spermidyny stosowanych samodzielnie lub jednocześnie z NAA i BAP na częstość eksplantatów formujących zarodki somatyczne oraz liczebność tworzących się zarodków (tab. 15). Zarodki somatyczne wykształcały się na fragmentach blaszek liściowych wyłożonych na wszystkie zastosowane w doświadczeniu pożywki, z wyjątkiem podłoży z dodatkiem putrescyny, stosowanej jako jedyny regulator wzrostu. Dodatek sperminy powodował istotne zwiększenie się wartości obu cech. Największą częstość eksplantatów formujących zarodki somatyczne (100%), jak i ich liczbę (17,6),

stwierdzono w przypadku fragmentów blaszek liściowych wyłożonych na pożywki uzupełnione $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ spermidyny i $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP (fot. 3).

Tabela 15. Wpływ poliamin na częstość fragmentów blaszek liściowych, na których formowały się zarodki somatyczne (%) oraz ich liczbę

Regulatory wzrostu ($\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)	Udział eksplantatów formujących zarodki somatyczne (%)	Liczba wykształconych zarodków somatycznych na eksplancie
NAA + BAP 4,0 2,0	100,0 a	17,1 c
1,0	0 c	0 d
Putrescyna + NAA + BAP 5,0	0 c	0 d
1,0 4,0 2,0	100,0 a	16,2 c
5,0 4,0 2,0	100,0 a	16,7 c
1,0	21,5 b	8,1 d
Spermina + NAA + BAP 5,0	24,3 b	7,9 d
1,0 4,0 2,0	100,0 a	37,4 b
5,0 4,0 2,0	100,0 a	35,1 b
1,0	100,0 a	3,1 d
Spermidyna + NAA + BAP 5,0	100,0 a	4,5 d
1,0 4,0 2,0	100,0 a	47,8 b
5,0 4,0 2,0	100,0 a	56,2 a

* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.

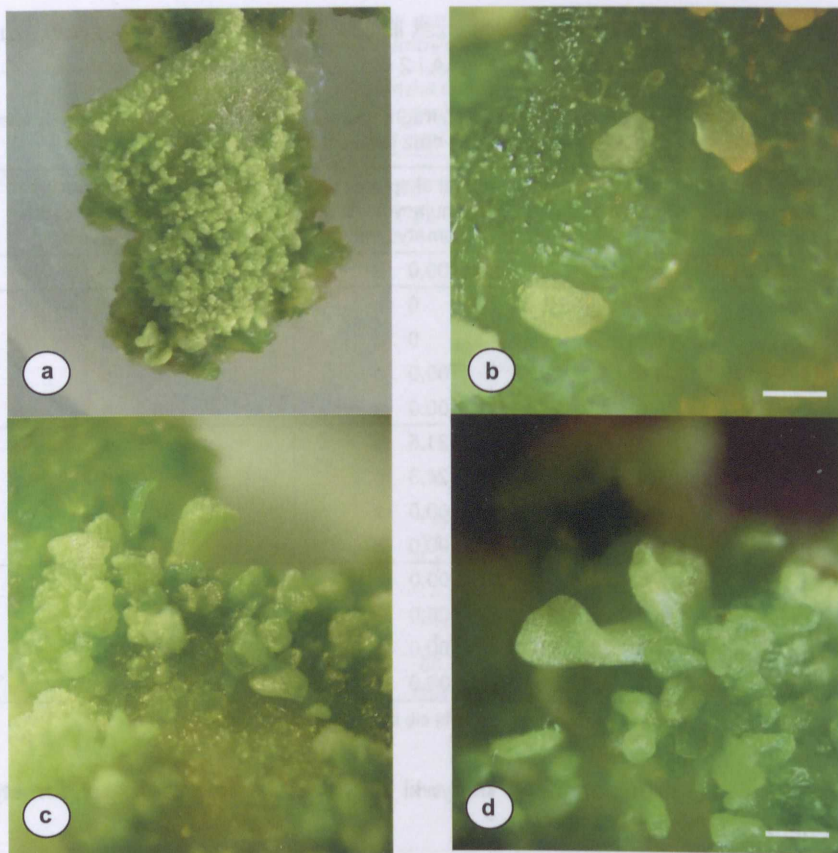
Wpływ składu mineralnego pożywki na indukcję bezpośredniej somatycznej embriogenezy

Formowanie się zarodków somatycznych obserwowano w przypadku wszystkich eksplantatów wyłożonych na pożywkę MS oraz zawierającą $\frac{1}{2}$ zawartości makroelementów pożywki MS. Zarodki wykształcające się na pożywce o zwiększonej zawartości NH_4NO_3 i KNO_3 były często zniekształcone, bardzo jasne i nadmiernie uwodnione (tab. 16). Somatyczna embriogeneza nie zachodziła wcale, kiedy eksplantaty wykładano na pożywkę B_5 i SH.

Tabela 16. Wpływ składu mineralnego pożywki na częstość fragmentów blaszek liściowych, na których formowały się zarodki somatyczne (%) oraz ich liczbę

Pożywka	Udział eksplantatów formujących zarodki somatyczne (%)	Liczba wykształconych zarodków somatycznych na eksplancie
MS	100,0 a	56,2 a
$\frac{1}{2}$ makro MS	100,0 a	24,6 b
$2 \times \text{NH}_4\text{NO}_3$ MS	89,6 ab	17,9 b
$2 \times \text{KNO}_3$ MS	76,3 b	11,1 bc
SH	0 c	0 c
B_5	0 c	6,2 c

* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.



Fot. 3. Fragment blaszki liściowej (a) wyłożony na pożywkę MS z dodatkiem $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP oraz $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ SPMD z widocznymi na jej powierzchni licznymi zarodkami somatycznymi. Zarodki somatyczne otrzymane na drodze bezpośredniej SE w różnych stadiach rozwojowych w obrazie mikroskopu świetlnego (b, c, d, kreska oznacza 1 mm)

Wpływ barwy światła na indukcję bezpośredniej somatycznej embriogenezy

Stwierdzono istotny wpływ barwy światła na częstość indukcji zarodków somatycznych. Zarodki somatyczne obserwowano w przypadku wszystkich fragmentów liści wystawionych na działanie światła białego oraz białego stosowanego łącznie z czerwonym (tab. 17). Największą liczbę wykształconych zarodków somatycznych stwierdzono w przypadku kultur doświetlanych substytucyjnie światłem białym, stosowanym łącznie z czerwonym – na jednym eksplancie wykształciło się 65,1 zarodków somatycznych. Doświetlanie światłem niebieskim, podobnie jak w przypadku kultur kalusowych, powodowało całkowite zahamowanie indukcji i wzrostu zarodków somatycznych. Hamująco na zajście procesu somatycznej embriogenezy działał również brak światła.

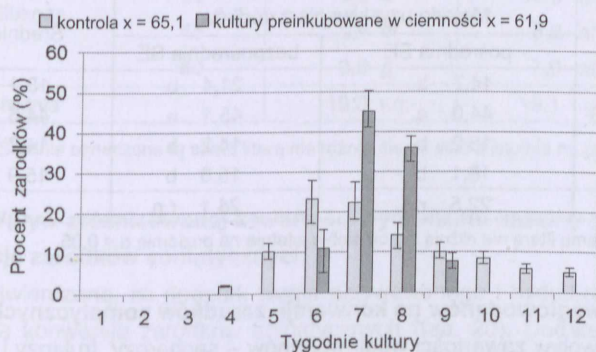
Tabela 17. Wpływ warunków świetlnych prowadzenia kultury na częstość fragmentów blaszek liściowych formujących zarodki somatyczne (%) oraz ich liczbę

Światło	Udział eksplantatów formujących zarodki somatyczne (%)	Liczba wykształconych zarodków somatycznych na eksplantacie
Białe	100,0 a	52,3 b
Żółte	74,2 b	36,1 c
Czerwone	89,1 b	31,2 c
Mieszane (białe + czerwone)	100,0 a	65,1 a
Niebieskie	0,0 c	0,0 e
Brak (ciemność)	0,0 c	0,0 d

* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.

Dynamika indukcji zarodków somatycznych

Przetrzywanie eksplantatów w ciemności, przed założeniem doświadczenia, nie wpłynęło istotnie na liczbę formowanych zarodków. Zmieniła się natomiast dynamika ich indukcji. Pierwsze zarodki somatyczne w kulturach prowadzonych przy standardowo stosowanym 16-godzinnym doświetlaniu światłem białym obserwowano po czterech tygodniach od momentu założenia kultury (rys. 9). Istotne zwiększenie się częstości eksplantatów inicjujących somatyczną embriogenezę stwierdzono dopiero po pięciu tygodniach prowadzenia kultury (rys. 9). Największy procent formujących się zarodków somatycznych obserwowano w szóstym i siódmym tygodniu prowadzenia kultury.



Rys. 9. Częstość indukcji zarodków somatycznych (%) w czasie trwania doświadczenia (x – średnia liczba zarodków formujących się na eksplantacie)

Zwiększającą się liczbę zarodków somatycznych obserwowano co tydzień, aż do zakończenia kultury w 12. tygodniu, przy czym począwszy od 11. tygodnia prowadzenia kultury następowało stopniowe brązowienie i zamieranie zaindukowanych zarodków somatycznych. W przypadku kultur przetrzymywanych w ciemności przed etapem indukcji SE, czas pojawiania się zarodków somatycznych był bardziej wyrównany – obserwowano je w okresie od szóstego do dziewiątego tygodnia, przy czym aż 45,1% zarodków zaobserwowano w siódmym tygodniu prowadzenia doświadczenia a 36,3% w ósmym tygodniu.

W obu przypadkach formujące się zarodki nie były wyrównane rozwojowo – jednocześnie na tym samym eksplantacie obserwowano zarodki w stadium globularnym, sercowatym i torpedy.

4.6. Dojrzewanie i konwersja zarodków somatycznych

Wpływ składu mineralnego pożywki na konwersję zarodków somatycznych

Podłożem najlepszym do konwersji zarodków somatycznych okazała się pożywka MS ze zmniejszoną o połowę zawartością makroelementów (tab. 18). Zwiększenie się częstości konwersji zarodków w stosunku do pełnej pożywki MS było szczególnie dobrze widoczne w przypadku bezpośredniej somatycznej embriogenezy – częstość konwersji zwiększyła się z 14,7 do 44,0% (tab. 18). Zmniejszenie o połowę zawartości w pożywce jedynie NH_4NO_3 i KNO_3 spowodowało nieznaczne zwiększenie częstości konwersji zarodków somatycznych w stosunku do pożywki MS, ale różnice te nie były istotne statystycznie. Sposób uzyskiwania zarodków (na drodze pośredniej somatycznej embriogenezy w kulturach kalusowych czy bezpośredniej – w kulturach liściowych) nie miał wpływu na omawianą cechę.

Tabela 18. Konwersja zarodków somatycznych (%) uzyskanych na drodze pośredniej i bezpośredniej somatycznej embriogenezy, wyłożonych na pożywki o zróżnicowanej zawartości składników mineralnych

Pożywka	Metoda uzyskiwania zarodków		Średnia
	pośrednia SE	bezpośrednia SE	
MS	14,7 b	21,4 b	18,1 b
½ makroelementów MS	44,0 a	45,1 a	44,6 a
½ NH_4NO_3 MS	15,2 b	14,2 b	14,7 b
½ KNO_3 MS	16,1 b	15,6 b	15,9 b
Średnia	22,5 r.n.	24,1 r.n.	

* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.

Wpływ zawartości węglowodanów na konwersję zarodków somatycznych

Stwierdzono istotny wpływ zawartości węglowodanów – sacharozy, fruktozy i glukozy – w pożywkach na konwersję wyłożonych na nie zarodków (tab. 19). Najkorzystniej na konwersję zarodków somatycznych chryzantemy działała sacharoza w stężeniu $45 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, w przypadku której, na pożywce o zawartości składników mineralnych obniżonej o połowę w stosunku do MS, stwierdzono kiełkowanie 56,1% zarodków somatycznych uzyskanych na drodze pośredniej embriogenezy i aż 53,1% uzyskanych na drodze bezpośredniej somatycznej embriogenezy (tab. 19).

Zwiększenie stężenia sacharozy do $60 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ powodowało obniżenie się częstotliwości konwersji zarodków somatycznych. Dodatek do pożywki glukozy i fruktozy, w stężeniu od 15 do $60 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, powodował istotne obniżenie częstości konwersji zarodków somatycznych w kulturach *in vitro*. Najniższą częstość konwertujących zarodków obserwowano

w przypadku zarodków wyłożonych na pożywki z dodatkiem najniższego ($15 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) i najwyższego ($60 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) stężenia glukozy – od 0,7 do 1,2 i od 0,7 do 7,9, w zależności od rodzaju somatycznej embriogenezy. Niezależnie od warunków kultury stwierdzono, że sposób uzyskiwania zarodków somatycznych (embriogeneza pośrednia albo bezpośrednia) nie miał istotnego znaczenia dla częstości konwertujących zarodków.

Tabela 19. Konwersja zarodków somatycznych (%) uzyskanych na drodze pośredniej i bezpośredniej somatycznej embriogenezy, wyłożonych na pożywki o zróżnicowanej zawartości węglowodanów

Zawartość węglowodanów ($\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$)	Metoda uzyskiwania zarodków		Średnia	
	pośrednia SE	bezpośrednia SE		
Sacharoza	15	21,3 c	40,6 c	31,0 c
	30	43,2 b	44,9 b	44,1 b
	45	56,9 a	53,1 a	55,0 a
	60	20,5 c	32,4 d	26,5 d
Fruktoza	15	6,3 f	5,6 fg	6,0 gh
	30	15,2 d	10,2 e	12,7 ef
	45	21,3 c	9,6 e	15,5 e
	60	20,1 c	4,6 gh	12,4 ef
Glukoza	15	1,2 g	0,7 h	1,0 i
	30	11,3 e	10,6 e	11,0 fg
	45	9,4 ef	8,9 ef	9,2 fg
	60	0,9 g	7,9 efg	4,4 hi
Średnia	19,0 r.n.	19,1 r.n.		

* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.

Wpływ zróżnicowanej zawartości hydrolizatu kazeiny i węgla aktywowanego na konwersję zarodków somatycznych

Stwierdzono, że dodatek węgla aktywowanego i hydrolizatu kazeiny wpływał negatywnie na konwersję zarodków somatycznych (tab. 20). Dodatek do pożywek hydrolizatu kazeiny, w najniższym z zastosowanych stężeń – $0,1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ – nie miał istotnego wpływu. W wyższych stężeniach – $0,5$ i $1,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ – działał negatywnie na ten proces. Negatywny wpływ na częstość kiełkujących zarodków stwierdzono już w przypadku najniższego stężenia węgla aktywowanego – $0,1\%$ – na podłożu tym konwertowano jedynie $12,5\%$ kiełkujących zarodków w przypadku pośredniej i $16,5\%$ w przypadku bezpośredniej embriogenezy. Wraz z rosnącym stężeniem węgla aktywowanego w pożywce malała częstość zarodków somatycznych ulegających konwersji, niezależnie od sposobu ich uzyskania.

Tabela 20. Konwersja zarodków somatycznych (%) uzyskanych na drodze pośredniej i bezpośredniej somatycznej embriogenezy, wyłożonych na pożywkę o zróżnicowanej zawartości hydrolizatu kazeiny i węgla aktywowanego

Zawartość składników (g · dm ⁻³)	Metoda uzyskiwania zarodków		Średnia
	pośrednia SE	bezpośrednia SE	
Kontrola	45,2 a	44,1 a	51,2 a
Hydrolizat kazeiny (HC)	0,1	46,2 a	47,1 a
	0,5	17,6 b	10,4 bc
	1,0	9,2 b	12,3 b
Węgiel aktywowany (AC)	0,1	12,5 b	16,5 b
	0,5	10,6 b	5,2 cd
	1,0	1,5 c	0 d
Średnia	20,4 r.n.	19,4 r.n.	

* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.

Wpływ barwy światła na konwersję zarodków somatycznych

Doświetlanie substytucyjne światłem o różnej barwie w sposób istotny wpłynęło na konwersję zarodków uzyskanych na drodze bezpośredniej i pośredniej SE (tab. 21). Najwyższą częstość kiełkowania uzyskano kiedy prowadzono je bez dostępu światła i wahała się ona od 48 do 49%, w zależności od pochodzenia zarodków. Zarodki doświetlane światłem niebieskim nie kiełkowały w ogóle, a w przypadku doświetlania kultur pozostałymi rodzajami światła częstość kiełkowania w sposób istotny się zmniejszyła.

Tabela 21. Konwersja zarodków somatycznych (%) uzyskanych na drodze pośredniej i bezpośredniej somatycznej embriogenezy w kulturach doświetlanych różnymi rodzajami światła

Światło	Metoda uzyskiwania zarodków		Średnia
	pośrednia SE	bezpośrednia SE	
Białe	22,0 bc	26,4 bc	24,2 cd
Żółte	12,2 c	16,5 c	14,4 d
Niebieskie	0,0 d	0,0 d	0,0 e
Czerwone	3,2 b	29,2 b	16,2 b
Mieszane (białe + czerwone)	29,4 b	26,4 bc	27,9 bc
Brak (ciemność)	49,0 a	48,0 a	48,5 a
Średnia	19,3 r.n.	24,4 r.n.	

* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.

Wpływ moczenia w roztworze ABA na konwersję zarodków somatycznych

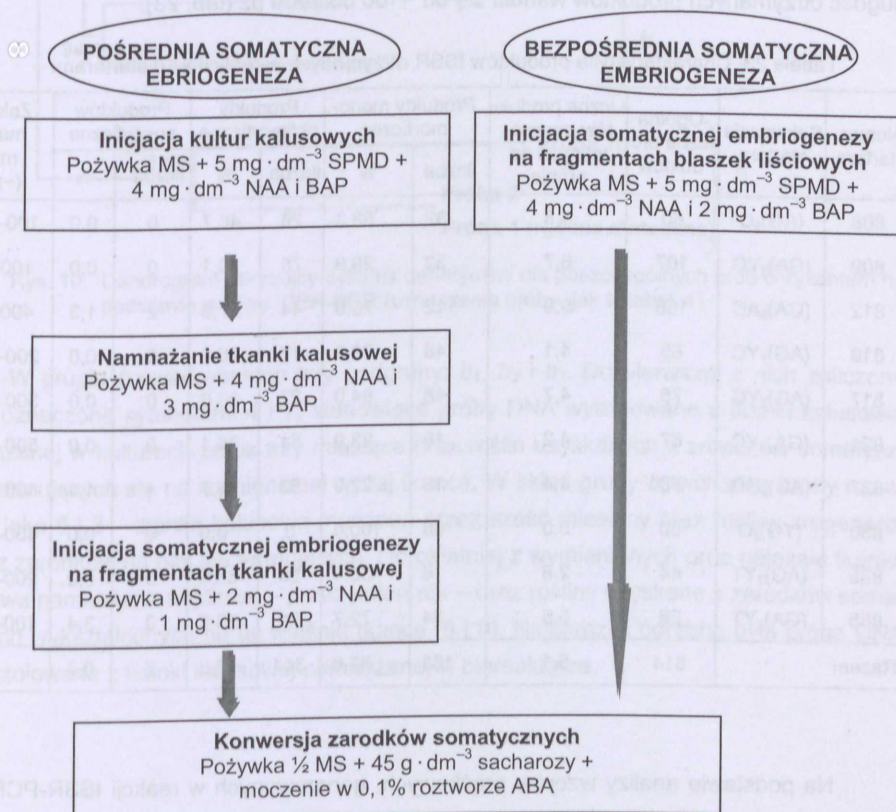
Stwierdzono istotny wpływ zawartości ABA na konwersję zarodków somatycznych chryzantem. Zastosowanie ABA w najniższym stężeniu – 0,1 mg · dm⁻³ – działało korzystnie w przypadku zarodków somatycznych uzyskanych na drodze pośredniej SE – częstość konwersji zwiększyła się do 80,1%. Korzystny efekt zmniejszył się wraz ze wzrostem stężenia ABA, a jego zwiększenie powyżej 0,3 mg · dm⁻³ powodowało zamieranie zarodków (tab. 22).

Tabela 22. Konwersja zarodków somatycznych (%) moczonych w roztworze ABA

Zawartość ABA ($\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)	Metoda uzyskiwania zarodków		Średnia
	pośrednia SE	bezpośrednia SE	
kontrola – zarodki nietraktowane ABA	66,3 b	69,2 b	67,8 b
0,1	80,1 a	84,3 a	82,2 a
0,2	42,1 c	50,6 b	46,4 b
0,3	0 d	6,0 d	3,0 d
0,4	0 d	0 d	0,0 d
0,5	0 d	0 d	0,0 d
Średnia	31,4 r.n.	35,0 r.n.	

* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$.

4.7. Proponowany protokół pozyskiwania zarodków somatycznych chryzantemy wielokwiatowej w kulturach *in vitro*



4.8. Wpływ warunków prowadzenia kultury na zmienność somaklonalną określaną metodą ISSR-PCR

Na podstawie przeprowadzonych reakcji ISSR-PCR i analizy obrazów rozdzielu stwierdzono różnice genetyczne pomiędzy próbkami DNA, wyizolowanego z fragmentów tkanki kalusowej oraz roślin regenerowanych w różnych warunkach.

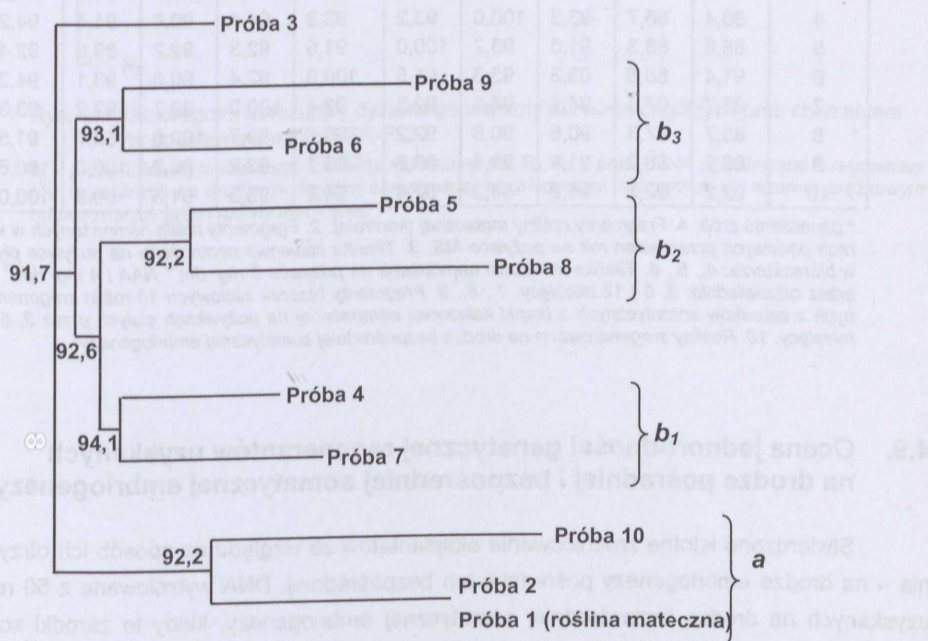
Wszystkie wybrane do badań startery generowały produkty reakcji ISSR-PCR uwiidocznione na 2-procentowych żelach agarozowych. Różnice między badanymi próbkami można było określić na podstawie większości starterów, wyjątkiem był tu starter 830, za pomocą którego uzyskano jedynie produkty monomorficzne. Wśród produktów polimorficznych – sześć było specyficznych i powstały one w wyniku działania trzech starterów (855, 827, 812, tab. 23). Ogółem w doświadczeniu dla badanych matryc DNA otrzymano 814 produktów ISSR-PCR, przy czym jeden zastosowany do reakcji starter amplifikował ich średnio 5,1. Wśród otrzymanych produktów 344 miały charakter polimorficzny, 464 było monomorficznych i tylko 6 było specyficznych genotypowo. Wśród badanego materiału najliczniejszą grupę produktów (158) generował starter 812, natomiast najmniej starter 835 (44 produkty). Długość otrzymanych produktów wahała się od ~100 do 1900 pz (tab. 23).

Tabela 23. Charakterystyka produktów ISSR otrzymanych w reakcji z 10 starterami

Numer startera	Sekwencja startera	Ogólna liczba produktów	Liczba produktów generowanych na próbce	Produkty monomorficzne		Produkty polimorficzne		Produktów specyficzne		Zakres: max.–min. (~pz)
				liczba	%	liczba	%	liczba	%	
808	(AG) ₈ C	60	3,8	32	53,3	28	46,7	0	0,0	100–1200
809	(GA) ₈ YG	107	6,7	32	29,9	75	70,1	0	0,0	100–700
812	(GA) ₈ AC	158	9,9	112	70,9	44	27,8	2	1,3	400–700
816	(AG) ₇ YC	65	4,1	48	73,8	17	26,2	0	0,0	200–1700
817	(AG) ₈ YG	75	4,7	48	64,0	27	36,0	0	0,0	300–1900
821	(GA) ₈ YC	67	4,2	16	23,9	51	76,1	0	0,0	500–1400
827	(AC) ₈ GG	70	4,4	16	22,9	53	75,7	1	1,4	400–1500
830	(TG) ₈ G	80	5,0	80	100,0	0	0,0	0	0,0	400–1000
835	(AG) ₇ YT	44	2,8	16	36,4	28	63,6	0	0,0	200–1100
855	(GA) ₇ YT	88	5,5	64	72,7	21	23,9	3	3,4	100–1200
Razem		814	5,1	464	57,0	344	42,3	6	0,7	

Na podstawie analizy wzorów prążkowych, generowanych w reakcji ISSR-PCR, wykreślono dendrogram obrazujący dystans genetyczny. Na podstawie dendrogramu próby podzielono na dwie grupy podobieństwa: *a* i *b* (rys. 10). Pomiędzy próbą DNA izolowaną

z rośliny matecznej oraz roślin namnażanych w kulturach pędowych na pożywce MS bez dodatku regulatorów wzrostu stwierdzono 100-procentowe podobieństwo. Zaliczono je do grupy *a* wspólnie z próbą DNA wyizolowaną z roślin zregenerowanych z zarodków uzyskanych na drodze bezpośredniej SE, na fragmentach blaszek liściowych (10). Podobieństwo pomiędzy badanymi próbami wynosiło 92,2% (tab. 24).



Rys. 10. Dendrogram obrazujący dystans genetyczny dla poszczególnych prób chryzantem na podstawie analizy ISSR-PCR (oznaczenia prób – jak w tabeli 1)

W grupie *b* wyodrębniono trzy podgrupy: *b*₁, *b*₂ i *b*₃. Do pierwszej z nich zaliczono próby oznaczone symbolami 4 i 7, stanowiące próby DNA wyizolowane z tkanki kalusowej namnażanej w kulturach przez trzy miesiące oraz roślin uzyskanych z zarodków somatycznych formujących się na wymienionej wyżej tkance. W skład grupy *b*₂ wchodziły próby oznaczone jako 5 i 8 – tkanka kalusowa mnożona przez sześć miesięcy oraz rośliny zregenerowane z zarodków na niej się formujących. Do ostatniej z wymienionych grup należała tkanka kalusowa namnażana najdłużej – przez jeden rok – oraz rośliny uzyskane z zarodków somatycznych wykształconych na tej właśnie tkance (6 i 9). Najbardziej odrębna była próba DNA (3) wyizolowana z tkanki kalusowej namnażanej w bioreaktorze.

Tabela 24. Podobieństwo (%) między badanymi próbkami zbiorczymi DNA wyizolowanego z tkanek chryzantemy wielkokwiatowej regenerowanych różnymi metodami

Numer próby*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	100,0	100,0	90,4	90,4	88,5	91,4	87,7	85,7	92,2	92,2
2	100,0	100,0	90,3	86,7	88,3	88,5	87,5	87,3	86,2	87,7
3	90,4	90,3	100,0	93,3	91,5	93,3	94,1	90,6	91,4	94,2
4	90,4	86,7	93,3	100,0	93,2	93,3	94,1	90,6	91,4	94,2
5	88,5	88,3	91,5	93,2	100,0	91,5	92,3	92,2	89,5	92,4
6	91,4	88,5	93,3	93,3	91,5	100,0	92,4	90,6	93,1	94,2
7	87,7	87,5	94,1	94,1	92,3	92,4	100,0	89,7	92,2	93,3
8	85,7	87,3	90,6	90,6	92,2	90,6	89,7	100,0	86,7	91,5
9	88,3	86,2	91,4	91,4	89,5	93,1	92,2	86,7	100,0	90,6
10	92,2	92,2	94,2	94,2	92,4	94,2	93,3	91,5	90,6	100,0

* oznaczenia prób: 1. Fragmenty rośliny matecznej (kontrola). 2. Fragmenty roślin namnażanych w kulturach pędowych przez jeden rok na pożywce MS. 3. Tkanka kalusowa namnażana na pożywce płynnej w bioreaktorze. 4., 5., 6. Tkanka kalusowa namnażana na pożywce $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP przez odpowiednio: 3, 6 i 12 miesięcy. 7., 8., 9. Fragmenty blaszek liściowych 10 roślin zregenerowanych z zarodków somatycznych z tkanki kalusowej namnażanej na pożywkach stałych przez 3, 6 i 12 miesięcy. 10. Rośliny zregenerowane na drodze bezpośredniej somatycznej embriogenezy.

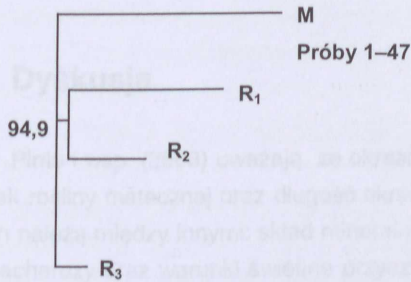
4.9. Ocena jednorodności genetycznej regenerantów uzyskanych na drodze pośredniej i bezpośredniej somatycznej embriogenezy

Stwierdzono istotne zróżnicowanie eksplantatów ze względu na sposób ich otrzymania – na drodze embriogenezy pośredniej lub bezpośredniej. DNA wyizolowane z 50 roślin uzyskanych na drodze bezpośredniej somatycznej embriogenezy, kiedy to zarodki somatyczne formowały się bezpośrednio na fragmentach blaszek liściowych, bez fazy namnażania tkanki kalusowej. Zgodnie z opracowanym protokołem (rozdział 4.7) charakteryzowały się wzorem prążkowym identycznym jak DNA wyizolowane z rośliny matecznej.

W populacji roślin uzyskanych z zarodków somatycznych formujących się na fragmentach tkanki kalusowej stwierdzono niższy stopień jednorodności genetycznej – 47 z badanych 50 regenerantów miało taki sam wzór prążkowy jak roślina mateczna. Trzy spośród badanych regenerantów różniły się od siebie (tab. 25, rys. 11). Podobieństwo pomiędzy wymienionymi regenerantami a rośliną wyjściową wynosiło od 93,3 do 95,8%.

Tabela 25. Podobieństwo (%) między badanymi próbkami DNA wyizolowanego z rośliny matecznej i 50 regenerantów, uzyskanych na drodze pośredniej somatycznej embriogenezy według opracowanego protokołu

Numer próby	M, próby 1–47	48	49	50
M, próby 1–47	100,0	93,3	94,9	95,8
R1	93,3	100,0	92,2	93,1
R2	94,9	92,2	100,0	97,5
R3	95,8	93,1	97,5	100,0



Rys. 11. Dendrogram obrazujący dystans genetyczny dla poszczególnych prób chryzantem na podstawie analizy ISSR-PCR

M – próba DNA wyizolowanego z rośliny matcznej, *R*₁, *R*₂, *R*₃ – próby DNA wyizolowane z regenerantów uzyskanych na drodze pośredniej somatycznej embriogenezy, różniących się wzorem prążkowym od pozostałych prób i rośliny matcznej.

5. Dyskusja

Pinto i wsp. (2008) uważają, że określenie istotnych czynników wewnętrznych, takich jak wiek rośliny matecznej oraz długość okresu prowadzenia kultury, jak i zewnętrznych, do których należą między innymi: skład mineralny pożywki, jej pH, zawartość regulatorów wzrostu i sacharozy oraz warunki świetlne przyczyniają się zwykle do zwiększenia efektywności SE i pozwalają na komercyjne zastosowanie opracowanego protokołu.

W literaturze przedmiotu znane są przypadki uzyskania roślin za pośrednictwem somatycznej embriogenezy jednoetapowo, ale wydajność tego procesu jest zwykle niewielka. W badaniach Mandal i Datta (2005) skielkowało jedynie 2% zaindukowanych zarodków chryzantemy wielkokwiatowej, pozostawionych na podłożu inicjalnym. Proces somatycznej embriogenezy wymaga zwykle kilkakrotnego przenoszenia eksplantatów na pożywki o zróżnicowanej zawartości zarówno składników mineralnych, jak i regulatorów wzrostu. Często konieczna jest również zmiana fizycznych warunków prowadzenia tego procesu. Stasolla i wsp. (2002) podzielili proces somatycznej embriogenezy na trzy etapy: inicjację i namnażanie embriogennej tkanki kalusowej, indukcję zarodków somatycznych oraz ich dojrzewanie i kiełkowanie. Również Anjaneyulu i wsp. (2004) prowadzili proces somatycznej embriogenezy w kulturach migdałecznika chebulowca (*Terminalia chebula*) z rodziny *Asteraceae* kilkuetapowo. Rozpoczęli go od inicjacji kalusa pod wpływem różnych stężeń 2,4-D i kinetyny, jego namnażania, inicjacji formowania się zarodków somatycznych i ich dojrzewania pod wpływem ABA i sacharozy oraz kiełkowania pod wpływem GA₃, IBA i IAA.

W badaniach własnych zastosowano dwie procedury uzyskiwania roślin z zarodków somatycznych: pierwszą – uproszczoną, bezpośrednią SE, kiedy to indukowano je w kulturach liściowych, a następnie przenoszono na podłoża regeneracyjne oraz drugą – kilkuetapową metodykę pozyskiwania zarodków somatycznych (pośrednią SE). Tkankę kalusową według tej metodyki indukowano na pożywkach zestalonych agarem, z dodatkiem auksyn (2,4-D, NAA, IBA, IAA, pikloramu i dicamby), cytokininy BAP oraz poliamin (putrescyny, sperminy i spermidyny). Kalus zainicjowany w pierwszym etapie badań namnażano na pożywkach stałych, z dodatkiem wymienionych wcześniej auksyn, cytokininy BAP i poliamin. Równocześnie określono wpływ zawartości składników mineralnych w podłożu na namnażanie się tkanki kalusowej na pożywkach płynnych, w bioreaktorze. Tkankę kalusową namnożoną na pożywkach stałych oraz fragmenty blaszek liściowych wykorzystano jako eksplantaty w kolejnym etapie badań – indukowano zarodki somatyczne, a następnie regenerowano je jednoetapowo, na pożywkach o zróżnicowanej zawartości składników mineralnych, wzbogaconych o węgiel aktywowany i hydrolizat kazeiny. Szczególną uwagę zwrócono na wpływ natężenia napromienienia kwantowego i barwy światła na przebieg omawianego procesu. W końcowym etapie badań określono wpływ długości okresu prowadzenia kultury oraz sposobu regeneracji na zmienność somaklonalną, określono również jednorodność genetyczną

zregenerowanych chryzantem uzyskanych na drodze somatycznej, pośredniej i bezpośrednio embriogenezy w kulturach *in vitro* według proponowanego protokołu.

5.1. Wpływ auskyn i BAP na prowadzenie kultur kalusowych

Jak podkreślają niemal wszyscy autorzy, głównym czynnikiem mającym wpływ na inicjację kultur kalusowych jest obecność regulatorów wzrostu w pożywce (Pretto i Santarem 2000, Bach 2001, Delporte i wsp. 2001, Tian i wsp. 2003). Na etapie inicjacji eksplantaty wykłada się zwykle na podłoża zawierające wysokie stężenia auskyn (najczęściej 2,4-D i NAA). Działanie auskyn wzmacniane jest często przez równoczesne stosowanie cytokinin, zwłaszcza BAP. Hitmi i wsp. (1999) inicjowali kultury kalusowe wrotycza dalmatyńskiego, wykładając fragmenty kwiatostanów na pożywki uzupełnione od 0 do $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i BAP. Indukcję tkanki kalusowej obserwowano jedynie wtedy, kiedy oba wymienione regulatory wzrostu obecne były w pożywce. Tkanka kalusowa nie wykształciła się na żadnym z eksplantatów pierwotnych, kiedy wykładano je na pożywkę z dodatkiem NAA, jako jedyne regulatora wzrostu. Udział eksplantatów inicjujących tkankę kalusową był najwyższy (od 60 do 95%), kiedy wykładano je na pożywkę o wysokim stężeniu NAA ($4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) i niskim BAP (0,2 i $0,4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Wraz ze wzrostem stężenia BAP malała częstość eksplantatów wykształcających tkankę kalusową.

W badaniach własnych eksplantaty liściowe chryzantemy wielokwiatowej wykazały różną reakcję na skład hormonalny pożywki, czego efektem była zróżnicowana zdolność do inicjacji i przyrostu tkanki kalusowej. W przeciwieństwie do badań Hitmi i wsp. (1999), inicjację tkanki kalusowej obserwowano również na pożywkach uzupełnionych jedynie auskynami. Na pożywkach uzupełnionych NAA oraz wybranymi stężeniami pikloramu i dicamby tkanka kalusowa wykształciła się na wszystkich wyłożonych na pożywkę fragmentach blaszek liściowych. Podobnie jak w badaniach powyższych autorów masa tkanki kalusowej była wyższa, gdy do pożywek inicjujących, oprócz auskyn, dodawano cytokininę BAP.

Wyniki badań własnych pozostają zgodne z badaniami Tanaka i wsp. (2000), którzy prowadząc badania nad indukcją kultur kalusowych chryzantemy wielokwiatowej stwierdzili, że w kulturach *in vitro* najkorzystniej na indukcję tkanki kalusowej działa dodatek do pożywki $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP w połączeniu z $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ IAA lub $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA – wszystkie eksplantaty liściowe wyłożone na te rodzaje pożywek wykształciły tkankę kalusową. W badaniach własnych kompozycją NAA i BAP najlepszą do indukowania kultur kalusowych była pożywka z dodatkiem $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ wymienionych regulatorów wzrostu. Do podobnego wniosku doszli Keskitalo i wsp. (1995), którzy za najbardziej przydatną do inicjacji kultur kalusowych wrotycza pospolitego z rodziny *Asteraceae* uznali pożywkę MS z dodatkiem $4,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i BAP.

Namnażanie tkanki kalusowej na pożywkach stałych może być przyspieszone przez zastosowanie pożywek płynnych, wytrząsanych lub prowadzonych w bioreaktorach. Produktowność kultur zawieszinowych jest zależna od gatunku rośliny oraz od sposobu i warunków prowadzenia kultury. Maksymalną suchą masę (8,1 g) w kulturach zawieszinowych szalwii

czerwonokorzeniowej (*Salvia miltiorrhiza*) osiągnięto w 21. dniu prowadzenia kultury (Zhao i wsp. 2010), natomiast w kulturach zawieszinowych dziurawca zwyczajnego uzyskano jedynie 2,6 g SM na jeden litr pożywki (Walker i wsp. 2002). W badaniach Kochan i Chmiela (2010) nad produkcją saponin w kulturach zawieszinowych żeńszenia pięciolistnego (*Panax quinquefolium*) uzyskano po 40 dniach prowadzenia kultury około 6 g SM na litr pożywki, z początkowo inokulowanej 0,86 g SM. W badaniach własnych uzyskano 7,2 g \cdot dm⁻³ SM (121,3 g świeżej masy) na jeden litr pożywki po 28 dniach prowadzenia kultury.

W trakcie prowadzenia kultur kalusowych na pożywce płynnej jednym z głównych czynników limitujących wzrost jest zawartość jonów azotu oraz stosunek jonów NH_4^+ do NO_3^- . Są one pobierane w pierwszej kolejności na początku kultury. Badania nad optymalizacją stosunku NH_4^+ i NO_3^- w kulturach pędowych chryzantemy wielkokwiatowej, prowadzonych w bioreaktorze balonowym, prowadzili Sivakumar i wsp. (2005). Uzupełniając pożywkę płynną zróżnicowaną ilością NH_4Cl i KNO_3 stwierdzili, że stosunek jonów amonowych do azotanowych jest istotnym czynnikiem warunkującym wzrost roślin. Za najbardziej odpowiedni uznali oni stosunek NH_4^+ i NO_3^- – 20 : 40. Polecany przez wymienionych autorów stosunek jonów amonowych do azotanowych uznany został również w niniejszej pracy za najbardziej odpowiedni do prowadzenia kultur kalusowych u tego gatunku. Jest to zgodne z badaniami Nowak i wsp. (2007), którzy badali wpływ zawartości w pożywce jonów NH_4^+ i NO_3^- na powstawanie tkanki kalusowej i regenerację śliwy domowej (*Prunus domestica*). Stwierdzili oni, że przetrzymywanie eksplantatów na pożywkach o podwyższonej zawartości NH_4^+ powodowało wystąpienie wityfikacji, co miało negatywny wpływ na wzrost pędów.

Ponieważ jony NH_4^+ pobierane są w znacznie większej ilości niż jony azotanowe, wiąże się to z szybkim spadkiem pH pożywki. Jednocześnie wiadomo, że zakwaszenie podłoża promuje pobieranie azotanów, dlatego też ustalenie zawartości jonów amonowych i azotanowych w konkretnym momencie prowadzenia kultury jest niezbędne do opracowania wydajnej metody produkcji tkanki kalusowej (Morard i wsp. 1998, Dantas i wsp. 2001, Shin i wsp. 2002). Z badań Schmitz i Lorz (1990) wynika, że większość jonów amonowych zostało pobranych w ciągu pierwszych godzin prowadzenia kultur zawieszinowych ryżu siewnego. W badaniach Wang i wsp. (2010) nad produkcją glikozydów w kulturach zawieszinowych żeńszenia właściwego jony amonowe zostały wyczerpane po 18 dniach hodowli. Jednocześnie obserwowano spowolnienie przyrostu masy tkanki kalusowej. Wyniki badań własnych pozostają w zgodności z badaniami powyższych autorów – w trakcie prowadzenia kultury obserwowano bardzo szybki i gwałtowny spadek zawartości jonów amonowych, a jednocześnie spadek wartości pH. Jony azotanowe były przyswajane przez tkankę roślinną znacznie wolniej. Fosfor jest kolejnym kluczowym składnikiem odżywczym dla wzrostu komórek roślinnych i tworzenia metabolitów wtórnych. W omawianych wcześniej badaniach Wang i wsp. (2010) okazało się, że jony fosforanowe(V) były szybko pobierane i po 24 dniach hodowli w zawieszinowych kulturach kalusowych nie było ich wcale w pożywce. W badaniach własnych również stwierdzono szybkie tempo pochłaniania jonów fosforanowych(V) przez tkan-

kę kalusową chryzantem. W 28. dniu hodowli nie stwierdzono obecności jonów fosforanowych w pożywce.

5.2. Wpływ auksyn i cytokininy oraz składu mineralnego pożywki na inicjację somatycznej embriogenezy

Dynamika tworzenia się zarodków somatycznych zależy jest od warunków prowadzenia kultury oraz gatunku rośliny. Jak podają Baker i Wetzstein (1998), zarodki orzecha ziemnego (*Arachis hypogaea*) pojawiły się w kulturach liściowych po 3–7 dniach od założenia kultury, podczas gdy w przypadku lucerny siewnej (*Medicago sativa*) zaobserwowano je dopiero po 10 dniach (Denchev i wsp. 1991), zaś u fejšholy sellowskiej (*Feijoa sellowiana*) minimalny okres prowadzenia kultury wydłużył się do 14 dni (Cruz i wsp. 1990). W kulturach kwiatów języczkowatych chryzantemy wielkokwiatowej tworzenie się zarodków somatycznych obserwowano już po 12–15 dniach od założenia kultury, szczególnie przy liniach cięcia eksplantatów (Mandal i Datta 2005). W badaniach własnych minimalny okres, po którym zaobserwowano zarodki somatyczne w kulturach kalusowych, wynosił 14 dni, natomiast gdy tkanka kalusowa była przed rozpoczęciem etapu inicjacji przetrzymywana w ciemności wydłużył się do 28 dni. W przypadku embriogenezy bezpośredniej w kulturach liściowych okres ten wydłużył się do 28 dni dla kultur doświetlanych i 42 dla kondycjonowanych ciemnością.

Głównym czynnikiem mającym wpływ na inicjację somatycznej embriogenezy jest zawartość regulatorów wzrostu, jednak doniesienia dotyczące optymalnej ich zawartości są często sprzeczne (Merkele i wsp. 1995). Cytokininy: BAP i kinetynę połączoną z 2,4-D stosowała w swojej pracy Lema-Rumińska (2007), indukując somatyczną embriogenezę w kulturach liściowych chryzantem. Za najkorzystniejszy do indukcji tego procesu uznała ona dodatek do pożywki $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D stosowany z $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ KIN. BAP, zwłaszcza stosowany w wyższym stężeniu, wpływał na obniżenie liczby uzyskanych zarodków somatycznych, jak i w pełni rozwiniętych zarodków i uzyskanych z nich roślin. May i Trigiano (1991) stwierdzili, iż tworzenie się zarodków somatycznych przebiega najefektywniej, gdy eksplantaty liściowe są wyłożone na pożywkę MS z dodatkiem $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D i $0,2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP. Tanaka i wsp. (2000) inicjowali bezpośrednią somatyczną embriogenezę, wykładając na pożywki odmienne eksplantaty – czyli kwiaty języczkowate chryzantemy. Stwierdzili oni, że najwydajniej proces ten przebiega na pożywkach z dodatkiem IAA i KIN w wysokich stężeniach. Dodatek do pożywki IBA i 2,4-D oraz BAP nie pozwolił na uzyskanie zarodków somatycznych.

Indukcja zarodków somatycznych w kulturach roślin z rodziny *Asteraceae* zależy była często od wysokich stężeń NAA i BAP w pożywce (Pavingerova i wsp. 1994, Mandal i Datta 2005). Wyniki badań własnych potwierdzają obserwacje powyższych autorów o korzystnym wpływie kombinacji NAA i BAP na inicjację SE w kulturach chryzantem. Mandal i Datta (2005), inicjując bezpośrednią SE w kulturach kwiatów języczkowatych pięciu odmian chryzantemy wielkokwiatowej, wykładali je na pożywki uzupełnione od 0,2 do $6 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$

2,4-D i NAA stosowane łącznie z BAP w stężeniu od 0,2 do 6 mg · dm⁻³. Inicjację zarodków somatycznych obserwowali oni na pożywkach uzupełnionych od 2 do 4 mg · dm⁻³ wyżej wymienionymi regulatorami wzrostu, a za najlepszą do prowadzenia tego typu procesu uznali pożywkę z dodatkiem 4 mg · dm⁻³ 2,4-D i 2 mg · dm⁻³ BAP – obecność zarodków somatycznych stwierdzono w przypadku 30% wyłożonych na pożywki eksplantatów, a na jednym wykształciło się ich średnio 15,8. W ostatnim z doświadczeń przeprowadzonych przez wymienionych badaczy 2,4-D zastąpiono NAA, który okazał się znacznie mniej wydajny w indukowaniu somatycznej embriogenezy. Najlepsza okazała się pożywka z dodatkiem 4 mg · dm⁻³ NAA i 2 mg · dm⁻³ BAP, na której jedynie 35% eksplantatów wykształciło średnio 6,4 zarodków.

W badaniach własnych do inicjacji SE wykorzystywano inny rodzaj eksplantatu, jednak uzyskano podobne rezultaty. W przypadku inicjacji bezpośredniej somatycznej embriogenezy, kiedy na pożywki uzupełnione kombinacją NAA i BAP wykładano fragmenty blaszek liściowych, najkorzystniejsza była również kombinacja 4 mg · dm⁻³ NAA i 2 mg · dm⁻³ BAP. Kiedy stosowano tę właśnie pożywkę formowanie się zarodków obserwowano na wszystkich wyłożonych eksplantatach (średnio 17,6 na jednym eksplantacie). W kulturach kalusowych bardziej odpowiednią z zastosowanych w badaniach kombinacji NAA i BAP był dodatek 2 mg · dm⁻³ NAA i 1 mg · dm⁻³ BAP. Niższy poziom regulatorów wzrostu najkorzystniej wpływających na liczebność formujących się zarodków somatycznych w przypadku kultur kalusowych był najprawdopodobniej spowodowany faktem, że tkanka kalusowa namnażana była wcześniej na pożywce z dodatkiem 4 mg · dm⁻³ NAA i 3 mg · dm⁻³ BAP.

Jak stwierdzili Michalczuk i wsp. (1992), poziom endogennych auksyn zmniejsza się w trakcie dojrzewania zarodka somatycznego – od stadium zarodka dojrzałego aż po torpedo. Zmniejszeniu powinien też ulec dodatek egzogennych regulatorów wzrostu. Poziom auksyn w badaniach własnych, najlepszy na etapie inicjacji SE, był zwykle niższy od poziomu optymalnego na etapie namnażania tkanki kalusowej.

Istotny wpływ na przebieg procesu ma również skład mineralny pożywki. Shekhawat i wsp. (2009), inicjując somatyczną embriogenezę w kulturach kalusowych miodły indyjskiej (*Azadirachta indica*), rośliny z rodziny *Asteraceae*, wykładali eksplantaty na pożywki MS oraz MS z dodatkiem od 50 do 300 mg · dm⁻³ (NH₄)₂SO₄ lub KNO₃. Za najbardziej przydatną do inicjacji somatycznej embriogenezy i dojrzewania zarodków somatycznych uznali oni pożywkę MS uzupełnioną 50 mg · dm⁻³ (NH₄)₂SO₄ i 100 mg · dm⁻³ KNO₃. Prowadzenie omawianego procesu na tej właśnie pożywce pozwoliło na uzyskanie z 10,5 g tkanki kalusowej 3135 zarodków somatycznych. Wyniki badań własnych również wskazują na korzystny wpływ zwiększenia zawartości jonów amonowych w postaci NH₄NO₃ na liczebność formujących się zarodków, jednak były one nieprawidłowo wykształcone i nadmiernie uwodnione. Być może w przypadku tego składu mineralnego należałoby zmienić zawartość regulatorów wzrostu w pożywce, zwłaszcza obniżyć zawartość BAP, ponieważ cytokininy wpływają na nadmierne gromadzenie się wody w tkankach roślin (Borkowska 1997).

5.3. Wpływ poliamin na prowadzenie kultur kalusowych i somatyczną embriogenezę

Do regulatorów wzrostu mających wpływ na przebieg zarówno kaulogenezy, jak i somatycznej embriogenezy, należą poliaminy. Wysoki poziom endogennych poliamin: sperminy i spermidyny w embriogenicznej tkance kalusowej dębu ostrolistnego (*Quercus ilex*) stwierdzili w swoich badaniach Mauri i Manzanera (2011). Wysoki poziom wymienionych regulatorów wzrostu obserwowano również w zygocytynych i somatycznych zarodkach tego gatunku – obniżał się on stopniowo wraz ze wzrostem stopnia rozwoju zarodka. Jak podaje Feirer i wsp. (1985), zwłaszcza spermidyna odgrywa istotną rolę we wzroście i rozwoju zarodków somatycznych. Wysoki poziom spermidyny był charakterystyczny również dla tkanek embriogenicznych tuż przed indukcją somatycznej embriogenezy kawy kongijskiej (*Coffea canephora*) – (de la Pena i wsp. 2008), lucerny siewnej (Cvikrova i wsp. 1999, Huang i wsp. 2001) oraz sosny kalifornijskiej (*Pinus radiata*) – (Minocha i wsp. 1999).

W badaniach własnych reakcja tkanek roślinnych na dodatek do pożywek poliamin była zróżnicowana. Dodatek do pożywek putrescyny nie indukował wykształcania się tkanki kalusowej ani jej namnażania, natomiast spermina i spermidyna działały korzystnie na przyrost masy tkanki kalusowej zarówno kiedy były stosowane samodzielnie, jak i w połączeniu z $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i BAP. Korzystny wpływ poliamin na stosowane łącznie NAA i BAP obserwowano jedynie w kulturach doświetlanych. W kulturach prowadzonych w ciemności nie stwierdzono istotnego wpływu powyższych regulatorów wzrostu na rozwój tkanki kalusowej. Jest to prawdopodobnie spowodowane korelacją warunków świetlnych prowadzenia kultury z akumulacją i produkcją endogennych poliamin. Akumulację PUT, SPMD i SPM, w zależności od warunków świetlnych prowadzenia kultury, obserwowano uprzednio między innymi w przypadku sadzonek grochu zwyczajnego (Goren i wsp. 1982) i *Pharbitis nil* (Yoshida i Hirasawa 1998). Hunter i Burritt (2005) obserwowali wzrost całkowitego stężenia poliamin w kulturach sałaty doświetlanych światłem czerwonym. W tkankach roślin kontrolnych doświetlanych światłem białym obserwowano również wzrost całkowitego stężenia poliamin, jednak ich poziom był znacznie niższy. Wyniki te sugerują, że produkcja i gromadzenie się poliamin są promowane przez jeden z fitochromów.

Doniesienia literaturowe są sprzeczne, jeżeli chodzi o reakcję tkanki kalusowej w trakcie kolejnego etapu (namnażania) na dodatek poliamin. W przypadku tkanki kalusowej żeńszczyca właściwego była ona niekorzystna: tkanka kalusowa brązowieła i zamierała. Dodatek poliamin do pożywek wpływał również następczo negatywnie na liczbę i jakość zarodków somatycznych, powodując ich nadmierne uwodnienie (Kevers i wsp. 2000, 2002). W przeciwieństwie do wyników powyższych badań Tang i wsp. (2004) stwierdzili korzystny wpływ dodatku egzogennych poliamin na namnażanie się tkanki kalusowej sosny wirginijskiej (*Pinus virginiana*). Zainicjowane na podłożach bez dodatku poliamin zbrązowiełe fragmenty tkanki kalusowej wykładali oni na pożywki z dodatkiem putrescyny, sperminy i spermidyny. Stwierdzili, że dodatek egzogennej putrescyny i spermidyny wpłynął korzystnie na

przyrost masy tkanki kalusowej, która stała się jasnozielona i miała gruzełkową strukturę. Wyniki badań własnych pozostają w zgodności z obserwacjami powyższego autora – tkanka kalusowa namnażana na pożywkach z dodatkiem sperminy i spermidyny w stężeniu 1 i 5 mg · dm⁻³ charakteryzowała się gruzełkową strukturą i jasnozielonym kolorem, jednak mnożyła się znacznie słabiej niż w przypadku stosowanych jednocześnie pożywek uzupełnionych 3 mg · dm⁻³ BAP i 4 mg dm⁻³ NAA. Stosowana jednocześnie z wymienionymi cytokininami nie powodowała zwiększenia masy namnażanej tkanki kalusowej.

Hunter i Burritt (2005) podają, że nagromadzenie PA jest indukowane podczas wczesnych etapów kultury i jest wymagane do zajęcia procesu organogenezy, podczas gdy procesy morfogenetyczne zachodzą przy wartościach maksymalnych PUT, SPMD i SPM. Tang i wsp. (2004) stwierdzili, że dodatek poliamin w stężeniu od 0,01 mM do 1 mM (PUT, SPMD i SPM) dopiero na etapie indukcji somatycznej embriogenezy działał korzystnie na formowanie się zarodków somatycznych. Zabieg ten powodował wzrost liczby tworzących się zarodków z 22,4 do 110,2. Poliaminą, która w największym stopniu wpływała na liczbę tworzących się zarodków somatycznych, była spermidyna. Dodatek spermidyny (10⁻⁴ M) do pożywki zawierającej jedynie auksynę w kulturach kalusowych żeńszczenia spowodował wzrost liczby tworzących się zarodków somatycznych z 20 do 98 na 2,5 g kalusa (Monteiro i wsp. 2002). Większą liczbę zarodków somatycznych pod wpływem egzogennej spermidyny obserwowano również w przypadku kawy kongijskiej (*Coffea canephora*) – (Kumar i wsp. 2008b), sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris*) – (Niemi i wsp. 2007), żeńszczenia właściwego (Monteiro i wsp. 2002), igławy brazylijskiej (Silveira i wsp. 2006) i mango indyjskiego (*Magnifera indica*) (Mishra i wsp. 2010).

Wyniki badań własnych pozostają w zgodzie z doniesieniami powyższych autorów. Częstość eksplantatów formujących zarodki somatyczne oraz liczba wykształconych zarodków somatycznych wzrastała istotnie, kiedy do pożywek, obok NAA i BAP, dodawano spermidynę. Dodatek sperminy do pożywek indukujących somatyczną embriogenezę powodował słabszą reakcję, a w przypadku putrescyny obserwowana reakcja pozostawała na poziomie kontroli. Poliaminy są od dawna znane jako inhibitory biosyntezy etylenu i być może z tego powodu obserwujemy ich dodatni wpływ na powstawanie i rozwój zarodków somatycznych (Apelbaum i wsp. 1981). Eksplantaty wyłożone na pożywki z dodatkiem spermidyny i sperminy, jako jedyne regulatora wzrostu, wykształciły również zarodki somatyczne, jednak ich liczba była niższa niż w przypadku eksplantatów wyłożonych na pożywki z dodatkiem poliamin stosowanych łącznie z NAA i BAP. Putrescyna stosowana jako jedyny regulator wzrostu, jak i w kombinacji NAA i BAP, nie miała wpływu na częstość formujących się zarodków somatycznych, jak i ich liczebność.

5.4. Wpływ światła na prowadzenie kultur kalusowych i somatyczną embriogenezę

Powszechnie wiadomo, że rozwój roślin uwarunkowany jest korelacją czynników wewnętrznych, jak i zależny jest od środowiska. Jednym z najważniejszych czynników środowiskowych jest światło – zarówno jego natężenie, jak i długość fali elektromagnetycznej, czyli barwa światła (Chee 1986, Chee i Pool 1989, Latkowska i Chmiel 1996, Gabarkiewicz i wsp. 1997, Gabryszewska i Rudnicki 1997, Kozak 2011, Dąbski 2002).

Inicjacja kultur kalusowych może zachodzić niezależnie od zastosowanych warunków świetlnych. Jak wynika z badań Elmeera i Hennertego (2008), tkanka kalusowa ogórka inicjowana na pożywkach bez dodatku regulatorów wzrostu tworzyła się z podobną intensywnością w kulturach prowadzonych zarówno w świetle, jak i w ciemności. W badaniach własnych, podobnie jak w pracy Elmeera i Hennertego (2008), kalus rozwinął się na brzegach eksplantatów liściowych niezależnie od zastosowanych warunków świetlnych i stężenia auksyn. Jego masa była wyższa w kulturach doświetlanych substytucyjnie, jednak obecność światła nie była niezbędna do inicjacji kaulogenezy.

Obok natężenia napromienienia kwantowego światła równie ważną rolę w regulowaniu rozwoju roślin w kulturach *in vitro* odgrywa jego barwa, czyli długość fali elektromagnetycznej. Wpływa ona na rozwój poprzez regulację poziomu endogennych regulatorów wzrostu (Tucker 1976, Smith 1982, Muir i Zhu 1983). Doniesienia mówiące o wpływie barwy światła na rozwój roślin są jednak niezbyt liczne, często sprzeczne, a uzyskiwane efekty związane są zwykle z rodzajem doświetlanej tkanki. Miler i Zalewska (2006), badając wpływ barwy światła na mikrorozmnażanie chryzantemy w kulturach *in vitro*, stwierdziły, że doświetlanie pędów światłem zielonym miało pozytywny wpływ na długość pędów i międzywęźli oraz spowodowało zwiększenie się masy namnożonych roślin. Rośliny doświetlane światłem czerwonym miały najmniejsze liście i charakteryzowały się najniższą masą. Guo i wsp. (2007) prowadzili kultury kalusowe tybetańskiej rośliny leczniczej *Saussurea medusa* z rodziny *Asteraceae*. Światło czerwone pobudzało wzrost tkanki kalusowej, jednocześnie jednak obniżało masę produkowanych przez nią flawonoidów, zaś doświetlanie światłem niebieskim, zielonym i żółtym nie wpłynęło istotnie na rozwój tkanki kalusowej.

W badaniach własnych doświetlanie substytucyjne kultur światłem czerwonym działało korzystnie na inicjację i namnażanie tkanki kalusowej, kiedy było stosowane łącznie ze światłem białym. Mogło być to spowodowane często występującym deficytem światła czerwonego, ze względu na spektrum światła standardowo stosowanych w kulturach *in vitro* lamp fluorescencyjnych (Wilson i wsp. 1993, D'Onofrio i wsp. 1998, Seabrook 2005).

Z licznych badań wynika, że światło niebieskie nie indukuje lub znacząco zmniejsza intensywność formowania się tkanki kalusowej, np. w kulturach aktinidii smakowitej (Muleo i Morini 1990) czy pylników cytryny klementyny (*Citrus clementina*) – (Germana i wsp. 2005). Również Morini i wsp. (2000) stwierdzili, że w kulturach pigwy pospolitej (*Cydonia oblonga*) daleko czerwone światło niebieskie wpłynęło negatywnie na kaulogenezę. W badaniach wła-

snych również obserwowano niekorzystny wpływ światła niebieskiego zarówno na inicjację kultur kalusowych, jak i na indukcję zarodków somatycznych. Fragmenty blaszki liściowej czy też tkanki kalusowej w kulturach doświetlanych światłem niebieskim w ciągu kilku pierwszych tygodni prowadzenia kultury brązowiły i zamierały. Jest to najprawdopodobniej spowodowane tym, że światło niebieskie indukuje produkcję związków fenolowych, co w połączeniu z wysokimi dawkami auksyn, stosowanymi na etapie namnażania tkanki kalusowej i indukcji SE, a co za tym idzie z produkcją etylenu przez rośliny, może tłumaczyć brązowienie i zamieranie kultur (Ahmad i wsp. 1995).

Na podstawie powyższych doniesień oraz badań własnych można stwierdzić, że stosowanie światła białego lub czerwonego oraz białego i czerwonego stosowanych razem, jak również warunki ciemności, było najbardziej odpowiednie do powstawania kalusa w kulturze. Wyniki te sugerują, że jeden z fitochromów może regulować zależną od światła kompetencję do indukcji kalusa i organogenezy, jak już zaobserwowano w tkance liści aktinidii chińskiej (*Actinidia chinensis* syn. *Actinidia deliciosa*) i w kulturach hypokotyli pomidorów jadalnych (*Lycopersicon esculentum*), natomiast antagonistycznie na wymienione procesy może działać receptor światła niebieskiego (Muleo i Morini 1990, Bertram i Lercari 2000).

Wielu autorów zaleca prowadzenie kultur kalusowych w ciemności, ze względu na mniejsze ryzyko wystąpienia zmienności somaklonalnej – nie zawsze jest to jednak możliwe. W badaniach Moon i Stomp (1997) stwierdzono negatywny wpływ braku światła na namnażanie się kalusa rzęsy garbatej (*Lemna gibba*). Po czterech tygodniach prowadzenia kultur bez dostępu światła kalus stał się żółty lub biały i stopniowo zamierał. Powolny wzrost tkanki kalusowej obserwowano dopiero po oświetleniu kultur światłem o natężeniu napromienienia kwantowego wynoszącym $5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Badania własne przeczą wynikom uzyskanym przez powyższych autorów. Stwierdzono, że inicjacja kultur kalusowych oraz ich namnażanie może być prowadzone w ciemności nawet przez sześć miesięcy, chociaż masa zaindukowanej i namnożonej tkanki jest zwykle nieco niższa od masy tkanki doświetlanej światłem białym.

Wymagania tkanek roślinnych mogą się zmieniać w kolejnych etapach prowadzenia kultury. Doniesienia na temat warunków świetlnych na etapie indukcji somatycznej embriogenezy są sprzeczne. Cheong i Pooler (2004) stwierdzili, że doświetlanie kultur nie jest niezbędne do inicjacji procesu somatycznej embriogenezy wiśni wczesnej (*Prunus incisa*). Powyższą tezę potwierdzają również Castillo i Smith (1997), którzy badali wpływ oświetlenia światłem czerwonym (o natężeniu napromienienia kwantowego wynoszącym $45 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) i ciemności na częstość eksplantatów formujących zarodki somatyczne w kulturach begonii delikatnej (*Begonia gracilis*). Stwierdzili oni, że doświetlanie światłem nie było konieczne do inicjacji SE – indukcja zarodków somatycznych zachodziła również w ciemności. Kiedy eksplantaty wystawione były na działanie światła białego w pełnym spektrum, intensywnie zachodziła ryzogeneza, a obserwowano jedynie nieliczne tworzące się zarodki. May i Trigiano (1991) badali wpływ światła na przebieg bezpośredniej somatycznej embriogenezy w kulturach chryzantemy. Stwierdzili oni, że podczas 52 dni prowadzenia kultury w ciemności lub oświetlenia światłem białym nie obserwowano oznak zachodzącej embriogenezy lub też liczba

zarodków była bardzo niewielka (średnio 0,7 zarodka na jeden eksplantat). Badania własne pozostają jedynie częściowo w zgodności z wynikami uzyskanymi przez powyższych autorów. Nie obserwowano formowania się zarodków somatycznych w kulturach chryzantemy wielokwiatowej prowadzonych w ciemności, niezależnie od dodatku egzogennych regulatorów wzrostu do pożywek. Obserwowano natomiast formowanie się bardzo licznych zarodków somatycznych w kulturach doświetlanych światłem białym, przy standardowo stosowanym fotoperiodzie. Jednocześnie wykładanie dojrzałych już zarodków somatycznych na pożywki i prowadzenie kultur na tym etapie w ciemności zwiększało procent kiełkujących zarodków.

Za czynnik zwiększający liczbę formujących się zarodków somatycznych oraz poprawiający ich jakość uznaje się przetrzymywanie eksplantatów w ciemności lub niskim natężeniu napromienienia kwantowego światła, a następnie znaczne zwiększenie jego natężenia przed indukcją kultur kalusowych czy somatycznej embriogenezy. Mikuła i Rybczyński (2001) przetrzymywali bez dostępu światła fragmenty siewek roślin w rodzaju goryczka (*Gentiana sp.*) przez pięć dni przed wykładaniem ich na pożywki inicjujące somatyczną embriogenezę. Kalus dziurawca zwyczajnego inicjowany w ciemności po wystawieniu na działanie światła tworzył znacznie większą liczbę pędów niż kalus przez cały czas prowadzony na świetle (Pretto i Santarem 2000). Również Cheong i Pooler (2004) stwierdzili, że traktowanie ciemnością eksplantatów wiśni wczesnej od jednego do czterech tygodni przed założeniem kultury wpłynęło korzystnie na częstość inicjowanych zarodków somatycznych, jednak różnice te nie zostały potwierdzone statystycznie (28% eksplantatów inicjujących zarodki w kulturach doświetlanych i 43% dla kultur prowadzonych w ciemności przez cztery tygodnie). May i Trigiano (1991), indukując somatyczną embriogenezę, stosowali przemienne, kilkudniowe okresy ciemności i oświetlenia światłem białym. Za najkorzystniejsze uznali oni przetrzymywanie założonych kultur przez 28 dni w ciemności, następnie 10 dni w świetle i ponownie przez 14 dni w ciemności. Obserwowali oni zwiększenie się w tych warunkach liczebności powstałych zarodków. W badaniach własnych również stwierdzono, że przetrzymywanie roślin w ciemności przed indukcją somatycznej embriogenezy przez dwa do trzech tygodni było czynnikiem indukującym ten proces, mimo że eksplantaty wykładano na pożywki MS, bez dodatku egzogennych regulatorów wzrostu. Kiedy eksplantaty wykładano na pożywki uzupełnione regulatorami wzrostu nie obserwowano istotnego zwiększenia się liczby wykształconych zarodków somatycznych, lecz ich formowanie się odbywało się w krótszym okresie.

5.5. Dojrzewanie i konwersja zarodków somatycznych

Zarodki somatyczne uzyskane w procesie somatycznej embriogenezy często zamierają i nie kiełkują (Merkele i wsp. 1995). Jak podaje Bach (2001), proces dojrzewania odbywa się stopniowo i polega na odwadnianiu zarodków na pożywkach o podwyższonym stężeniu osmotycznym zawierających węglowodany, co zapobiega przedwczesnemu kiełkowaniu zarodków, a jednocześnie sprzyja akumulacji węglowodanów i białek w tkankach zarodka.

Wpływ zawartości sorbitolu, mannitolu i sacharozy na dojrzwianie i kiełkowanie zarodków somatycznych dębu badali Sanchez i wsp. (2003). Stwierdzili oni, że bardziej odpowiednie do pobudzania dojrzwiania i kiełkowania zarodków somatycznych są wyższe stężenia badanych związków. Również Canhoto i Cruz (1994), regenerując zarodki somatyczne fejšhoły sellowskiej, oraz Konan i wsp. (1994), opracowując metodę namnażania manioku jadalnego (*Manihot esculenta*), za bardziej odpowiednie uznali wyższe zawartości węglowodanów w pożywkach. Wyniki badań własnych potwierdzają obserwacje wymienionych autorów. Zarodki somatyczne chryzantemy kiełkowały lepiej na podłożu zawierającym ½ zawartości makro- i mikroelementów pożywki MS z dodatkiem $45 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy. Natomiast dodatek do pożywek glukozy i fruktozy działał negatywnie na konwersję zarodków somatycznych.

Jak sądzą niektórzy autorzy, węglowodany i związki białkowe są gromadzone w tkankach dojrzwających zarodków wydajniej, kiedy w pożywkach znajduje się azot w formie organicznej, na przykład jako dodatek hydrolizatu kazeiny. W kulturach *in vitro* stosuje się zróżnicowaną zawartość hydrolizatu kazeiny – od $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ na etapie konwersji zarodków manioku jadalnego (Konan i wsp. 1994), $250 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ w kulturach winorośli właściwej (Martinelli i wsp. 1993), do $500 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ w kulturach żeńszenia właściwego (Tang 2000) i wilhelmki wytwornej (*Bactris gasipaes*) – (Steinmacher i wsp. 2007). Wei i wsp. (1997) stwierdzili natomiast niekorzystny wpływ dodatku hydrolizatu kazeiny w stężeniu od $200 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ w kulturach miodły indyjskiej na etapie dojrzwiania i regeneracji zarodków somatycznych. Zwłaszcza w przypadku najwyższego z zastosowanych stężeń – $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ – obserwowano niski procent kiełkujących zarodków, które często były zniekształcone i pokrywały się tkanką kalusową. Stosowanie hydrolizatu kazeiny w niższych stężeniach – 200 i $500 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ – zwiększyło częstość kiełkujących zarodków, była ona jednak najwyższa w przypadku pożywek bez dodatku tego składnika. Również w badaniach własnych obserwowano hamujący wpływ hydrolizatu kazeiny na dojrzwianie i kiełkowanie zarodków somatycznych chryzantemy. Jak sądzą Zeibur i wsp. (1950), niekorzystny wpływ hydrolizatu kazeiny w pożywce na kiełkowanie zarodków niektórych gatunków roślin może być spowodowany zbyt wysokim ciśnieniem osmotycznym.

Problemem na etapie regeneracji zarodków somatycznych jest między innymi akumulacja związków fenolowych produkowanych przez tkanki roślinne (Alemanno i wsp. 2003, Pinto i wsp. 2008). Aby ograniczyć produkcję polifenoli stosuje się moczenie lub też dodawanie do pożywek przeciwutleniaczy lub związków ograniczających brązowienie kultur, takich jak: kwas askorbinowy, DTT, PVP czy azotan srebra. Mandal i wsp. (2001) wykazali, że regeneracja zarodków somatycznych szafranu przebiega lepiej, jeżeli są one wykładane na pożywki bez dodatku regulatorów wzrostu, ale zawierają w swoim składzie substancje hamujące produkcję etylenu, takie jak: AgNO_3 , NiCl_2 , DNP, ACC czy CEPA. Dodatek do pożywki $50 \mu\text{M}$ AgNO_3 w sposób istotny wpłynął na większą częstotliwość tworzonych zarodków somatycznych. Jednak wykorzystanie tych środków w przebiegu procesu somatycznej embriogenezy jest słabo poznane (Malabadi i van Staden 2005). Dodatkem do pożywek często

stosowanym w celu ograniczenia brązowienia kultur i zamierania zarodków somatycznych jest węgiel aktywowany (Smith i Krikorian 1990). Działał on korzystnie na regenerację *Dendrocalamus strictus* (Saxena i Dhawan 1999). W badaniach własnych węgiel aktywowany, stosowany w stężeniu od 0,1 do 1,0 g · dm⁻³, wpływał niekorzystnie na kiełkowanie zarodków somatycznych. Jak sądzą Pan i van Staden (1999), zjawisko takie może być spowodowane zmianą pH pożywki przez węgiel, a w związku z tym silniejszą hydrolizą sacharozy do fruktozy i glukozy. Jak stwierdzono wcześniej, obecność fruktozy i glukozy w pożywce działała niekorzystnie na konwersję zarodków chryzantemy.

Badania przeprowadzone przez Kongu i wsp. (1997) wykazały, że w porównaniu do zarodków somatycznych rozwijające się nasiona mają wyższy poziom endogennego ABA. Dlatego też na etapie dojrzewania zarodków somatycznych często stosuje się dodatek do pożywek tego związku lub moczenie w roztworze ABA. Poprzez zahamowanie rozwoju ma to zapobiegać przedwczesnemu kiełkowaniu zarodków somatycznych. Anandan i wsp. (2012) w badaniach nad SE w kulturach melonowca właściwego (*Carica papaya*) wykładali niedojrzałe zarodki somatyczne tej rośliny na pożywki z dodatkiem od 1,3 do 10,5 mg · dm⁻³ ABA. Autorzy stwierdzili, że wyższe stężenie ABA wpłynęło na wyższą częstość poprawnie wykształconych, dojrzałych zarodków somatycznych. Brak ABA powodował, że dojrzałych zarodków somatycznych było mniej, a większość z nich wykazywała aberracje rozwojowe.

Zazwyczaj poziom endogennego ABA jest niski w początkowych fazach, rośnie podczas rozwoju embrionalnego, a następnie maleje na ostatnich etapach dojrzewania, w związku z tym przedłużająca się inkubacja na pożywkach z dodatkiem ABA może całkowicie zahamować rozwój zarodków. Dlatego też w badaniach własnych zdecydowano się na moczenie zarodków w roztworze od 0,1 do 0,5 g · dm⁻³ tego regulatora wzrostu. Podobnie jak w badaniach powyższych autorów stwierdzono korzystny wpływ stosowanego tak ABA, jednak tylko w przypadku najniższego z zastosowanych stężeń. Kiedy stężenie ABA było wyższe od 0,2 g · dm⁻³ zarodki zamierały. Dodatek kwasu abscysynowego do pożywki na tym etapie działał korzystnie na rozwój zarodków somatycznych również w badaniach Thorpe i Stasolla (2001) oraz Stasolla i Yeung (2001).

5.6. Stabilność genetyczna tkanek roślinnych oraz roślin zregenerowanych na drodze somatycznej embriogenezy

Mimo że zwykle namnażanie roślin w kulturach *in vitro* utożsamia się z uzyskaniem populacji roślin jednorodnych genetycznie, nie zawsze jest to jednak możliwe. W licznych badaniach autorzy donoszą o niepożądanym zmienności występującej w pokoleniu regeneratów, w tym również roślin uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy (Larkin i Scowcroft 1981, Evans i Sharp 1986, Evans i wsp. 1986, Kononowicz 1992, Przybecki i Malepszy 1992, Fukai i wsp. 1994, Kaeppler i wsp. 2000). W badaniach własnych określono poziom zmienności występującej w tkance kalusowej, namnażanej na pożywkach zestalonych agarem przez okres od jednego miesiąca do jednego roku oraz na pożywce płynnej w bioreakto-

rze. DNA izolowano również z tkanki kalusowej namnażanej w kulturach zawieszonych oraz roślin regenerowanych na drodze somatycznej embriogenezy z tkanki kalusowej, prowadzonej w powyżej omówionych warunkach.

Chryzantemy charakteryzują się szczególnie wysokim poziomem zmienności (Wolff i van Rijn 1993, Wolff i wsp. 1993, Wolff 1996). W przypadku tego gatunku roślin przyczyną zmienności obserwowanej w wyniku rozmnażania w kulturach *in vitro* może być chimeryczność tkanek roślin wyjściowych (Martin i wsp. 2002). Zalewska i wsp. (2007) wykluczyli ją w przypadku chryzantemy odmiany 'Richmond', regenerując rośliny z pąków kątowych i merystemów przybyszowych i uzyskując pokolenie potomne roślin o barwie kwiatostanów identycznych jak roślina mateczna. W badaniach własnych, przed rozpoczęciem właściwych doświadczeń, jednorodność genetyczną potwierdzono badaniami DNA tkanek rośliny wyjściowej, przeprowadzonymi metodą ISSR-PCR.

Jednym z głównych czynników wpływających na wystąpienie niekorzystnej zmienności jest stosowanie przejściowej fazy kultur kalusowych, pozwalającej zwykle zwiększyć wydajność prowadzonego procesu (Araujo i wsp. 2001, Cooper i wsp. 2006). Zmiany genetyczne wykryto u roślin zregenerowanych z tkanki kalusowej między innymi w przypadku pomidora jadalnego (Sonja i wsp. 2001), kukurydzy uprawnej (*Zea mays*) – (Osipova i wsp. 2003), kosaćca żółtego (*Iris pseudoacorus*) – (Kozyrenko i wsp. 2004) czy pomarańczy słodkiej (*Citrus sinensis*) – (Hao i Deng 2002). Rathore i wsp. (2011) określili zmienność roślin aloesu zwyczajnego (*Aloe vera*) rozmnażanego przez pędy kątowe w kulturach *in vitro* oraz populacji roślin zregenerowanych przez organogenezę przybyszową z tkanki kalusowej. W pierwszej z badanych populacji stwierdzili całkowitą jednorodność genetyczną, w drugiej zmienność – na poziomie 78%. Badania własne pozostają w zgodności z doniesieniami powyższych autorów – poziom zmienności w populacji namnażanej w kulturach pędowych był bardzo niski, znacznie niższy od zmienności tkanki kalusowej, zwłaszcza namnażanej przez jeden rok.

Poziom zmienności regeneratów uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy wzrasta zwykle wraz z wydłużaniem się okresu namnażania tkanki kalusowej. Marum i wsp. (2009), badając zmienność embriogennych linii komórkowych sosny nadmorskiej (*Pinus pinaster*), stwierdzili pojawienie się zmienności somaklonalnej już po sześciu miesiącach namnażania się tkanki kalusowej. Podobny poziom zmienności obserwowano w przypadku roślin zregenerowanych z wymienionych linii kalusa. Badania własne stanowią potwierdzenie badań Marum i wsp. (2009), w których stwierdzono istotny wpływ długości okresu prowadzenia kultury kalusowej oraz warunków, w których była prowadzona, na zmienność genetyczną zregenerowanych roślin. Poziom zmienności populacji w stosunku do próby DNA izolowanej z rośliny wyjściowej wzrastał w istotny sposób, gdy kultury kalusowe prowadzone były przez jeden rok.

Z badaniami własnymi pozostają również w zgodności badania Heinze i Schmidta (1995), którzy dokonali oceny populacji zarodków somatycznych świerka pospolitego (*Picea abies*) metodą RAPD. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że czynnikiem,

który miał największy wpływ na wystąpienie zmienności somaklonalnej, była długość okresu prowadzenia kultur kalusowych, przed indukcją somatycznej embriogenezy. Somaklony uzyskane w wyniku regeneracji w kulturach, których tkanka kalusowa namnażana była przez jeden miesiąc, charakteryzowały się niskim poziomem zmienności.

Zmienność w populacji chryzantem odmiany 'Richmond', otrzymanych na drodze bezpośredniej somatycznej embriogenezy, badały Lema-Rumińska i Śliwińska (2009). Zarodki somatyczne w powyższej pracy uzyskano, wykładając na pożywki fragmenty liści chryzantemy. Autorki określiły zawartość antocyjanów w kwiatostanach oraz poziom ploidalności metodą cytometrii przepływowej. Wyniki badań uzyskane przez powyższe autorki potwierdziły stabilność genetyczną otrzymanych w ten sposób roślin. Jest to zbieżne z wynikami badań własnych, w których rośliny regenerowane na drodze bezpośredniej somatycznej embriogenezy wykazały bardzo niski poziom zmienności.

Opracowany w badaniach własnych protokół rozmnażania chryzantemy wielokwiatowej obejmuje metodę bezpośredniej somatycznej embriogenezy, kiedy to zarodki somatyczne formują się na powierzchni fragmentów blaszek liściowych, wyłożonych na odpowiednie pożywki oraz pośredniej somatycznej embriogenezy na fragmentach zainicjowanej wcześniej i namnożonej tkanki kalusowej. Obie metody gwarantują możliwość otrzymania ogromnej populacji roślin potomnych w relatywnie krótkim czasie. Rośliny zregenerowane z zarodków uzyskanych na drodze pośredniej somatycznej embriogenezy w kulturach kalusowych poprzez proponowany protokół namnażania charakteryzował wyższy, lecz wciąż jednak niewielki, poziom zmienności genetycznej. Tylko w przypadku 3 z 50 (6%) zregenerowanych roślin zaobserwowano polimorfizm genetyczny w stosunku do genotypu rośliny wyjściowej, a podobieństwo genetyczne wymienionych regenerantów wahało się od 93,3 do 95,8%.

6. Wnioski

1. Pikloram i dicamba mogą być wykorzystywane do indukcji kultur kalusowych oraz somatycznej embriogenezy chryzantemy wielkokwiatowej, jednak ich skuteczność jest niewielka.

2. Dodatek do pożywek spermidyny wpływa istotnie na przebieg procesu kaulogenezy i formowanie się zarodków somatycznych w kulturach doświetlanych światłem białym o natężeniu napromienienia kwantowego wynoszącym $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Stosowanie tego regulatora wzrostu powoduje tworzenie się na fragmentach blaszek liściowych dużej ilości tkanki kalusowej, mającej charakter embriogeny oraz pobudza formowanie się zarodków somatycznych.

3. Warunki świetlne prowadzenia kultury mają istotny wpływ na rozwój roślin w kulturach *in vitro*. Doświetlanie substytucyjne kultur światłem czerwonym, stosowanym samodzielnie lub ze światłem białym, powoduje zwiększenie się masy tkanki kalusowej oraz liczby tworzących się zarodków somatycznych. Światło niebieskie powoduje zamieranie kultur kalusowych i hamuje tworzenie się zarodków somatycznych.

4. Wymagania świetlne zmieniają się w zależności od etapu prowadzenia badań. Tkanek kalusowa może być indukowana i namnażana w ciemności nawet przez sześć miesięcy. Nie jest możliwe formowanie się zarodków somatycznych bez dostępu światła, ale ciemność wywiera korzystny wpływ na ich kiełkowanie, kiedy osiągną odpowiednie stadium rozwojowe.

5. Kultury kalusowe prowadzone na pożywce płynnej o składzie makro- i mikroelementów, według Murashige'a i Skooga (1962), z dodatkiem $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ spermidyny, $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP w bioreaktorze pozwalają na uzyskanie dużej ilości tkanki kalusowej w krótkim czasie. Powstała w tych warunkach tkanka kalusowa nie jest jednak odpowiednia do indukowania somatycznej embriogenezy.

6. Dodatek do pożywki węgla aktywowanego i hydrolizatu kazeiny w stężeniu od 0,1 do $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ wpływa negatywnie na konwersję zarodków somatycznych chryzantemy wielkokwiatowej.

7. Warunki prowadzenia kultury, takie jak sposób regeneracji i długość trwania etapu namnażania tkanki kalusowej, mają istotny wpływ na wystąpienie zmienności genetycznej regenerowanych tkanek.

8. Proponowany protokół rozmnażania chryzantemy na drodze pośredniej somatycznej embriogenezy obejmuje inicjację tkanki kalusowej na pożywce MS z dodatkiem $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA i BAP i $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ spermidyny, późniejsze jej namnażanie na podłożu z dodatkiem $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA, $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP, inicjacja somatycznej embriogenezy na pożywce z dodatkiem $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA, $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP i $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ spermidyny. Konwersja

otrzymanych w ten sposób zarodków powinna być prowadzona na podłożu zawierającym ½ składu mineralnego pożywki MS z dodatkiem $45 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy, w ciemności.

9. Dużą liczbę zarodków somatycznych można uzyskać na drodze bezpośredniej somatycznej embriogenezy, wykładając fragmenty blaszek liściowych na pożywki z dodatkiem $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA, $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP i $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ spermidyny, a następnie regenerując zarodki na podłożu zawierającym ½ składu mineralnego pożywki, według Murashige'a i Skooga (1962), z dodatkiem $45 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy, w ciemności. Na podstawie oceny jednorodności genetycznej regeneratów metodą ISSR-PCR można stwierdzić, że zaproponowany system regeneracji pozwala na uzyskanie roślin potomnych, bez ryzyka niestabilności genetycznej regeneratów.

Piśmiennictwo

1. AHLQOWALIA B.S. 1986. Limitations to the use of somaclonal variation in crop improvement. Ed. J. Semal, Somaclonal Variation and Crop Improvement. Boston. s. 14–27.
2. AHMAD M., LIN C., CASHMORE A.R. 1995. Mutations throughout an *Arabidopsis* blue-light photoreceptor impair blue-light-responsive anthocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl elongation. *Plant J.* 8: 653–658.
3. AHMED E.U., HAYASHI T., YAZAWA S. 2004. Auxins increase the occurrence of leaf-colour variants in *Caladium* regenerated from leaf explants. *Sci. Hort.* 100: 153–159.
4. ALBRECHT C., RUSSINOVA E., KEMMERLING B., KWAAITAAL M., DE VRIES S.C. 2008. *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase proteins serve brassinosteroid-dependent and -independent signaling pathways. *Plant Physiol.* 148 (1): 611–619.
5. ALEMANNO L., RAMOS T., GARGADENEC A., ANDARY C., FERRIERE N. 2003. Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. *Annals Bot.* 92 (4): 613–623.
6. AMDOUN R., KHELIFI L., KHELIFI-SLAOUI M., AMROUNE S., BENOUSSEF E.H., THI D.V., ASSAF-DUCROCQ C., GONTIER E. 2009. Influence of minerals and elicitation on *Datura stramonium* L. tropane alkaloid production: Modelization of the *in vitro* biochemical response. *Plant Sci.* 177 (2): 81–87.
7. AMOO S.O., FINNIE J.F., VAN STADEN J. 2009. Effects of temperature, photoperiod and culture vessel size on adventitious shoot production of *in vitro* propagated *Huernia hystrix*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 99: 233–238.
8. ANJANEYULU C., SHYAMKUMAR B., GIRI C.C. 2004. Somatic embryogenesis from callus cultures of *Terminalia chebula* Retz.: an important medicinal tree. *Trees.* 18: 547–552.
9. ANANDAN R., SUDHAKAR D., BALASUBRAMANIAN P., GUTIEÓRREZ-MORA A. 2012. *In vitro* somatic embryogenesis from suspension cultures of *Carica papaya* L. *Sci. Hort.* 136: 43–49.
10. ANNADANA S., RADEMAKER W., RAMANNA M., UDAYAKUMAR M., JONG J.D. 2000. Response of stem explants to screening and explant source as a basis for methodical advancing of regeneration protocols for chrysanthemum. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 62 (1): 47–55.
11. ANWAR N., KIKUCHI A., WATANABE K.N. 2010. Assessment of somaclonal variation for salinity tolerance in sweet potato regenerated plants. *Afric. J. Biot.* 9 (43): 7256–7265.
12. APELBAUM A., BURGOON A.C., ANDERSON J.D., LIEBERMAN M., BEN-ARIE R., MATTOO A.K. 1981. Polyamines inhibit biosynthesis of ethylene in higher plant tissue and fruit protoplasts. *Plant Physiol.* 68: 453–456.
13. ARAUJO L.G., PRABHU A.S., FILIPPI M.C., CHAVES L.J. 2001. RAPD analysis of blast resistant somaclones from upland rice cultivar IAC 47 for genetic divergence. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 67:165–172.
14. ARIBAUD M., KEVERS C., MARTIN-TANGUY J., GASPARD T. 1999. Low activity of amine-oxidases and accumulation of conjugated polyamines in disfavour of organogenic programs in *Chrysanthemum* leaf disc explants. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 55: 85–94.
15. ATTREE S.M., FOWKE L.C. 1993. Embryogeny of gymnosperms: Advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 35: 1–35.
16. AYDIN Y., TALAS-OGRA S., IPEKÇI-ALTAS Z., GÖZÜKIRMIZI N. 2006. Effects of brassinosteroid on cotton regeneration *via* somatic embryogenesis. *Biologia.* 61(3): 289–293.
17. AZIZ A., MARTIN-TANGUY J., LARHER F. 1997. Plasticity of polyamine metabolism associated with high osmotic stress in rape leaf discs and with ethylene treatment. *Plant Growth Reg.* 21 (2): 153–163.
18. AZIZ A., MARTIN-TANGUY J., LARHER F. 1999. Salt stress-induced proline accumulation and changes in tyramine and polyamine levels are linked to ionic adjustment in tomato leaf discs. *Plant Sci.* 145 (2): 83–91.
19. BACH A. 2001. Rozmnażanie wegetatywne. W: S. Malepszy (red.) Biotechnologia roślin. PWN, Warszawa. ISBN 978-83-01-15947-4.
20. BACH A., PAWLOWSKA B. 2003. Somatic embryogenesis in *Gentiana pneumonanthe* L. *Acta Biol. Crac. Series Bot.* 45(2): 79–86.

21. BACH A., WARCHOL M., GLOGOWSKA-SZWIEC M. 2000. Indukcja somatycznej embriogenezy i regeneracja roślin w kulturach kalusa hiacynta (*Hyacinthus orientalis* L.). *Rocz. Akad. Rol. w Poznaniu – CCCXVIII Ogrod.* 29: 5–9.
22. BAIRU M.W., FENNELL C.W., VAN STADEN J. 2006. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in *Cavendish banana* (Musa AAA cv. 'Zelig'). *Sci. Hort.* 108 (4): 347–351.
23. BAIS H.P., RAVISHANKAR G.A. 2002. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 69 (1): 1–34.
24. BAJAJ S., RAJAM M. 1995. Efficient plant regeneration from long-term callus cultures of rice by spermidine. *Plant Cell Rep.* 14 (11): 717–720.
25. BAKER C.M., WETZSTEIN H.Y. 1998. Leaflet development, induction time, and medium influence somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Rep.* 17(12): 925–929.
26. BARAKAT M.N., ABDEL FATTAH R.S., BADR M., EL-TORKY M.G. 2010. *In vitro* culture and plant regeneration derived from ray florets of *Chrysanthemum morifolium*. *Afr. J. Biot.* 9(8): 1151–1158.
27. BERTRAM L., LERCARI B. 2000. Phytochrome A and phytochrome B1 control the acquisition of competence for shoot regeneration in tomato hypocotyl. *Plant Cell Rep.* 19: 604–609.
28. BHATTACHARYA A., TEIXEIRA DA SILVA J.A. 2006. Molecular systematics in *Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura. *Sci. Hort.* 109: 379–384.
29. BHATTACHARYA P., DEY S., DAS N., BHATTACHARYA B.CH. 1990. Rapid mass propagation of *Chrysanthemum morifolium* by callus derived from stem and leaf explants. *Plant Cell Rep.* 9 (8): 439–442.
30. BISWAS M.K., ISLAM R., HOSSAIN M. 2007. Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria* sp.) through callus culture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 90 (1): 49–54.
31. BORKOWSKA B. 1997. Cytokiny. W: L. Jankiewicz (red.), *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin*. PWN, Warszawa, ISBN 8301-121-87-4.
32. BOUMAN H., DE KLERK G.J. 2001. Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions. Comparison of three assays. *TAG.* 102: 111–117.
33. BOZHKOV P., FILONOVA L., VON ARNOLD S. 1998. Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. *Physiol. Plant.* 104: 211–224.
34. BRADLEY P.M., EL-FILI F., GILES K.L. 1984. Polyamines and arginine affect somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Sci. Lett.* 34: 397–401.
35. BREGITZER P., POULSON M. 1995. Agronomic performance of barley lines derived from tissue culture. *Crop Sci.* 35 (4): 1144–1148.
36. BREGITZER P., POULSON M., JONES B.L. 1995. Malting quality of barley lines derived from tissue culture. *Cereal Chem.* 72 (5): 433–435.
37. BUSH S.R., EARLE E.D., LANGHANS R.W. 1976. Plantlets from petal segments, petal epidermis and shoot tips of the periclinal chimera, *Chrysanthemum morifolium* 'Indianapolis'. *Am. J. Bot.* 63(5): 729–737.
38. CANHOTO J.M., CRUZ G.S. 1994. Improvement of somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana* berg (*Myrtaceae*) by manipulation of culture media composition. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 30 (1): 21–25.
39. CAROLAN J.C., HOOK I.L.I., WALSH J.J., HODKINSON T.R. 2002. Using AFLP markers for species differentiation and assessment of genetic variability of *in vitro*-cultured *Papaver bracteatum* (Section Oxytona). *In Vitro Cellular Dev. Biol. Plant.* 38 (3): 300–307.
40. CASTILLO B., SMITH M.A.L. 1997. Direct somatic embryogenesis from *Begonia gracilis* explants. *Plant Cell Rep.* 16 (6): 385–388.
41. CHANG H.S., CHAKRABARTY D., HAHN E.J., PAEK K.Y. 2003. Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 39: 129–134.
42. CHARRIÈRE F., HAHNE G. 1998. Induction of embryogenesis versus caulogenesis on *in vitro* cultured sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature zygotic embryos: role of plant growth regulators. *Plant Sci.* 137: 63–71.
43. CHATTERJEE J., MANDAL A.K.A., RANADE S.A., TEIXEIRA DA SILVA J.A., DATTA S.K. 2006. Molecular systematics in *Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura. *Sci. Hort.* 110: 373–378.
44. CHEE R. 1986. *In vitro* culture of *Vitis*: the effects of light spectrum, manganese, and potassium iodide on morphogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 7: 121–134.
45. CHEE R., POOL R.M. 1989. Morphogenetic responses to propate trimming, spectral irradiance, and photoperiod of grapevine shoots recultured *in vitro*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 114: 350–354.
46. CHEONG E.J., POOLER M.R. 2004. Factors affecting somatic embryogenesis in *Prunus incisa* cv. February Pink. *Plant Cell Rep.* 22 (11): 810–815.

47. CHAKRABORTY A., CHATTOPADHYAY S. 2008. Stimulation of menthol production in *Mentha x piperita* cell culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 44 (6): 518–524.
48. CHO D.Y., LEE E.K., LEE S., CHUNG W.I., SOH W.Y. 2003. Enhanced somatic embryogenesis and plant regeneration in leaf *ex plant* cultures of *Ostericum koreanum* on medium of varying pH. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 75(3): 215–222.
49. COOPER C., CROWTHER T., SMITH B.M., ISAAC S., COLLIN H.A. 2006. Assessment of the response of carrot somaclones to *Pythium violae*, causal agent of cavity spot. *Plant Pathol.* 55: 427–432.
50. CORREIA S., CUNHA A.E., SALGUEIRO L., CANHOTO J.M. 2012. Somatic embryogenesis in tamarrillo (*Cyphomandra betacea*): Approaches to increase efficiency of embryo formation and plant development. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 109(1): 143–152.
51. COTE F.X., TEISSON C., PERRIER X. 2001. Somaclonal variation rate evolution in plant tissue culture: Contribution to understanding through a statistical approach. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 37 (5): 539–542.
52. CRUZ G.S., CANHOTO J.M., ABREU M.A.V. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. *Plant Sci.* 66 (2): 263–270.
53. CVIKROVA M., BINAROVA P., CENKLOVA V., EDER J., MACHAEKOVA I. 1999. Reinitiation of cell division and polyamine and aromatic monoamine levels in alfalfa explants during the induction of somatic embryogenesis. *Physiologia Plant.* 105: 330–337.
54. D'ONOFRIO C., MORINI S., BELLOCCHI G. 1998. Effect of light quality on somatic embryogenesis of quince leaves. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 53: 91–98.
55. DAMIANI F., MARIOTTI D., PEZZOTTI M., ARKONI S. 1990. Somaclonal variation in *Lotus corniculatus* L. in relation to plant breeding purposes. *Euphytica.* 46: 35–41.
56. DANTAS A.K., MAJADA J.P., FERNANDEZ B., CANAL M.J. 2001. Mineral nutrition in carnation tissue cultures under different ventilation conditions. *Plant Growth Regul.* 33: 237–243.
57. DATTA S.K., MANDAL A.K.A., SAXENA M. 2001. Direct organogenesis from ray and disk florets of a newly evolved chlorophyll variegated chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). *Indian J. Agric. Sci.* 71: 655–700.
58. DĄBSKI M. 2002. Badania nad ukorzeniem mikrosadzonek wybranych gatunków roślin ozdobnych. Wyd. AR w Lublinie. Rozpr. Nauk. Z. 262.
59. DE KLERK G.J. 1990. How to measure somaclonal variation. *Acta Bot. Neerl.* 39 (2): 129–144.
60. DE LA PEÑA C., GALAZ-AVALOS R.M., LOYOLA-VARGAS V.M. 2008. Possible Role of Light and Polyamines in the Onset of Somatic Embryogenesis of *Coffea canephora*. *Mol. Biotechnol.* 39: 215–224.
61. DE VRIES S.C., BOOIJ H., MEYERINK P., HUISMAN G., WILDE D.H., THOMAS T.L., VAN KAMMEN A. 1988. Acquisition of embryogenic potential in carrot cell - suspension culture. *Planta.* 176: 196–204.
62. DELPORTE F., MOSTADE O., JACQUEMIN J.M. 2001. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 67 (1): 73–80.
63. DENCHEV P., VELCHEVA M., ATANASSOV A. 1991. A new approach to direct somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell Rep.* 10 (6–7): 338–341.
64. DODEMAN V.L., DUCREUX G., KREIS M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.* 48: 1493–1509.
65. DUDITS D., GYORGYEY J., BOGRE L., BAKO L. 1995. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: Thorpe T.A. (red.) *In vitro* Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London: 267–308.
66. EARLE E.D., LANGHANS R.W. 1974. Propagation of *Chrysanthemum in vitro*: II. Production, growth and flowering of plantlets from tissue cultures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 99: 352–358.
67. EL ABIDINE TRIQUI Z., GUÉDIRA A., CHLYAH A., CHLYAH H., SOUVANNAVONG V., HAÏCOUR R., SI-HACHAKR D. 2008. Effect of genotype, gelling agent and auxin on the induction of somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). *Comptes Rendus – Biologies.* 331 (3): 198–205.
68. ELMEER K.M.S., HENNERTY M.J. 2008. Observations on the combined effects of light, NAA and 2,4-D on somatic embryogenesis of cucumber (*Cucumis sativus*) hybrids. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 95: 381–384.
69. ELMEER S., GALLAGHER T.F., HENNERTY M.J. 2009. RAPD-based detection of genomic instability in cucumber plants derived from somatic embryogenesis. *Afric. J. Biot.* 8 (14): 3219–3222.
70. ETIENNE H., BERTRAND B. 2003. Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. *Tree Physiology.* 23 (6): 419–426.

71. EVANS D.A., SHARP W.R. 1986. Application of somaclonal variation. *Biotechnology*. 4: 528–532.
72. EVANS N.E., FOULGER D., FARRER L. BRIGHT S.W.J. 1986. Somaclonal variation in explant – derived potato clones over three tuber generations. *Euphytica*. 35: 353–361.
73. FEIRER R.P., WANN S.R., EINSPAHR D.W. 1985. The effects of spermidine synthesis inhibitors on *in vitro* plant development. *Plant Growth Reg.* 3: 319–327.
74. FERREIRA W., SUZUKI R., PESCADOR R., FIGUEIREDO-RIBEIRO R., KERBAUY G. 2011. Propagation, growth, and carbohydrates of *Dendrobium* Second Love (*Orchidaceae*) *in vitro* as affected by sucrose, light, and dark. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 47 (3): 420–427.
75. FEYISSA T., WELANDER M., NEGASH L. 2005. *In vitro* regeneration of *Hagenia abyssinica* (Bruce) J.F. Gmel. (*Rosaceae*) from leaf explants. *Plant Cell Rep.* 24 (7): 392–400.
76. FILONOVA L., BOZHKOVA P., VON ARNOLD S. 2000. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J. Exp. Bot.* 51: 249–264.
77. FIUK A., BEDNAREK P., RYBCZYŃSKI J. (2010) Flow cytometry, HPLC-RP and metaFLP analyses to assess genetic variability in somatic embryo-derived plantlets of *Gentiana pannonica* Scop. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 28: 413–420.
78. FUJII Y., SHIMIZU K. 1990. Regeneration of plants from achenes and petals of *Chrysanthemum coccineum*. *Plant Cell Rep.* 8: 625–627.
79. FUKAI S., GOI M., TANAKA M. 1994. The chimeric structure of the apical dome of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* (Ramat.) Kitam.) is affected by cryopreservation. *Sci. Hort.* 57: 347–351.
80. FURUTA H., SHINOYONA H., NOMURA Y., MAEDA H., MAHIARO K. 2004. Production of intergeneric somatic hybrids of chrysanthemum (*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] and wormwood (*Artemisia sieversiana* J.F. Ehrh. Ex. Willd) with rust (*Puccinia horiana* Henning) resistance by electrofusion of protoplasts. *Plant Sci.* 166: 695–702.
81. GABARKIEWICZ B., GABRYSZEWSKA E., RUDNICKI R., GOSZCZYŃSKA D. 1997. Effects of light quality on *in vitro* growing of dieffenbachia cv. Compacta. *Acta Hort.* 418: 159–162.
82. GABRYSZEWSKA E., RUDNICKI R.M. 1997. The effects of light quality on the growth and development of shoots and roots of *Ficus benjamina* *in vitro*. *Acta Hort.* 418: 163–168.
83. GAIRI A., RASHID A. 2004. TDZ-induced somatic embryogenesis in non-responsive caryopses of rice using a short treatment with 2,4-D. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 76(1): 29–33.
84. GAJ M.D., KLEŚ K., SKURCZYŃSKA J. 1994. Ocena poziomu zmienności somaklonalnej w potomstwie roślin jęczmienia zregenerowanych w kulturach *in vitro* niedojrzałych zarodków. VII Ogólnopolska Konferencja Kultur *In Vitro*. Katowice–Ustroń, 21–23 września 1994: 381–391.
85. GAJ M.D. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Reg.* 43 (1): 27.
86. GAMBORG O.L., MILLER R.A., OJIMA K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50 (1): 151–158.
87. GERMANA M.A., CHIANCONE B., IACONA C., MULEO R. 2005. The effect of light quality on anther culture of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. *Acta Physiol. Plant.* 27 (4B): 717–721.
88. GESTEIRA A.S., OTONI W.C., BARROS E.G., MOREIRA M.A. 2002. RAPD-based detection of genomic instability in soybean plants derived from somatic embryogenesis. *Plant Breed.* 121 (3): 269–271.
89. GIMENEZ C., DE GARCÍA E., DE ENRECH N.X., BLANCA I. 2001. Somaclonal variation in banana: Cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant CIEN BTA-03. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 37 (2): 217–222.
90. GOREN R., PALAVAN N., FLORES H., GALSTON A.W. 1982. Changes in polyamine titer in etiolated pea seedlings following red light treatment. *Plant Cell Physiol.* 23 (1): 19–26.
91. GROPPA M.D., BENAVIDES M.P. 2008. Polyamines and abiotic stress: Recent advances. *Amino Acids.* 34 (1): 35–45.
92. GROPPA M.D., BENAVIDES M.P., TOMARO M.L. 2003. Polyamine metabolism in sunflower and wheat leaf discs under cadmium or copper stress. *Plant Sci.* 164 (2): 293–299.
93. GROPPA, M.D., TOMARO, M.L., BENAVIDES, M.P. 2001. Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Sci.* 161 (3): 481–488.
94. GUO B., YAN Q., LIU Y.-G., LIU C.-Z. 2007. Spectral composition of irradiation regulates the cell growth and flavonoids biosynthesis in callus cultures of *Saussurea medusa* Maxim. *Plant Growth Regul.* 52: 259–263.
95. HACCIOUS B. 1978. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphol.* 28: 74–81.

96. HAHN E.J., PAK K.Y. 2005. Multiplication of *Chrysanthemum* shoots in bioreactors as affected by culture method and inoculation density of single node stems. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2005 81: 301–306.
97. HAO Y.J., DENG X.X. 2002. Occurrence of chromosomal variations and plant regeneration from long-term-cultured citrus callus. *In Vitro Cellular Dev. Biol. Plant.* 38: 472–476.
98. HATTORI K. 1992. The process during shoot regeneration in the receptacle culture of chrysanthemum, *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Japan J. Breed.* 42: 227–34.
99. HEINZE B., SCHMIDT J. 1995. Monitoring genetic fidelity vs somaclonal variation in Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryogenesis by RAPD analysis. *Euphytica.* 85: 341–345.
100. HEO J.W., SHIN K.S., KIM S.K., PAK K.Y. 2006. Light Quality Affects *In Vitro* Growth of Grape 'Teleki 5BB'. *J. Plant Biol.* 49 (4): 276–280.
101. HILL G.P. 1968. Shoot formation in tissue cultures of *Chrysanthemum* „Bronze Pride”. *Physiol. Plant.* 21: 386–389.
102. HITMI A., BARTHOMIEUF C., SALLANON H. 1999. Rapid mass propagation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. by callus culture and ability to synthesise pyrethrins. *Plant Cell Rep.* 19 (2): 156–160.
103. HU F.X., ZHONG J.J. 2008. Jasmonic acid mediates gene transcription of ginsenoside biosynthesis in cell cultures of *Panax notoginseng* treated with chemically synthesized 2-hydroxyethyl jasmonate. *Process Biochem.* 43 (1): 113–118.
104. HUAN L.V.T., TAKAMURA T., TANAKA M. 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Sci.* 166 (6): 1443–1449.
105. HUANG X.L., LI X.J., LI Y., HUANG L.Z. 2001. The effect of AOA on ethylene and polyamine metabolism during early phases of somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. *Physiol. Plant.* 113: 424–429.
106. HUNAULT G., MAATAR A. 1995. Enhancement of somatic embryogenesis frequency by gibberellic acid in fennel. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 41 (2): 171–176.
107. HUNTER D.C., BURRITT D.J. 2005. Light quality influences the polyamine content of lettuce (*Lactuca sativa* L.) cotyledon explants during shoot production *in vitro*. *Plant Growth Reg.* 45: 53–61.
108. IBRAHIM A.K., AHMED S.A., KHATTAB S.E. EL SHERIF F.M. 2011. Efficient callus induction, plant regeneration and estragole estimation in tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). *J. Essential Oil Res.* 23 (4): 16–20.
109. ISHII Y., TAKAMURA T., GOI M., TANAKA M. 1998. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep.* 17 (6–7): 446–450.
110. ISRAELI Y., REUVENI O., LAHAV E. 1991. Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by *in vitro* techniques. *Sci. Hort.* 48 (1–2): 71–88.
111. JAIN A., ROUT G.R., RAINA S.N. 2002 Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Phlox paniculata* Linn. *Sci. Hort.* 94 (1–2): 137–143.
112. JAIN S.M., DE KLERK G.J. 1998. Somaclonal variation in breeding and propagation of ornamental crops. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 4 (2): 63–75.
113. JAIN. S.M. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica.* 118: 153–166.
114. JANKIEWICZ W. 1997. Regulatory Wzrostu i Rozwoju Roślin. PWN. Warszawa. ISBN 8301-121-87-4.
115. JERZY M. 2000. Chryzantemy, odmiany i uprawa. PWRiL, Warszawa: 7–46.
116. JERZY M., LUBOMSKI M. 1989. Rozmnażanie złoćieni *in vitro*. *Ogrod.* 5: 24–26.
117. JIMENEZ V.M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulatorson *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Reg.* 47: 91–110.
118. JIN S., MUSHKE R., ZHU H., TU L., LIN Z., ZHANG Y., ZHANG X. 2008. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. *Plant Cell Rep.* 27 (8): 1303–1316.
119. JOSHI M., SUJATH K., HAZRA S. 2008. Effect of TDZ and 2,4-D on peanut somatic embryogenesis and *in vitro* bud development. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 94 (1): 85–90.
120. KADKADE P., SEIBERT M. 1977. Phytochrome-regulated organogenesis in lettuce tissue culture. *Nature.* 270 (5632): 49–50.
121. KAEPLER S.M., KAEPLER H.F., RHEE Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol. Biol.* 43: 179–188.
122. KARAMI O., DELJOU A., POUR A.M. 2007. Repetitive somatic embryogenesis in carnation on picloram supplemented media. *Plant Growth Reg.* 51 (1): 33–39.
123. KARP A. 1991. On the current understanding of somaclonal variation. *Oxford Surveys of Plant Mol. Cell Biol.* 7: 1–58.

124. KARP A. 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica*. 85: 295–302.
125. KAUL V., MILLER R.M., HUTCHINSON J.F., RICHARDS D. 1990. Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 21 (1): 21–30.
126. KAWIAK A., ŁOJKOWSKA E. 2004. Application of RAPD in the determination of genetic fidelity in micropropagated *Drosera plantlets*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 40 (6): 592–595.
127. KĘPCZYŃSKI J., KĘPCZYŃSKA E. 2001. Regulatory wzrostu w somatycznej embriogenezie *Medicago sativa* L. *Biotechnologia*. 2 (53): 16–25.
128. KESKITALO M., KANERVA T., PEHU E. 1995. Development of *in vitro* procedures for regeneration of petiole and leaf explants and production of protoplast-derived callus in *Tanacetum vulgare* L. (Tansy). *Plant Cell Rep.* 14 (4): 261–266.
129. KEVERS C., GASPAR T., DOMMES J. 2002. The beneficial role of different auxins and polyamines at successive stages of somatic embryo formation and development of *Panax ginseng in vitro*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 70: 181–188.
130. KEVERS C., LE GAL N., MONTEIRO M., DOMMES J., GASPAR T. 2000. Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in liquid cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways. *Plant Growth Regul.* 31: 209–214.
131. KHALID N., DAVEY M.R., POWER J.B. 1989. An assessment of somaclonal variation in *Chrysanthemum morifolium*: the generation of plants of commercial value. *Sci. Hortic.* 38: 287–294.
132. KINTZIOS S., DROSSOPOULOS J., MANOUSARIDOU M., HOLEVAS C.D. 1996. Competence for callus induction on mature pepper leaves depends upon specific developmental stages of the donor plant. *Sci. Hort.* 65 (4): 341–347.
133. KINTZIOS S., MICHAELAKIS A. 1999. Induction of somatic embryogenesis and *in vitro* flowering from inflorescences of chamomile (*Chamomilla recucita* L.). *Plant Cell Rep.* 18: 684–690.
134. KOCHAN E., CHMIEL A. 2001. Dynamics of ginsenoside biosynthesis in suspension culture of *Panax quinquefolium*. *Acta Physiol. Plant.* 33: 911–915.
135. KONAN K.E., DURAND-GASSELIN T., KOUADIO Y., FLORI A., RIVAL A., DUVAL Y., PANNETIER C. 2009. *In vitro* conservation of oil palm somatic embryos for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. *Plant Cell Rep.* 29 (1): 1–13.
136. KONAN N.K., SANGWAN R.S., SANGWAN B.S. 1994. Somatic embryogenesis from cultured mature cotyledons of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Identification of parameters influencing the frequency of embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 37: 91–102.
137. KONONOWICZ H. 1992. Somatyczna embriogeneza roślin *in vitro*. II. Charakterystyka cytologiczna i problem stabilności genetycznej. *Post. Biol. Kom.* 19 (1): 35–44.
138. KOROCH A.R., KAPTEYN J., JULIANI H.R., SIMON J.E. 2003. *In vitro* regeneration of *Echinacea pallida* from leaf explants. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 39 (4): 415–418.
139. KOZAI T., KUBOTA C., JEONG B.R. 1997. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 51: 49–56.
140. KOZAK D. 2011. The influence of light quality and BA on *in vitro* growth and development of *Gardenia jasminoides* Ellis. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus.* 10 (4): 65–73.
141. KOZYRENKO M.M., ARTYUKOVA E.V., BOLTENKOV E.V., LAUVE L.S. 2004. Somaclonal variability of *Iris pseudacorus* L. judged by RAPD and cytogenetic analyses. *Russ. J. Biot.* 2: 13–23.
142. KRAMER G.F., KRIZEK D.T., MIRECKI R.M. 1992. Influence of photosynthetically active radiation and spectral quality on UV-B-induced polyamine accumulation in soybean. *Phytochem.* 31 (4): 1119–1125.
143. KULPA D., RZEPKA-PLEVNES D., KUREK J. 2004. The initiation of the callus cultures of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). *Biotechnologia*. 2: 231–236.
144. KUMAR S., KUMAR S., NEGI S.P., KANWAR J.K. 2008a. *In vitro* selection and regeneration of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Tzvelev) plants resistant to culture filtrate of *Septoria obesa* Sy. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 44: 474–479.
145. KUMAR S., MANGAL M., DHAWAN A.K., SINGH N. 2011 Assessment of genetic fidelity of micropropagated plants of *Simmondsia chinensis* (Link) Schneider using RAPD and ISSR markers. *Acta Physiol. Plant.* 33 (6): 2541–2545.
146. KUMAR V., GIRIDHAR P., CHANDRASHEKAR A., RAVISHANKAR G.A. 2008b. Polyamines influence morphogenesis and caffeine biosynthesis in *in vitro* cultures of *Coffea canephora* P. ex Fr. *Acta Physiol. Plant.* 30: 217–223.
147. KUMAR V., KUMARI R.B.D., CASTAÑO E. 2008c. Cyclic somatic embryogenesis and efficient plant regeneration from callus of safflower. *Biol. Plant.* 52 (3): 429–36.

148. KURILČIK A., MIKLUŠYTĖ-ČANOVA R., DAPKŪNIENĖ S., ŽILINSKAITĖ S., KURILČIK G., TAMULAITIS G., DUCHOVSKIS P., ŽUKAUSKAS P. 2008. *In vitro* culture of *Chrysanthemum* plantlets Rusing light-emitting diodes. *Cent. Eur. J. Biol.* 3 (2): 161–167.
149. KUSANO T., YAMAGUCHI K., BERBERICH T., TAKAHASHI Y. 2007. Advances in polyamine research in 2007. *J. Plant Res.* 120: 345–350.
150. KUZNETSOV V., RADYUKINA N.L., SHEVYAKOVA N.I. 2006. Polyamines and stress: biological role, metabolism and regulation. *Rus. J. Plant Physiol.* 53 (5): 583–604.
151. KVAALEN H., APPELGREN M. 1999. Light quality influences germination, root growth and hypocotyl elongation in somatic embryos but not in seedlings of Norway spruce. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 35 (6): 437–441.
152. LAINÉ E., DAVID A. 1993. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. *Plant Cell Rep.* 13 (8): 473–476.
153. LAKSHMANAN V., VENKATARAMAREDDY S.R., NEELWARNE B. 2007. Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. *Electr. J. Biot.* 10 (1): 8–12.
154. LARKIN P.J., SCOWCROFT W.R. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *TAG.* 60: 197–214.
155. LATKOWSKA M., CHMIEL H. 1996. The influence of light quality and growth regulators on shoots regeneration and rooting *in vitro* of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*) cv. Escort. *Zesz. Nauk. ART.* 137 (39): 129–136.
156. LATKOWSKA M.J., KVAALEN H., APPELGREN M. 2000. Genotype dependent blue and red light inhibition of the proliferation of the embryogenic tissue of Norway spruce. *In Vitro Cellul. Dev. Biol. Plant.* 36: 57–60.
157. LEE K.P., LEE D.W. 2003. Somatic embryogenesis and plant regeneration from seeds of wild *Dicentra spectabilis* (L.) LEM. *Plant Cell Rep.* 22: 105–109.
158. LEE M., PHILLIPS R.L. 1988. The chromosomal basis of somaclonal variation. *Ann. Rev. Physiol. Plant. Plant Mol. Biol.* 39: 413–437.
159. LEMA-RUMIŃSKA J. 2011. Flow cytometric analysis of somatic embryos, shoots, and calli of the cactus *Copiapoa tenuissima* Riit. forma monstruosa. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 106 (3): 531–535.
160. LEMA-RUMIŃSKA J. 2007. Stabilność genetyczna chryzantem otrzymanych przez somatyczną embriogenezę. *Wiad. Chryzantemowe.* 31: 21–24.
161. LEMA-RUMIŃSKA J., ŚLIWIŃSKA E. 2009. Evaluating the stability of plants obtained from the somatic embryos in chrysanthemum (*Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat) Kitam.). *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 539: 425–432.
162. LEROY X.J., LEON K., HILY J.M., CHAUMEIL P., BRANCHARD M. 2001. Detection of *in vitro* culture-induced instability through inter-simple sequence repeat analysis. *TAG.* 102 (6–7): 885–891.
163. LINSMAIER E.M., SKOOG F. 1965. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 18 (1): 100–127.
164. LITZ R.E., GRAY D.J. 1995. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. *World J. Microbiol. Biot.* 11: 416–425.
165. LIU J.H., MORIGUCHI T. 2007. Changes in free polyamine titers and expression of polyamine biosynthetic genes during growth of peach *in vitro* callus. *Plant Cell Rep.* 26: 125–131.
166. LIU X., YANG G. 2012. Adventitious shoot regeneration of oriental lily (*Lilium orientalis*) and genetic stability evaluation based on ISSR marker variation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 48 (2): 172–179.
167. LIU Y.Y., WANG B.C., ZHAO H.C., DUAN C.R., CHEN X. 2001. Alternative stress effects on Ca²⁺ localization in *Chrysanthemum* callus cells. *Colloids Surf. B: Biointerface.* 22 (3): 245–249.
168. LOPES T., CAPELO A., BRITO G., LOUREIRO J., SANTOS C. 2009. Genetic variability analyses of the somatic embryogenesis induction process in *Olea spp.* using nuclear microsatellites. *Trees Struct. Funct.* 23 (1): 29–36.
169. LOVAAS E. 1991. Antioxidative effects of polyamines. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68: 353–358.
170. MAHALAKSHMI A., SINGLA B., KHURANA J.P., KHURANA P. 2007. Role of calcium-calmodulin in auxin-induced somatic embryogenesis in leaf base cultures of wheat (*Triticum aestivum* var. HD 2329). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 88 (2): 167–174.
171. MAHMOOD T., NAZAR N., ABBASI B.H., KHAN M.A., AHMAD M., ZAFAR M. 2010. Detection of somaclonal variations using RAPD fingerprinting in *Silybum marianum* (L.). *J. Med. Plant Res.* 4 (17): 1822–1824.

172. MAKOWCZYŃSKA J., ANDRZEJEWSKA-GOLEC E., ŚLIWIŃSKA E. 2008. Nuclear DNA content in different plant materials of *Plantago asiatica* L. cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 94 (1): 65–71.
173. MALABADI R.B., VAN STADEN J. 2005. Role of antioxidants and amino acids on somatic embryogenesis of *Pinus patula*. *In Vitro Cellular Dev. Biol. Plant.* 41 (2): 181–186.
174. MALARZ J., STOJAKOWSKA A., SZNELER E., KISIEL W. 2005. Furofuran lignans from a callus culture of *Cichorium intybus*. *Plant Cell Rep.* 24 (4): 246–249.
175. MALAURE R.S., BARCLAY G., POWER J.B., DAVEY M.R. 1991. The production of novel plants from florets of *Chrysanthemum morifolium* using tissue culture. Shoot regeneration from ray florets and somaclonal variation exhibited by the regenerate plants. *Plant Physiol. J.* 139: 8–13.
176. MALEPSZY S., WRÓBLEWSKI T. 1994. Proces somatycznej embriogenezy – charakterystyka ogólna. *Post. Biol. Kom.* 21 (4): 1–10.
177. MANDAL A.K.A., CHAKRABARTY D., DATTA S.K. 2000. *In vitro* isolation of solid novel flower colour mutants from induced chimeric ray florets of chrysanthemum. *Euphytica.* 114: 9–12.
178. MANDAL A.K.A., DATTA S.K. 2005. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from ray florets of chrysanthemum. *Biologia Plant.* 49 (1): 29–33.
179. MANDAL A.K.A., GUPTA D.S., CHATTERJI A.K. 2001. Factors Affecting Somatic Embryogenesis from Cotyledonary Explants of Safflower. *Biologia Plant.* 44 (4) 503–507.
180. MANDAL A.K.A., GUPTA D.S. 2003. Somatic embryogenesis of safflower: Influence of auxin and ontogeny of somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 72 (1): 7–31.
181. MARTIN C., GONZÁLES-BENITO M.E. 2005. Survival and genetic stability of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev shoot apices after cryopreservation by vitification and encapsulation-dehydration. *Cryobiol.* 51: 281–289.
182. MARTIN C., UBERHUAGA E., PEREZ C. 2002. Application of RAPD markers in the characterisation of *Chrysanthemum* varieties and the assessment of somaclonal variation. *Euphytica.* 127: 247–253.
183. MARTINELLI L., BRAGAGNA P., POLETTI V., SCIENZA A. 1993. Somatic embryogenesis from leaf- and petiole-derived callus of *Vitis rupestris*. *Plant Cell Rep.* 12 (4): 207–210.
184. MARTINS M., SARMENTO D., OLIVEIRA M.M. 2004. Genetic stability of micropropagated almond platlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Genetics Genomics.* 23: 492–496.
185. MARUM L., ROCHETA M., MAROCO J., OLIVEIRA M.M., MIGUEL C. 2009. Analysis of genetic stability at SSR loci during somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*). *Plant Cell Rep.* 28 (4): 673–682.
186. MASOJC P. 2001. Ustalenie tożsamości genetycznej. W: S. Malepszy (red.) *Biotechnologia roślin*. PWN, Warszawa. ISBN: 978-83-01-15947-4.
187. MAURI P.V., MANZANERA J.A. 2011. Somatic embryogenesis of holm oak (*Quercus ilex* L.): ethylene production and polyamine content. *Acta Physiol. Plant.* 33: 717–723.
188. MAY R.A., TRIGIANO R.N. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 116: 366–371.
189. MCKERSIE B.D., BROWN D.C.W. 1996. Somatic embryogenesis and artificial seeds in forage legumes. *Seed Sci. Res.* 6: 109–126.
190. MERKELE S.A., PARROT W.A., FLINN B.S. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe T.A. (ed.) *In vitro Embryogenesis in Plants*. s. 155–203. Kluwer Acad. Pub., Dordrecht, Boston, London.
191. MICHALCZUK L., COOKE T.J., COHEN J.D. 1992. Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. *Phytochem.* 31 (4): 1097–1103.
192. MIKULA A., RYBCZYŃSKI J.J. 2001. Somatic embryogenesis of *Gentiana* genus I. The effect of the preculture treatment and primary explant origin on somatic embryogenesis of *Gentiana cruciata* (L.), *G. pannonica* (Scop.), and *G. tibetica* (King). *Acta Physiol. Plant.* 23 (1): 15–25.
193. MILER N., ZALEWSKA M. 2006. The influence of light colour on micropropagation of chrysanthemum. *Acta Hort.* 725: 347–350.
194. MINOCHA R., SMITH D.R., REEVES C., STEELE K.D., MINOCHA S.C. 1999. Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. *Physiol. Plant.* 105: 155–164.
195. MISHRA M., SHREE Y., PATI R., SEAL S., SHUKLA N., KAMLE M., CHANDRA R., SRIVASTAVA A. 2010. Micropropagation of *Mangifera indica* L. cv. Kurakkan through somatic embryogenesis. *Indian J. Gen. Plant Breed.* 70 (1) 85–90.
196. MOHANTY S., PANDA M., SUBUDHI E., NAYAK S. 2008. Plant regeneration from callus culture of *Curcuma aromatica* and *in vitro* detection of somaclonal variation through cytophotometric analysis. *Biol. Plant.* 52: 783–786.

197. MÖLLER R., McDONALD A.G., WALTER C., HARRIS P.J. 2003. Cell differentiation, secondary cell-wall formation and transformation of callus tissue of *Pinus radiata* D. Don. *Planta*. 217 (5): 736–747.
198. MONTEIRO M., KEVERS C., DOMMES J., GASPAR T. 2002. A specific role for spermidine in the initiation phase of somatic embryogenesis in *Panax ginseng* CA Meyer. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 68: 225–232.
199. MOON H.K., STOMP A.M. 1997. Effects of medium components and light on callus induction growth, and frond regeneration in *Lemna gibba* (Duckweed). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 33 (1): 20–25.
200. MORARD P., FULCHERI C., HENRY M. 1998. Kinetics of mineral nutrient uptake by *Saponaria officinalis* L. suspension cell cultures in different media. *Plant Cell Rep.* 18: 260–265.
201. MOREIRA DA SILVA M.H., DEBERGH P.C. 1997. The effect of light quality on the morphogenesis of *in vitro* cultures of *Azorina vidalii* (Wats.) Feer. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 51: 187–193.
202. MORINI S., D'ONOFFRIO C., BELLOCCHI G., FISICHELLA M. 2000. Effect of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from *in vitro* cultured quince leaves. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 63: 47–55.
203. MUIR R.M., ZHU L. 1983. Effects of light in the control of growth by auxin and its inhibitor(s) in the sunflower. *Physiol. Plant.* 57: 407–410.
204. MULEO R., MORINI S. 1990. Effect of light quality on regeneration of from callus of *Actinidia deliciosa*. *Acta Hort.* 280: 459–462.
205. MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–479.
206. NEHRA N.S., KARTHA K.K., STUSHNOTT C., GILES K.L. 1992. The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 29 (3): 257–268.
207. NGEZAHAYO F., DONG Y., LIU B. 2007. Somaclonal variation at the nucleotide sequence level in rice (*Oryza sativa* L.) as revealed by RAPD and ISSR markers, and by pairwise sequence analysis. *J. App. Gen.* 48 (4): 329–336.
208. NIEMI K., SARJALA T., CHEN X., HAGGMAN H. 2007. Spermidine and the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* synergistically induce maturation of Scots pine embryogenic cultures. *J. Plant Physiol.* 164: 629–635.
209. NOMURA K., KOMAMINE A. 1995. Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiol.* 79: 988–991.
210. NOWAK B., MICZYNSKI K., HUDY L. 2007. The effect of total inorganic nitrogen and the balance between its ionic forms on adventitious bud formation and callus growth of 'Wegierka Zwyczajła' plum (*Prunus domestica* L.). *Acta. Physiol. Plant.* 29: 47–48.
211. OONO K. 1985. Putative homozygous mutations in regenerated plants of rice. *Mol. Gen. Genet.* 198: 377–384.
212. OSIPOVA E.S., KOKAEVA Z.G., TROITSKIJ A.V., DOLGIKH YU.I., SHAMINA Z.B., GOSTIMSKIJ S.A. 2001. RAPD Analysis of Maize Somaclones. *Russian J. Gen.* 37 (1): 80–84.
213. PAEK K.Y., CHAKRABARTY D., HAHN E.J. 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 81: 287–300.
214. PAEK K.Y., HAHN E.J., SON S.H. 2001. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37: 149–157.
215. PALOMBI M.A., LOMBARDO B., CABONI E. 2007. In vitro regeneration of wild pear (*Pyrus pyraster* Burgsd) clones tolerant to Fe-chlorosis and somaclonal variation analysis by RAPD markers. *Plant Cell Rep.* 26 (4): 489–496.
216. PAN M.J., VAN STADEN J. 1999. Effect of activated charcoal, autoclaving and culture media on sucrose hydrolysis. *Plant Growth Reg.* 29: 135–141.
217. PAUL A., MITTER K., RAYCHAUDHURI S.S. 2009. Effect of polyamines on *in vitro* somatic embryogenesis in *Momordica charantia* L. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 97: 303–311.
218. PAVINGEROVÁ D., DOSTÁL J., BISKOVÁ R., BENETKA V. 1994. Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*–mediated transformation of chrysanthemum. *Plant Sci.* 97: 95–101.
219. PAEK K.Y., CHAKRABARTY D., HAHN E.J. 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 81: 287–300.
220. PAEK K.Y., HAHN E.J., SON S.H. 2001. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 37: 149–157.

221. PINTO G., YILL S.S., PARK S., NEVES L., ARAUJO C., SANTOS C. 2008. Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium and anti-browning agents. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 95: 79–88.
222. PODWYSZYŃSKA M., KURAŚ A., KORBIN M. 2010. ISSR evaluation of genetic stability of Polish tulip cultivars propagated *in vitro*. *Biotechnologia*. 2: 105–113.
223. PRADO M.J., RODRIGUEZ E., REY L., GONZÁLEZ M.V., SANTOS C., REY M. 2010. Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis-regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 103 (1): 49–59.
224. PREIL W. 1986. *In vitro* propagation and breeding of ornamental plants: advantage of variability. Genetic Manipulation in Plant Breeding. (ed. Semal J.). Martinus Nijhoff, Dordrecht. 377–403.
225. PRETTO F.R., SANTAREM E.R. 2000. Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 62: 107–113.
226. PRUSKI K., DUPLESSIS P., LEWIS T., ASTATKIE T., NOWAK J., STRUIK P.C. 2001. Jasmonate effect on *in vitro* tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars under light and dark conditions. *Potato Res.* 44: 315–325.
227. PRZYBECKI Z., MALEPSZY S. 1992. Molekularne podstawy zmienności somaklonalnej u roślin. *Biotechnologia*. 3 (18): 30–41.
228. PTAK A. 2010. Somatic embryogenesis in *in vitro* culture of *Leucojum vernum* L. *Meth. Mol. Biol.* 589: 223–233.
229. RAIMONDI J.P., CAMADRO E.L., BABINEC F.J. 2001. Somatic embryogenesis in *Asparagus officinalis* L. cv. Argenteuil: Interactions between genotype, explant type and growth regulators on callus induction, growth and embryogenic differentiation. *Biocell*. 25 (2): 147–154.
230. RAJ BHANSALI R., DRIVER J.A., DURZAN D.J. 1990. Rapid multiplication of adventitious somatic embryos in peach and nectarine by secondary embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 9 (5): 280–284.
231. RAKOCZY-TROJANOWSKA M. 1999. Charakterystyka zmienności somaklonalnej trzech linii wsobnych żyta ozimego (*Secale cereale* L.). SGGW, Warszawa.
232. RAMANAYAKE S.M.S.D., WANNIARACHCHI W.A.V.R. 2003. Organogenesis in callus derived from an adult giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro). *Sci. Hort.* 98 (2): 195–200.
233. RANI V., RAINA S.N. 2000. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: A critical reappraisal. *In Vitro Cellular Dev. Biol. Plant.* 36 (5): 319–330.
234. RATHORE M.S., CHIKARA J., MASTAN S.G., RAHMAN H., ANAND K.G.V., SHEKHAWAT N.S. 2011. Assessment of genetic stability and instability of tissue culture-propagated plantlets of *Aloe vera* L. by RAPD and ISSR markers. *Appl. Bioch. Biot.* 165 (5–6): 1356–1365.
235. RAY T., DUTTA I., SAHA P., DAS S., ROY S.C. 2005. Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Genetic planis, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 85: 11–21.
236. REHMAN R.U., ISRAR M., SRIVASTAVA P.S., BANSAL K.C., ABDIN M.Z. 2003. *In vitro* regeneration of witloof chicory (*Cichorium intybus* L.) from leaf explants and accumulation of esculin. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 39 (2):142–146.
237. RIEDEL H., AKUMO D.N., SAW N.M.M.T., KÜTÜK O., NEUBAUER P., SMETANSKA I. 2012. Elicitation and precursor feeding influence phenolic acids composition in *Vitis vinifera* suspension culture. *Afr. J. Biot.* 11 (12): 3000–3008.
238. RODRIGUEZ-LÓPEZ C.M., WETTEN A.C., WILKINSON M.J. 2004. Detection and quantification of *in vitro*-culture induced chimerism using simple sequence repeat (SSR) analysis in *Theobroma cacao* (L.). *TAG*. 110 (1): 157–166.
239. ROEST S., BOKELMANN G.S. 1975. Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ram. *in vitro*. *Sci. Hortic.* 3: 317–30.
240. ROUT G.R., DAS P. 1997. Recent trends in the biotechnology of *Chrysanthemum*: a critical review. *Sci. Hort.* 69: 239–256.
241. ROUT G.R., MOHAPATRA A., JAIN S. 2001. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biot. Advances*. 24 (6): 531–560.
242. RUDUŚ I., KĘPCZYŃSKA E., KĘPCZYŃSKI J. 2006. Comparative efficacy of abscisic acid and methyl jasmonate for indirect somatic embryogenesis in *Medicago sativa* L. *Plant Growth Reg.* 48 (1): 1–11.
243. RUDUŚ I., KĘPCZYŃSKI J., KĘPCZYŃSKA E. 2001. The influence of the jasmonates and abscisic acid on callus growth and somatic embryogenesis in *Medicago sativa* L. tissue culture. *Acta Physiol. Plant.* 23 (1): 103–107.

244. RYNNANEN L., ARONEN T. 2005. Genome fidelity during short- and long-term tissue culture and differentially cryostored meristems of silver birch (*Betula pendula*). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 83 (1): 21–32.
245. SAKHANOKHO H.F., OZIAS-AKINS P., MAY O.L., CHEE P.W. 2005. Putrescine enhances somatic embryogenesis and plant regeneration in upland cotton. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 81: 91–95.
246. SANCHEZ M.C., MARTÍNEZ M.T., VALLADARES S., FERRO E., VIÉITEZ A.M. 2003. Maturation and germination of oak somatic embryos originated from leaf and stem explants: RAPD markers for genetic analysis of regenerants. *J. Plant Physiol.* 160 (6): 699–707.
247. SATO-NARA K., DEMURA T., FUKUDA H. 2004. Expression of photosynthesis-related genes and their regulation by light during somatic embryogenesis in *Daucus carota*. *Planta.* 219 (1): 23–31.
248. SAUVE R.J., MMBAGA M.T., ZHOU S. 2004. *In vitro* regeneration of the tennessee coneflower (*Echinacea tenesseeensis*). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 40: 325–328.
249. SAXENA G., BANERJEE S., RAHMAN L., MALLAVARAPU G.R., SHARMA S., KUMAR S. 2000. An efficient *in vitro* procedure for micropropagation and generation of somaclones of rose scented *Pelargonium*. *Plant Sci.* 155 (2): 133–140.
250. SAXENA S., DHAWAN V. 1999. Regeneration and large-scale propagation of bamboo (*Dendrocalamus strictus* Nees) through somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 18 (5): 438–443.
251. SCHENK R.U., HILDEBRANDT A. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199–204.
252. SCHMITZ U., LÖRZ H. 1990. Nutrient uptake in suspension cultures of gramineae. II. Suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* 66 (1): 95.
253. SCHWEEN G., SCHWENKEL H.G. 2003. Effect of genotype on callus induction, shoot regeneration, and phenotypic stability of regenerated plants in the greenhouse of *Primula ssp.* *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 72 (1): 53–61.
254. SCHMITZ U., LÖRZ H. 1990. Nutrient uptake in suspension cultures of Gramineae. II. Suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* 66: 95–111.
255. SEABROOK J.E.A. 2005. Light effects on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum*) *in vitro*: A review. *Am. J. Potato Res.* 82 (5): 353–367.
256. SELLES M., VILADOMAT F., BASTIDA J., CODINA C. 1999. Callus induction, somatic embryogenesis and organogenesis in *Narcissus confusus*: Correlation between the state of differentiation and the content of galanthamine and related alkaloids. *Plant Cell Rep.* 18 (7–8): 646–651.
257. SHARMA S.K., BRYAN G.J., WINFIELD M.O., MILLAM S. 2007. Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: A comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. *Planta.* 226 (6): 1449–1458.
258. SHEKHAWAT G.S., MATHUR S., BATRA A. 2009. Role of phytohormones and nitrogen in somatic embryogenesis induction in cell culture derived from leaflets of *Azadirachta indica*. *Biologia Plant.* 53 (4): 707–710.
259. SHEN H.J., XIE Y.F., LI R.T. 1994. Effects of acid stress on polyamine levels, ion efflux, protective enzymes and macromolecular synthesis in cereal leaves. *Plant Growth Reg.* 14 (1): 1–5.
260. SHIN K.S., CHAKRABARTY D., KO J.Y., HAN S.S., PAK K.Y. 2002. Sucrose utilization and mineral nutrient uptake during hairy root growth of red beet (*Beta vulgaris* L.) in liquid culture. *Plant Growth Regul.* 39: 187–193.
261. SHOEB F., YADAV J.S., BAJAJ S., RAJAM M.V. 2001. Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: Improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. *Plant Sci.* 160: 1229–1235.
262. SILVA T.E.R., CIDADE L.C., ALVIM F.C., CASCARDO J.C.M., COSTA M.G.C. 2009. Studies on genetic transformation of *Theobroma cacao* L.: evaluation of different polyamines and antibiotics on somatic embryogenesis and the efficiency of uidA gene transfer by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 99: 287–298.
263. SILVEIRA V., SANTA-CATARINA C., TUN N.N., SCHERER G.F.E., HANDRO W., GUERRA M.P., FLOH E.I.S. 2006. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O Ktze. *Plant Sci.* 171: 91–98.
264. SIVAKUMAR G., KIM S.J., HAHN E.J., PAK K.Y. 2005. Optimizing environmental factors for large-scale multiplication of chrysanthemum (*Chrysanthemum grandiflorum*) in balloon-type bioreactor culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 41: 822–825.
265. SKIRVIN R.M. 1978. Natural and induced variation in tissue culture. *Euphytica.* 27: 241–266.
266. SKUCIŃSKA B. 2001. Indukcja zmienności genetycznej *in vitro*. *Biotechnologia.* 3 (54): 145–151.

267. SLIWINSKA E., THIEM B. 2007. Genome size stability in six medicinal plant species propagated *in vitro* *Biologia Plant.* 51 (3): 556–558.
268. ŚLIWINSKA E., ŁUKASZEWSKA E. 2005. Polysomaty in growing *in vitro* sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) seedlings of different ploidy level. *Plant Sci.* 168 (4): 1067–1074.
269. SMITH D.L., KRİKORIAN A.D. 1990. Somatic proembryo production from excised, wounded zygotic carrot embryos on hormone-free medium: evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal. *Plant Cell Rep.* 9: 468–470.
270. SMITH T.A. 1985. The inhibition and activation of polyamine oxidase from oat seedlings. *Plant Growth Reg.* 3 (3–4): 269–275.
271. SMYKAL P., VALLEDOR L., RODRÍGUEZ R., GRIGA M. 2007. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Rep.* 26 (11): 1985–1998.
272. SONIYA E.V., BANERJEE N.S., DAS M.R. 2001. Genetic analysis of somaclonal variation among callus-derived plants of tomato. *Current Sci.* 80 (9): 1213–1215.
273. SOUTHWORTH D., KWIATKOWSKI S. 1991. Somatic embryogenesis from immature embryos in meadowfoam (*Limnanthes alba*). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 24: 193–198.
274. SRINIVASAN V., PESTCHANKER L., MOSER S., HIRASUNA T.J., TATICEK R.A., SHULER M.L. 1995. Taxol production in bioreactors: Kinetics of biomass accumulation, nutrient uptake, and taxol production by cell suspensions of *Taxus baccata*. *Biot. Bioengineering.* 47 (6): 666–676.
275. STASOLLA C., KONG L., YEUNG E., THORPE T.A. 2002. Maturation of somatic embryos in conifers: morpho-genesis, physiology, bio-chemistry and molecular biology. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 38: 93–105.
276. STASOLLA C., YEUNG E.C. 2001. Ascorbic acid metabolism during white spruce somatic embryo maturation and germination. *Physiol. Plant.* 111 (2): 196–205.
277. STEFANIAK B. 2004. Roślinne kultury *in vitro*. W: Komórki roślinne w warunkach stresu. (Ed.) Wózny A., Przybył K. Poznań Wydaw. Nauk. UAM: 14–91.
278. STEINER N., SANTA-CATARINA C., SILVEIRA V., FLOH E.I.S., GUERRA M.P. 2007. Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 89 (1): 55–62.
279. STEINMACHER D.A., CANGAHUALA-INOCENTE G.C., CLEMENT C.R., GUERRA M.P. 2007. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 43: 124–132.
280. TAKEDA T., HAYAKAWA F., OE K., MATSUOKA H. 2002. Effects of exogenous polyamines on embryogenic carrot cells. *Biochem Eng. J.* 12: 21–28.
281. TANAKA K., KANNO Y., KUDO S., SUZUKI M. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura). *Plant Cell Rep.* 19: 946–53.
282. TANG W. 2000. High-frequency plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis and *in vitro* flowering of regenerated plantlets in *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep.* 19 (7): 727–732.
283. TANG W., NEWTON R.J., OUTHAVONG V. 2004. Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. *Physiol. Plantarum.* 122 (3): 386–395.
284. TEIXEIRA DA SILVA J.A. 2003a. Chrysanthemum: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetic and transgenic biotechnology. *Biot. Advances.* 21: 715–766.
285. TEIXEIRA DA SILVA J.A. 2003b. Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. *African J. Biot.* 2 (12): 856–866.
286. TEIXEIRA DA SILVA J.A. 2003c. Thin cell layer technology for induced response and control of rhizogenesis in chrysanthemum. *Plant Growth Regul.* 39: 67–76.
287. TEIXEIRA DA SILVA J.A. 2004. Ornamental chrysanthemums: improvement by biotechnology. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 79: 1–18.
288. THOMAS C., BRONNER R., MOLINIER J., PRINSEN E., VAN ONCKELEN H., HAHNE G. 2002. Immunocytochemical localization of indole-3-acetic acid during induction of somatic embryogenesis in cultured sunflower embryos. *Planta.* 215 (4): 577–583.
289. THOMAS J., VIJAYAN D., JOSHI S.D., LOPEZ J.S., KUMAR R.R. 2006. Genetic integrity of somaclonal variants in tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) as revealed by Inter simple sequence repeats. *J. Biot.* 123: 149–154.
290. THORPE T.A., STASOLLA C. 2001. Somatic embryogenesis. In: Bhojwani S.S. (red.) *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. s: 279–336.

291. TIAN M., GU Q., ZHU M. 2003. The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus. *Plant Sci.* 165 (4): 701–707.
292. TRIBULATO A., REMOTTI P.C., LÖFFLER H.J.M., VAN TUYL J.M. 1997. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Lilium longiflorum* Thunb. *Plant Cell Rep.* 17 (2): 113–118.
293. TUCKER D.J. 1976. Effects of far-red light on hormonal control of side-shoot growth in the tomato. *Ann. Bot.* 40: 1033–1042.
294. VOTRUBA R., KODYTECK K. 1988. Investigation of genetic stability in *Chrysanthemum morifolium* 'Blanche Poitevine Supreme' after meristem culture. *Acta Hort.* 226: 311–319.
295. WALKER T.S., BAIS H.P., VIVANCO J.M. 2002. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Phytochem.* 60: 289–293.
296. WANG B., ZHAO H., DUAN CH., SAKANISHI A. 2002. Effects of cell wall calcium on the growth of *Chrysanthemum* callus under sound stimulation. *Colloids Surf. B: Biointerface.* 25: 189–195.
297. WANG H., LIU H., WANG W., ZU Y. 2005. Effects of Thidiazuron, basal medium and light quality on adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured stem of *Populus alba* × *P. berolinensis*. *J. For. Res.* 19 (3): 257–259.
298. WANG J., GAO W.Y., ZHANG J., HUANG T., CAO Y., ZHAO Y.X. 2010. Dynamic change of metabolites and nutrients in suspension cells of *Panax quinquefolium* L. in bioreactor. *Acta Phys. Plant.* 32 (3): 463–467.
299. WANG J., GAO W.Y., ZHANG J., ZUO B.M., ZHANG L.M., HUANG L.Q. 2012. Production of ginsenoside and polysaccharide by two-stage cultivation of *Panax quinquefolium* L. cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 48 (1): 107–112.
300. WEI W.S., HWANG W.I., KIM S.Y., SAGAWA Y. 1997. Induction of somatic embryogenesis in *Azadirachta indica*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 50 (2): 91–95.
301. WHITE P.R. 1943. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol.* 9: 585–600.
302. WILSON D.A., WEIGEL R.C., WHEELER R.M., SAGER J.C. 1993. Light spectral quality effects on the growth of potato (*Solanum tuberosum* L.) nodal cuttings *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 29 (1): 5–8.
303. WINKELMANN T., SEREK M. 2005. Genotypic differences in callus formation and regeneration of somatic embryos in *Cyclamen persicum* Mill. *Euphytica.* 144 (1–2): 109–117.
304. WOLFF K. 1996. RAPD analysis of sporting and chimerism in chrysanthemum. *Euphytica.* 89 (2): 159–164.
305. WOLFF K., VAN RIJN J. 1993. Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) using random primer. *Heredity.* 71: 335–341.
306. WOLFF K., SCHOEN E.D., VAN RIJN J. 1993. Optimizing the generation of random amplified polymorphic DNAs in *Chrysanthemum*. *TAG.* 86 (8): 1033–1037.
307. Wróblewski T. 1994. Proces somatycznej embriogenezy – charakterystyka szczegółowa. *Postępy Biol. Komórki* 21 (4): 11–32.
308. WU X.B., WANG J., LIU J.H., DENG X.X. 2009. Involvement of polyamine biosynthesis in somatic embryogenesis of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) induced by glycerol. *J. Plant Physiol.* 166 (1): 52–62.
309. XIE D.Y., HONG Y. 2001. Regeneration of *Acacia mangium* through somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 20 (1): 34–40.
310. YADAV P.V., SUPRASANNA P., GOPALRAO K.U., ANANT B.V. 2006. Molecular profiling using RAPD technique of salt and drought tolerant regenerants of sugarcane. *Sugar Tech.* 8 (1): 63–68.
311. YEUNG E.C. 1995. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. W: Thorpe TA (ed.) *In vitro* Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, s. 205–247.
312. YOSHIDA I., HIRASAWA E. 1998. Photoinduction of arginine decarboxylase activity in leaves of *Pharbitis nil*. *Phytochem.* 49 (8): 2255–2259.
313. ZALEWSKA M. 2005. Chryzantemy w ogrodzie i ich bliscy krewni. Wydaw. Działkowiec. Warszawa: 86.
314. ZALEWSKA M., LEMA-RUMIŃSKA J., MILER N. 2007. *In vitro* propagation using adventitious buds technique as a source of new variability in chrysanthemum. *Sci. Hort.* 113: 70–73.
315. ZALEWSKA M., LEMA-RUMIŃSKA J., MILER N., GRUSZKA M., DĄBAL W. 2011. Induction of adventitious shoot regeneration in chrysanthemum as affected by the season. *In Vitro Cellular Dev. Biol. Plant.* 47 (3): 375–378.

316. ZALEWSKA M., MILER N., WENDA-PIESIK A. 2010. Effect of *in vitro* topophysis on the growth, development, and rooting of chrysanthemum explants (*Chrysanthemum x grandiflorum* /Ramat/ Kitam). *J. Hort. Sci. Biol.* 85 (4): 362–366.
317. ZEIBUR N.K.; BRINK R.A.; GRAF L.H. 1950. Effect of casein hydrolysate on the growth *in vitro* of immature *Hordeum* embryos. *Am. J. Bot.* 37: 144–148.
318. ZHAO H.C., WANG B.C., LIU B.A., CAI S.X., XI B.S. 2002. The effects of sound stimulation on the permeability of K⁺ channel of *Chrysanthemum* callus plasma. *Colloids Surf. B: Biointerface.* 26 (4): 329–333.
319. ZHAO J.Z., ZHOU L.G., WU J.Y. 2010. Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87: 137–144.
320. ZIMMERMAN J.L. 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell.* 5: 1411–1423.
321. ZIETKIEWICZ E., RAFALSKI A., LABUDA D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20 (2): 176–183.

Somatic embryogenesis in cultures of the multiflorous chrysanthemum (*Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat.) Kitam)

Summary

The multiflorous chrysanthemum (*Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat.) Kitam) is one of the most popular decorative plants. All varieties of chrysanthemums are multiplied vegetatively, by conventional way or with the use of microseedling in *in vitro* cultures. As the demand for seedlings of this plant is enormous, methods to multiply the plant of this species, which would allow to obtain a large number of seedlings in relatively short period of time, are still searched for. Such a method is the somatic embryogenesis, or else the process of embryos initiating from somatic cells in *in vitro* cultures. In spite of its potential, this is a process dependent upon the numerous environmental factors and correlated, to a large degree, with the genotype of plant multiplication. As there is no well worked out method for obtaining somatic embryos of such economically important plant as the chrysanthemum, a trial was undertaken to set forth the maximized number of factors which have an impact on the course of this process.

The aim of the study was to select an optimum plant growth medium to initiate and multiply the callus culture of the multiflorous chrysanthemum, with a particular attention paid to the impact of auxins rarely applied up to now: picloram and dicamba. In the research, a trial was also undertaken to set forth the impact of growth regulators on the intermediate initiations of somatic embryogenesis in callus cultures and direct somatic embryogenesis, with a particular attention paid to the role of polyamines (putrescine, spermine and spermidine) in the course of this process. The callus tissue was induced on growth media solidified with agar, with an addition of auxins: 2,4-D, NAA, IBA, IAA, PIK and DIC, cytokinin BAP as well as polyamines: putrescine, spermine and spermidine. The callus initiated in the first stage of the research was multiplied on solidified growth media, with the addition of the above-mentioned auxins, BAP and polyamines. At the same time, the impact of mineral components content and light on the multiplication of the callus tissue on liquid growth media, in a bioreactor, was set forth.

The callus tissue was multiplied on liquid and solid growth media and fragments of leaves were used as explants in subsequent stages of the research – somatic embryos were induced and then regenerated in one stage on growth media supplemented by a differentiated content of carbohydrates, casein hydrolysate and activated charcoal. The impact of soaked in ABA on embryo conversion was also set forth. The impact of mineral composition of the culture medium, together with organic additives was also determined on the regeneration of somatic embryos. During all stages of research, a particular attention was paid to the impact of the light on the course of callogenesis and somatic embryogenesis.

The purpose of the research was also to determine the scope of variability of regenerants which came into being as a result of somatic embryogenesis, depending on the conditions of regeneration. The DNA was analysed isolated from the callus tissue, multiplied on culture media solidified by agar, for a period ranging from one month to one year, and on liquid culture medium from plants regenerated from embryos by direct or indirect embryogenesis, on the above-mentioned callus tissue. The level of changeability of 50 regenerants obtained in an SE indirect and direct way, pursuant to the record worked out in the paper, was also determined.

Based on the research conducted, it was found out that the picloram and dicamba may be used to induce callus cultures and somatic embryogenesis, however, their efficiency is not significant. An addition of spermidine to the medium has an advantageous impact on the course of callogenesis process and the formation of somatic embryos in additionally lit cultures. The application of this growth regulator at the stage of callus initiation has it that a large amount of callus tissue is created which has an embryogenous nature, and at the stage of somatic embryogenesis induction, it acts favourably on the number of embryos being formed.

The light conditions in which the culture was conducted had a crucial impact on the plants development in *in vitro* cultures. The additional lighting of cultures with red light causes an increase in the mass of the callus tissue and the frequency of the somatic embryos formed. The blue light causes the callus cultures to die and breaks down the formation of somatic embryos. The demand for the light changes, depending upon the stage of research. The callus tissue may be induced and multiplied in the darkness even for six months. It is not possible to form somatic embryos without the access to light, but the darkness has a favourable impact on their sprouting when they have come to an appropriate development stage.

The callus cultures conducted on a liquid MS medium with an addition of $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA and $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP in a bioreactor, allow to receive a large mass of callus tissue in a short period of time. However, the tissue which came into being in these conditions is not suitable for inducing somatic embryogenesis.

The suggested record of chrysanthemum multiplication by an indirect somatic embryogenesis covers the initiation of the callus tissue on the MS medium, with an addition $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA and BAP and $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ spermidine, its subsequent multiplication on a substrate with an addition of $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA, $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP, the initiation of somatic embryogenesis on the medium with an addition of $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA, $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP and $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ spermidine. The conversion of embryos received in this way should be conducted on a substrate which contains $\frac{1}{2}$ of the mineral composition of the medium, according to Murashige and Skoog (1962), with an addition of $45 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ saccharoze, in the dark.

A large number of somatic embryos may be received when leaf blades are put on the medium, with an addition of $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA, $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP and $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ of spermidine, and then, the embryos are regenerated on a substrate containing $\frac{1}{2}$ of the mineral composition of the medium, according to MS, with an addition of $45 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sucrose, in the dark. Based on the evaluation of the genetic uniformity of the regenerants by the ISSR-PCR method, we may claim that the suggested system of regeneration allows to obtain daughter plants with no risk of genetic instability of regenerants.

Somatische Embryogenese in den Kulturen der Chrysantheme (*Chrysanthemum x grandiflorum*) (Ramat.) Kitam)

Zusammenfassung

Die großblumige Chrysantheme (*Chrysanthemum x grandiflorum*) (Ramat. Kitam) ist eine der beliebtesten Zierpflanzen. Alle Chrysanthemensorten werden auf eine herkömmliche Art und Weise oder mit Hilfe von Mikrostecklingen in *In-vitro*-Kulturen vermehrt. Da der Bedarf an Setzlingen dieser Pflanze sehr groß ist, wird es stets nach Methoden der Vermehrung von Pflanzen dieser Pflanzenart gesucht, die eine große Anzahl von Setzlingen in einer verhältnismäßig kurzen Zeit gewinnen lassen. Ein solches Verfahren bildet die somatische Embryogenese, bei dem die Bildung von Embryonen aus somatischen Zellen in *In-vitro*-Kulturen erfolgt. Trotz potentieller Möglichkeiten ist es jedoch ein Prozess, der von vielen Umweltfaktoren abhängt und in großem Maße mit dem Genotyp der vermehrten Pflanzen korreliert. Da es an einer gut erarbeiteten Methode zur Gewinnung somatischer Embryonen für eine derart wirtschaftlich bedeutende Pflanze wie Chrysantheme fehlt, wird hier ein Versuch unternommen, die maximale Anzahl von Faktoren zu bestimmen, die den Verlauf des Prozesses beeinflussen.

Das Ziel der Arbeit stellt die Wahl des für die Bildung und Vermehrung von Kalluskulturen der großblumigen Chrysantheme optimalsten Nährmediums dar, mit einer besonderen Berücksichtigung der bisher selten verwendeten Auxine Picloram und Dicamba. Bei den Untersuchungen wird auch versucht, den Einfluss der Wachstumsregulatoren auf die Induktion der indirekten somatischen Embryogenese in Kalluskulturen und der direkten somatischen Embryogenese mit einer besonderen Berücksichtigung der Auswirkung von Polyaminen (Putrescin, Spermin, Spermidin) auf den Verlauf des Prozesses zu bestimmen. Das Kallusgewebe wurde auf Agar-Nährböden mit Zusatz der Auxine 2,4-D, NAA, IBA, IAA, PIK und DIC, des Zytokins BAP und der Polyamine Putrescin, Spermin und Spermidin induziert. Der induzierte Kallus wurde in der ersten Phase der Untersuchungen auf festen Nährböden mit Zusatz der erwähnten Auxine, des BAP und der Polyamine vermehrt. Gleichzeitig wurde der Einfluss der Mineralstoffe und des Lichts auf die Vermehrung des Kallusgewebes in flüssigen Nährmedien in einem Bioreaktor bestimmt.

Das in flüssigen und festen Nährmedien vermehrte Kallusgewebe sowie Blatteile wurden als Explantate in der nächsten Phase der Untersuchung verwendet; es wurden somatische Embryonen gebildet, die dann im Rahmen einer Etappe auf Nährmedien mit Zusatz von Kohlenhydraten, Caseinhydrolysat und Aktivkohle in verschiedenen Gehaltsverhältnissen regeneriert wurden. Es wurde auch der Einfluss des Weichens in ABA auf die Konversion von Embryonen untersucht. Bestimmt wurde auch die Auswirkung der Mineralstoffzusammensetzung des Nährbodens und der organischen Zusätze auf die Regeneration soma-

tischer Embryonen. Während aller Etappen der Untersuchung wurde insbesondere der Lichteinfluss auf den Verlauf der Kaulogenese und somatischen Embryogenese beobachtet.

Mit den Untersuchungen wurde auch die Bestimmung des Bereichs der Variabilität von Regeneranten in Abhängigkeit von Regenerationsbedingungen bezweckt. Es wurde die DNS analysiert, die aus einem einen Monat bis ein Jahr lang auf Agar-Nährböden sowie in flüssigen Nährmedien vermehrten Kallusgewebe aus Pflanzen isoliert wurde, die aus Embryonen im Rahmen einer direkten und indirekten Embryogenese auf dem oben erwähnten Kallusgewebe regeneriert wurden. Bestimmt wurde auch das Variabilitätsniveau von 50 Regeneranten, die im Rahmen der indirekten und direkten SE nach dem für die Zwecke der Arbeit erarbeiteten Protokoll gewonnen wurden.

Auf der Grundlage der durchgeführten Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Stoffe Picloram und Dicamba für die Induktion von Kalluskulturen und somatischer Embryogenese verwendet werden können, wobei jedoch ihre Wirksamkeit gering ist. Der Zusatz von Spermidin beeinflusst positiv den Verlauf der Kaulogenese und Bildung somatischer Embryonen in zusätzlich beleuchteten Kulturen. Die Anwendung eines Wachstumsregulators in der Phase der Kallusinduktion bewirkt die Bildung einer großen Menge Kallusgewebe mit embryogenem Charakter und in der Phase der Einleitung somatischer Embryogenese wirkt sie sich günstig auf die Anzahl der sich herausbildenden Embryonen aus.

Die Lichtbedingungen der Kulturzucht haben einen bedeutenden Einfluss auf die Entwicklung von Pflanzen in *In-vitro*-Kulturen. Die zusätzliche Rotlichtbeleuchtung der Kulturen trägt zur Steigerung des Gewichtes des Kallusgewebes und der Häufigkeit somatischer Embryonen bei. Das Blaulicht bewirkt das Absterben von Kalluskulturen und hemmt die Bildung somatischer Embryonen. Der Lichtbedarf war in den einzelnen Etappen der durchgeführten Untersuchungen unterschiedlich. Das Kallusgewebe kann sogar sechs Monate lang in Dunkelheit induziert und vermehrt werden. Zwar ist die Bildung somatischer Embryonen ohne Licht nicht möglich, die Dunkelheit wirkt sich aber positiv auf ihre Keimung, nachdem sie das richtige Entwicklungsstadium erreicht haben.

Die Kalluskulturen, die in einem flüssigen Nährmedium mit dem Spuren- und Makroelementgehalt nach Murashige und Skoog (1962) mit Zusatz von $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA und $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP in einem Bioreaktor gezüchtet werden, lassen eine große Menge des Kallusgewebe innerhalb einer kurzen Zeit gewinnen. Das unter solchen Bedingungen entstandene Gewebe eignet sich jedoch nicht für die Induktion der somatischen Embryogenese.

Das vorgeschlagene Protokoll zur Vermehrung der Chrysantheme umfasst die Induktion des Kallusgewebes auf dem MS-Nährmedium mit Zusatz von $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA und BAP und $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ Spermidin, seine spätere Vermehrung auf einem Nährmedium mit Zusatz von $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA, $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP, die Induktion der somatischen Embryogenese auf einem Nährmedium mit Zusatz von $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA, $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP und $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ Spermidin. Die Konversion der auf diesem Wege gewonnenen Embryonen soll auf einem Nährmedium, dessen Zusammensetzung der 1/2 der Mineralstoffzusammensetzung des Nährmediums

nach Murashige und Skoog (1962) entspricht, mit Zusatz von $45 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ Saccharose in Dunkelheit durchgeführt werden.

Eine große Anzahl somatischer Embryonen kann man gewinnen, indem man Teile von Blattspreiten in ein Nährmedium mit Zusatz von $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA, $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP und $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ Spermidin gibt und dann die Embryonen auf einem Nährmedium, dessen Zusammensetzung der 1/2 der Mineralstoffzusammensetzung des MS-Nährmediums entspricht, mit Zusatz von $45 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ Saccharose in Dunkelheit regeneriert. Auf der Grundlage der Beurteilung der genetischen Homogenität von Regeneraten mit der ISSR-PCR-Methode konnte festgestellt werden, dass das vorgeschlagene Regenerationsystem Nachkommenpflanzen ohne Risiko der genetischen Instabilität der Regenerate gewinnen lässt.



Biblioteka Główna
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu
Technologicznego w Szczecinie

CZ.55581



001-055581-00-0

CZ 19.10

ISBN 978-83-7663-138-7