

Wegetatywne rozmnażanie świerka serbskiego i pospolitego w Polsce metodą kultur *in vitro* z wykorzystaniem potencjału somatycznej embriogenezy

Vegetative propagation of Serbian and Norway spruce in Poland by *in vitro* culture using the potential of somatic embryogenesis

TERESA HAZUBSKA-PRZYBYŁ

Instytut Dendrologii Polskiej Akademii Nauk, ul. Parkowa 5, PL-62-035 Kórnik
e-mail: hazubska@man.poznan.pl

Submitted: 17 July 2023; Accepted: 4 November 2023

STRESZCZENIE: Postępujące zmiany klimatyczne zmniejszają efektywność rozmnażania generatywnego świerków. W celu utrzymania istniejących populacji bądź dostarczenia sadzonek do upraw plantacyjnych niezbędne będzie zastosowanie wegetatywnych metod mnożenia drzew. Najbardziej perspektywiczną z nich jest metoda kultur *in vitro*, zwłaszcza technika embriogenezy somatycznej. Jednak z uwagi na złożoność procesu rozwoju zarodka istnieje konieczność opracowywania coraz efektywniejszych protokołów mnożenia. Kultury tkankowe świerka serbskiego (*Picea omorika*) i pospolitego (*P. abies*) indukowano z dojrzałych zarodków w obecności auksyn i cytokininy. Uzyskane wyselekcjonowane tkanki embriogenne poddano zabiegowi kriokonserwacji z wykorzystaniem stopniowej dehydratacji pod wpływem sacharozy (0,25–1,0 μM ; 7 dni) i działaniu sterylnym powietrzem (25°C; 2 h). Aby zwiększyć wydajność kiełkowania, zarodki liścieniowe poduszano w warunkach relatywnie wysokiej wilgotności względnej powietrza (97%) lub suszono w obecności nasyconego roztworu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (79%). Wykazano, że częstotliwość indukcji tkanek była determinowana przez stężenie sacharozy lub auksyny w pożywce. Rodzaj auksyny warunkował parametry wzrostowe zarodków. Po przechowaniu tkanek w ciekłym azocie obserwowano niemal 100% przeżywalność tkanki embriogennej *P. omorika*, podczas gdy u *P. abies* wynosiła ona 54,4%. Uzyskano 45% poziom konwersji dojrzałych zarodków *P. abies* w siewki po dwóch tygodniach utrzymywania zarodków w powietrzu o wilgotności 97%. W prowadzonych badaniach otrzymano zdolne do aklimatyzacji sadzonki somatyczne obu gatunków drzew.

Słowa kluczowe: *Picea*, prazarodki, tkanka embriogenna, krioprzechowywanie, podsuszanie, siewki somatyczne

ABSTRACT: Progressive climate change is reducing the efficiency of spruce generative reproduction. In order to maintain existing populations, or to provide seedlings for plantation crops, vegetative methods of tree multiplication will be necessary. The most promising of these is the *in vitro* culture method, especially the somatic embryogenesis technique. However, due to the complexity of the embryo development process, there is a need to develop increasingly efficient multiplication protocols. Tissue cultures of Serbian spruce (*Picea omorika*) and Norway spruce (*P. abies*) were induced from mature embryos, in the presence of auxins and cytokinin. The resulting selected embryogenic tissues were subjected to cryopreservation, based on gradual dehydration under sucrose (0.25–1.0 μM ; 7 days) and exposure to sterile air (25°C; 2 h). To increase germination efficiency, cotyledon embryos were either desiccated at relatively high relative humidity (97%) or dried in the presence of saturated solution of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (79%). It was shown that the frequency of tissue induction was determined by the concentration of sucrose or auxin in the medium. The type of auxin determined the growth parameters of the embryos. After tissue storage in liquid nitrogen, almost 100% survival of *P. omorika* embryogenic tissue and 54.4% survival of *P. abies* was observed. A 45% conversion rate of mature *P. abies* embryos to seedlings was obtained after two weeks of treating embryos with 97% humidity. Somatic seedlings of both tree species, capable of acclimatization, were obtained in the present study.

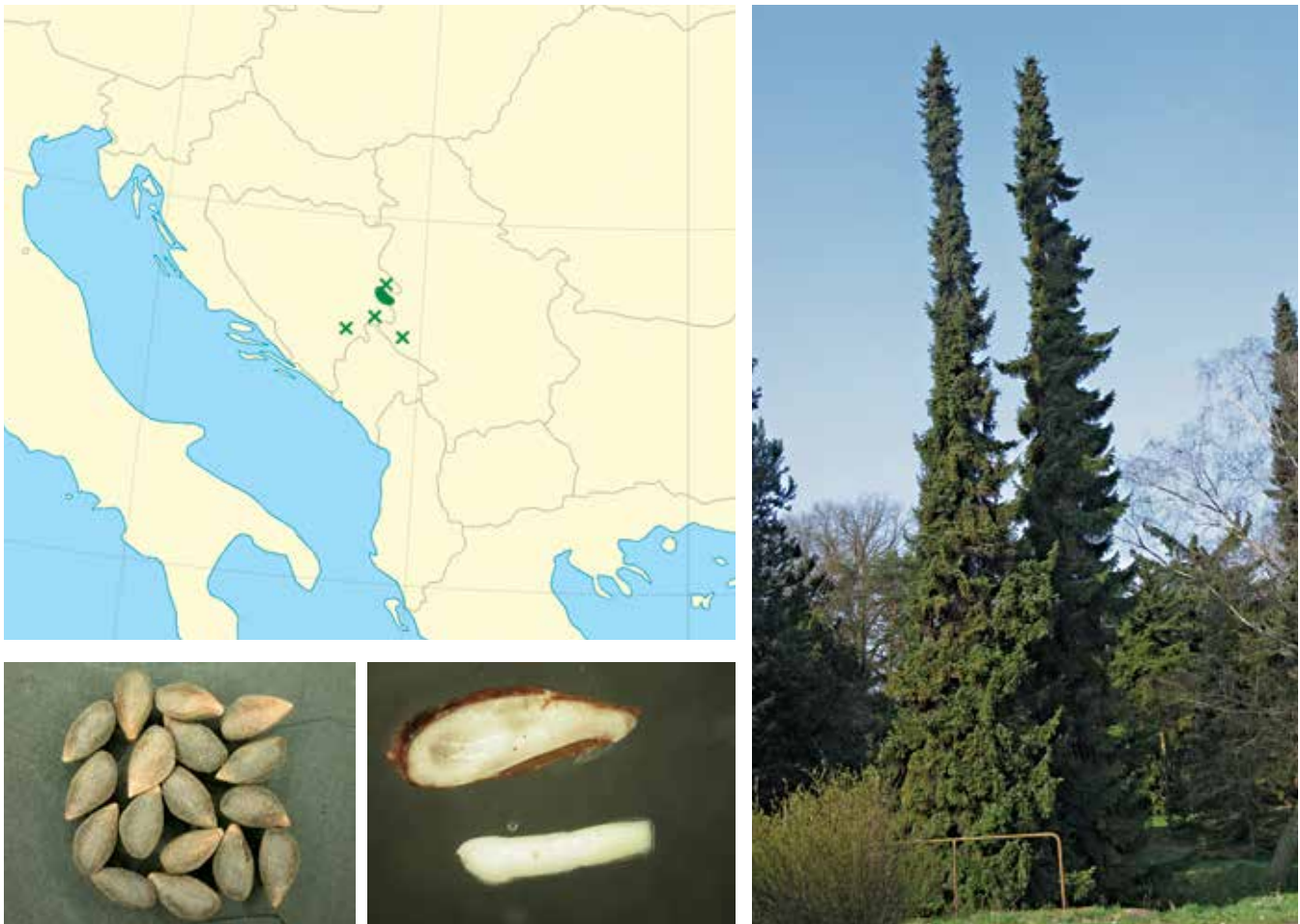
Key words: *Picea*, proembryos, embryogenic tissue, cryopreservation, desiccation, somatic seedlings

Wstęp

Świerk serbski (*Picea omorika* (Pančić) Purk.) i pospolity (*P. abies* (L.) H.Karst.) należą do rodzaju *Picea*, który liczy kilkadziesiąt gatunków występujących wyłącznie na półkuli północnej (Bugala, 2000; Ivetić i Aleksić, 2019). Oba taksony mają swój udział w tworzeniu lasów, choć w odmiennym zakresie. Pierwszy z nich to gatunek reliktowy, szczególnie wrażliwy na zmiany klimatyczne, choć jednocześnie najbardziej odporny na zanieczyszczenia przemysłowe spośród wszystkich gatunków świerka. Jego występowanie jest ograniczone do regionu zajmującego zaledwie mniej więcej 100 km², leżącego wokół środkowego biegu rzeki Driny w środkowym, górzystym regionie Bałkanów, na granicy Serbii oraz Bośni i Hercegowiny (ryc. 1). Na tym obszarze stwierdzono występowanie ok. 30 populacji różnej wielkości, dlatego uznaje się ten gatunek świerka za bardzo rzadki i jednocześnie poważnie zagrożony (Ballian i in., 2006; Ivetić i Aleksić, 2019). Ostatnie badania wykazały negatywny wpływ długotrwałej suszy na wzrost tych drzew w ciągu ostatnich 30–40 lat (Dell’Oro i in., 2020). Ze względu na obecny stan populacji świerka serbskiego, ekstremal-

ne zjawiska klimatyczne oraz słabą naturalną regenerację tego gatunku koniecznością staje się podjęcie działań ochronnych *in situ* i *ex situ*, przy czym nieodzowne są wszelkie akcje *ex situ* (np. wspomaganie migracji gatunku), ponieważ działania *in situ* mogą mieć efekt krótkotrwały i istnieje wysokie prawdopodobieństwo, że świerk serbski zniknie ze swoich naturalnych siedlisk w najbliższej przyszłości z powodu gwałtownych zmian klimatycznych (Ivetić i Aleksić, 2019).

Drugi gatunek, świerk pospolity, cechuje się szerokim, naturalnym zasięgiem geograficznym, który obejmuje strefę lasów borealnych od Skandynawii po Ural oraz obszary górskie klimatu umiarkowanego (ryc. 2; Montwé i in., 2014). Świerk pospolity jest także uprawiany poza swoim naturalnym zasięgiem występowania w cieplejszych i suchszych regionach Europy w celach gospodarczych (Koski i in., 1997). Drzewo to jest podstawowym gatunkiem w gospodarce leśnej w wielu krajach europejskich m.in. Szwecji, Finlandii czy Polsce. Jego wartościowe drewno jest wykorzystywane głównie do produkcji celulozy oraz w przemyśle budowlanym. W ciągu ostatnich kilkadziesiąt lat zmiany klimatu znacząco wpłynęły na stan europejskich lasów



Ryc. 1. Zasięg występowania i pokrój świerka serbskiego (*P. omorika*), z którego zbierano nasiona, a z nich pobierano zarodki (eksplantaty) do zapoczątkowania procesu embriogenezy somatycznej (mapa za: Giovanni Caudullo na: commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=48440897, na licencji: CC BY 4.0)

Fig. 1. Range and tree habit of Serbian spruce (*P. omorika*), from which seeds were collected and from which embryos (explants) were taken to initiate somatic embryogenesis (map after: Giovanni Caudullo at: commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=48440897, released under CC BY 4.0 license)



Ryc. 2. Zasięg występowania i pokrój młodego świerka pospolitego (*P. abies*), z którego zbierano nasiona, a z nich pobierano zarodki (eksplantaty) do zapoczątkowania procesu embriogenezy somatycznej (mapa za: Darekk2 i the IUCN Red List spatial data na: commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=66679548, na licencji: CC BY 4.0)

Fig. 2. Range and habit of a young Norway spruce (*P. abies*) tree, from which seeds were collected and from which embryos (explants) were taken to initiate somatic embryogenesis (mapa za: Darekk2 & the IUCN Red List spatial data at: commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=66679548, released under CC BY 4.0 license)

borealnych i leśnictwa (Subramanian i in., 2016; Sierota i in., 2019). Obecnie świerk pospolity należy do gatunków drzew leśnych najbardziej zagrożonych skutkami zmian klimatu. Przewiduje się, że w ciągu najbliższych kilkudziesięciu lat jego występowanie w Europie znacząco się zmniejszy (Dyderski i in., 2018).

Zachodzące obecnie zmiany klimatyczne oraz niekorzystne warunki środowiskowe przyczynią się już w najbliższej przyszłości do obniżenia zdolności reprodukcyjnych obu gatunków świerka oraz do znacznego spadku ilości dostępnych, żywotnych nasion. W związku z pojawiającymi się zagrożeniami dla populacji świerka serbskiego i pospolitego nieuchronne będzie podjęcie odpowiednich działań, które pozwoliłyby na zminimalizowanie negatywnych skutków tychże zmian. Jednym z rozwiązań tego problemu może być rozwinięcie alternatywnych metod rozmnażania drzew, opartych na rozwiązaniach biotechnologicznych, takich jak rozmnażanie na drodze wegetatywnej w kulturach *in vitro* (mikrorozmnażanie). U gatunków drzew iglastych

bardzo dobrą perspektywę daje potencjalnie najbardziej wydajny sposób mikrorozmnażania, a mianowicie technika somatycznej embriogenezy.

Konwencjonalne metody rozmnażania wegetatywnego drzew leśnych

Rozmnażanie wegetatywne to inaczej uzyskiwanie nowych osobników poprzez regenerację z fragmentu organizmu macierzystego. Przykładem jest rozmnażanie przez zrzezy u świerka sitkajskiego (Szczygieł i Hazubska-Przybył, 2010), odkłady (Boratyński i Bugała, 1998) czy przez szczepienie różnych gatunków z rodzaju *Pinus* (Pérez-Luna i in., 2020). Metody te są już szeroko wykorzystywane w szkółkarstwie leśnym, choćby w Kanadzie czy Nowej Zelandii, a rzadziej w krajach europejskich np. Norwegii, Wielkiej Brytanii, Francji i Niemczech (Lelu-Walter i in., 2013; Denchev i Grossnickle, 2019; Egertsdotter i in., 2019). Rozmnażanie wegetatywne stosowane jest w leśnictwie z uwagi na

późne osiągnięcie przez drzewa zdolności do wytwarzania nasion, nieregularne występowanie kwitnienia i obradzania nasion, pogorszenie stanu zdrowotnego lub zamieranie cennych populacji. Przede wszystkim jednak metody te stosuje się w celu rozmnożenia nowych form roślin, które zostały otrzymane na drodze krzyżowania, a także dla uzyskania vegetatywnego potomstwa drzew doborowych i elitarnych do zakładania plantacji nasiennych. W leśnictwie dodatkową zaletą tego sposobu rozmnażania jest możliwość szybkiego wprowadzenia do praktyki wyników selekcji drzew (Szczygieł, 2005).

Tradycyjne metody rozmnażania vegetatywnego drzew (ukorzenianie zrzezów pędowych lub korzeniowych, szczepienie, odrosty, odkłady) mają jednak pewne ograniczenia. Wymagają one m.in. konieczności stosowania mateczników, które w celu zachowania zdolności do regeneracji przez rośliny mateczne muszą być odpowiednio pielęgnowane. Efektywność tych metod jest wysoka tylko w przypadku pozyskiwania materiału z młodych roślin matecznych. U drzew gatunków iglastych występuje u otrzymanych sadzonek vegetatywnych wzrost plagiotropowy (niekorzystny wzrost pędu równoległe lub ukośnie względem podłoża), a przy szczepieniu dochodzi na ogół do wyrastania z podkładek pędów, które konkurują ze zrazami. Dodatkowo, w przypadku metod tradycyjnych wydajność rozmnażania z jednego osobnika matecznego jest bardzo ograniczona (Szczygieł, 2005; Rosvall, 2019). Ograniczeniem są również wysokie koszty produkcji sadzonek. Dla przykładu: w Finlandii i Szwecji świerk pospolity rozmnażany jest rutynowo poprzez cięcie korzeni, jednakże z powodu wysokich kosztów produkcji metoda ta nie została dotychczas wprowadzona do masowej produkcji roślin (Högberg i Varis, 2016).

Mnożenie drzew *in vitro* z wykorzystaniem techniki somatycznej embriogenezy

Potencjalnie znacznie wyższą wydajnością rozmnażania drzew leśnych charakteryzują się metody oparte na mikro-rozmnażaniu, a wśród nich na szczególną uwagę zasługuje technika somatycznej embriogenezy. Jej istotą jest uzyskiwanie roślin z zarodków powstałych z komórek vegetatywnych (somatycznych), a więc z pominięciem procesu zapłodnienia i zygoty. Podstawową zaletą metody somatycznej embriogenezy jest jej nieograniczony potencjał regeneracji roślin, także tych ulepszonych genetycznie oraz możliwość selekcji i masowego rozmnażania elitarnych genotypów. Podczas selekcji siewek somatycznych uwzględniane są parametry stosowane w tradycyjnej hodowli i selekcji drzew: forma, wzrost, a także odporność na szkodniki i choroby oraz czynniki abiotyczne (Nawrot-Chorabik i in., 2021, 2022). Metoda ta pozwala ponadto na dostarczenie do szkółek materiału sadzeniowego w stosunkowo krótkim czasie od momentu zaindukowania kultur, mniej więcej od 12 do 18 miesięcy w zależności od gatunku drzewa (Cyr i in., 2001). Ponadto rezultatem rozmnażania roślin tą techniką jest podniesienie poziomu różnorodności materiału roślinnego w porównaniu z tradycyjnym ukorzenianiem sadzonek. Somatyczna embriogeneza

daje możliwość wygenerowania niemal nieograniczonej liczby ramet (tzn. pojedynczych ukorzenionych pędów będących fragmentami wieloczęściowego organizmu roślinnego, rozprzestrzeniającego się vegetatywnie) lub klonów z danej linii embriogennej i uzyskania kilku ramet z dużej liczby linii tego typu (Rosvall, 2019).

Inną strategią jest wykorzystanie somatycznej embriogenezy do produkcji roślin donorowych wybranych klonów bądź też potomstwa dla wspomaganego rozmnażania poprzez cięcie materiału szkółkarskiego (Bonga, 2015). Zysk genetyczny, jaki uzyskuje się w krótkim czasie, stosując metodę somatycznej embriogenezy, jest znacznie wyższy w porównaniu z tradycyjnymi metodami. W przyszłości ważnym zastosowaniem somatycznej embriogenezy byłoby rozmnażanie drzew z tkanek somatycznych pochodzących ze starszych testowanych drzew, ponieważ pozwalają one na lepsze prognozowanie wydajności produkcji w okresie rotacji aniżeli drzewa młode (Rosvall, 2019).

Produkcja somatycznych roślin na potrzeby biznesu, leśnictwa i celem zachowania zasobów genowych

Przed zastosowaniem techniki somatycznej embriogenezy na skalę gospodarczą poszczególne etapy mnożenia materiału są poddawane szczegółowej analizie (Grossnickle i Major, 1994; Egertsdotter i in., 2019), tak aby opracować metodykę zapewniającą jak najwyższą produktywność procesu. Głównym celem jest uzyskanie licznych zarodków w dojrzałym (liścieniowym) stadium, które byłyby identyczne pod względem morfologicznym i fizjologicznym z zarodkami pochodzącymi z nasion. Ostatecznie funkcjonalne somatyczne siewki powinny spełniać takie same kryteria jak materiał sadzeniowy otrzymany w tradycyjny sposób. Dodatkową zaletą jest możliwość rozmnażania tą metodą genotypów nie tylko o unikatowym charakterze, ale i zagrożonych wyginieciem.

Obecnie materiał sadzeniowy kilku gatunków drzew leśnych, produkowany metodą somatycznej embriogenezy, stosowany jest do zakładania upraw leśnych w Kanadzie, Stanach Zjednoczonych czy Nowej Zelandii (Denchev i Grossnickle, 2019; Egertsdotter i in., 2019) w ramach tzw. leśnictwa klonalnego (ang. clonal forestry). Jak dotąd jednak rozmnażanie tą metodą prowadzone jest głównie przez sektor prywatny i przedsiębiorstwa leśne (Lelu-Walter i in., 2013).

W literaturze światowej niewiele uwagi poświęcono badaniom nad somatyczną embriogenezą świerka serbskiego. Kilka doniesień w tym zakresie ukazało się w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku i na początku obecnego stulecia (Budimir i Vujičić, 1992; Kolevska-Pletikapi i in., 1995; Salopek i in., 1997; Tramišak-Milaković i in., 1999; Leljak-Levanić i in., 2009). W związku z narastającym problemem zagrożenia naturalnych stanowisk występowania *P. omorika* i koniecznością podjęcia działań *ex situ* w celu jego ochrony niezbędne są dalsze badania nad możliwością zachowania jego zasobów genowych m.in. z wykorzystaniem narzędzi biotechnologicznych. Taką rolę może spełniać technika somatycznej embriogenezy

nezy w powiązaniu z kriokonserwacją (przechowywanie w ultraniskiej temperaturze ciekłego azotu, tzn. -196°C) otrzymanych tą drogą tkanek embriogennych.

Z kolei badania nad somatyczną embriogenezą świerka pospolitego są intensywnie prowadzone od momentu uzyskania jego pierwszych somatycznych siewek w 1985 r. (Chalupa, 1985; Hakman i in., 1985). Pomimo to wiele problemów związanych z wydajnością procesu somatycznej embriogenezy u tego gatunku nadal nie zostało rozwiązanych, jak na przykład indukcja embriogenezy z eksplantatów wegetatywnych czy utrata zdolności do regeneracji zarodków z otrzymanych tkanek embriogennych (Hudec i in., 2016; Salonen i in., 2017; Dahrendorf i in., 2018). W konsekwencji uniemożliwia to masową produkcję sadzonek somatycznych, zarówno w celach komercyjnych, jak i dla gospodarki leśnej. W związku z powyższym studia nad mikrorozmnażaniem *P. abies* tym sposobem wciąż wymagają pogłębienia (Hudec i in., 2016; Carlsson i in., 2019; Varis i in., 2021), aby dokładniej poznać mechanizmy biochemiczne i molekularne kontrolujące rozwój somatycznego zarodka. Dlatego obecnie dla wielu badaczy świerk pospolity nadal stanowi doskonały gatunek modelowy w badaniach nad różnymi aspektami somatycznej embriogenezy gatunków drzew iglastych.

Możliwości i wyzwania związane z techniką somatycznej embriogenezy świerków

Somatyczna embriogeneza to bardzo złożony, wieloetapowy proces rozwoju zarodka somatycznego, determinowany zarówno kompetencją eksplantatu, z którego indukowana jest kultura embriogenna, jak i szeregiem warunków fizyko-chemicznych. Z tego powodu wymaga ona dokładnego opracowania odrębnych procedur dla każdego etapu rozwoju zarodka, poczynając od indukcji tkanki embriogennej, poprzez jej namnażanie, dojrzewanie zarodków, aż po ich ostateczny rozwój w somatyczne siewki. Każdy gatunek, a nawet genotyp, wymaga osobnego potraktowania, ponieważ wypracowane metody nie są uniwersalne, co w rezultacie powoduje, że studia nad somatyczną embriogenezą drzew nie są szeroko rozpowszechnione.

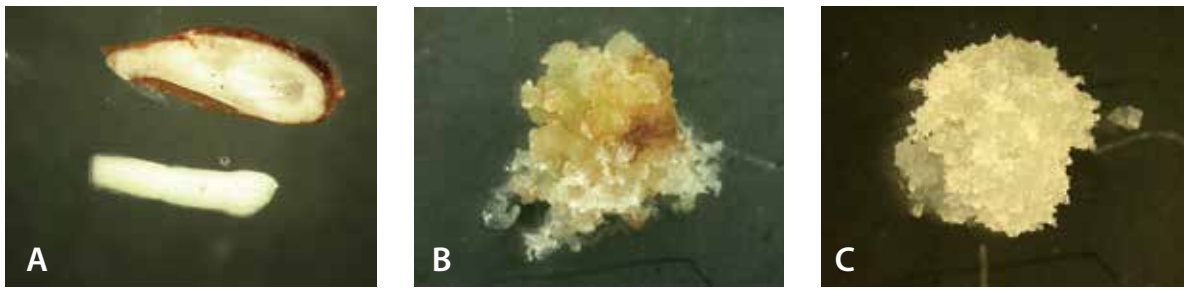
W wielu laboratoriach światowych badania nad możliwością mikrorozmnażania drzew, szczególnie nad techniką embriogenezy somatycznej, zostały zapoczątkowane w latach 1985–1990, natomiast w Polsce w połowie lat 90. XX w. w Instytucie Badawczym Leśnictwa w Sękocinie Starym przez panią mgr Krystynę Szczygieł. Od początku obecnego wieku tematyka badawcza w tym zakresie jest kontynuowana i rozwijana w Instytucie Dendrologii Polskiej Akademii Nauk w Kórniku (Hazubska i Szczygieł, 2003; Szczygieł i in., 2007; Hazubska-Przybył i Bojarczuk, 2016; Hazubska-Przybył i in., 2020; Varis i in., 2021; Mikuła i in., 2022). W IBL opracowano przede wszystkim protokoły mikrorozmnażania gatunków drzew leśnych, takich jak: świerk pospolity, jodła pospolita i modrzew europejski (praca doktorska Krystyny Szczygieł (2003)). Natomiast w ID PAN badania skupiały się przede wszystkim na opty-

malizacji protokołów mikrorozmnażania i krioprzechowywania uzyskanych tkanek embriogennych świerka serbskiego i pospolitego. Badania nad somatyczną embriogenezą podejmowano również w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (Latkowska, 2002) oraz na Uniwersytecie Przyrodniczym w Krakowie (Nawrot-Chorabik, 2016). Podobnie jak w innych laboratoriach badawczych *P. abies* posłużył jako gatunek modelowy.

Wdrożenie techniki mikrorozmnażania drzew do danego laboratorium jest procesem żmudnym i czasochłonnym, wymaga bowiem zarówno wypracowania odpowiednich tzw. protokołów (tzn. dokładnie opisanych procedur postępowania), które umożliwiłyby prowadzenie kultur tkankowych i byłyby dostosowane do określonego gatunku drzewa, jak i zagwarantowania dostępu do specjalistycznej infrastruktury hodowlanej. Sukces jest uwarunkowany dostępnością zarówno aseptycznych pokoi laboratoryjnych oraz hodowlanych, gdzie można wyprodukować nieograniczoną liczbę somatycznych sadzonek, jak i szklarni, w których możliwa jest ścisła kontrola warunków niezbędnych do prawidłowego wzrostu oraz aklimatyzacji roślin somatycznych do, jakże odmiennego, środowiska naturalnego. Etap ten jest punktem newralgicznym w rozmnażaniu metodą *in vitro*, ponieważ decyduje o możliwości szerszego zastosowania techniki embriogenezy somatycznej u drzew leśnych na dużą skalę.

U świerków kultury embriogenne najczęściej indukuje się z zarodków niedojrzałych lub dojrzałych (ryc. 3A), pobieranych ze świeżych albo przechowywanych nasion. Niedojrzałe zarodki, jako fizjologicznie młodsze, są bardziej podatne na zapoczątkowanie procesu embriogenezy w kulturze *in vitro*. Z kolei wzbudzenie embriogenezy starszych eksplantatów (np. pąków szczytowych lub bocznych) pobieranych z w pełni wykształconych drzew jest nadal problematyczne. Jak dotąd najstarszym rodzajem eksplantatu wegetatywnego, z którego zaindukowano tkankę embriogenną (ryc. 3B), były pąki pierwotne pochodzące z 10-letnich drzewek *P. glauca* (Klimaszewska i in., 2011). W przypadku świerka pospolitego i serbskiego tkankę embriogenną można też zaindukować z tzw. wtórnych eksplantatów, czyli z somatycznych zarodków wyhodowanych z tkanek embriogennych kolejnych generacji (Hazubska-Przybył i Bojarczuk, 2008). Co ciekawe, tego rodzaju eksplantaty zachowują swoistą „pamięć”, która pozwala na poprawę efektywności produkcji zarodków somatycznych z nowo zaindukowanej tkanki embriogennej w kolejnym etapie procesu. Wykazano również, że podobną „pamięć embriogenną” zachowują eksplantaty wegetatywne pobierane z drzewek wyhodowanych z zarodków somatycznych. W takim przypadku częstotliwość indukcji tkanki była znacząco wyższa aniżeli z eksplantatów pobieranych z drzewek uzyskanych na drodze generatywnej (80% vs 10%; Ruaud i in., 1992).

O wydajności pierwszego etapu somatycznej embriogenezy decyduje nie tylko rodzaj oraz wiek eksplantatu, jego pochodzenie, ale i skład chemiczny pożywki (makro- i mikroelementy, witaminy, aminokwasy, cukry stanowiące źródło energii i roślinne regulatory wzrostu) oraz warunki hodowlane (temperatura, ciemność, rodzaj naczyń laboratoryjnych etc.). I tak na przykład wykazaliśmy, że częstotliwość indukcji tkanek określonych genotypów u obu gatunków



Ryc. 3. Dojrzałe zarodki *P. omorika* jako eksplantaty (A) podatne na indukcję tkanki embriogennej (B), specyficznej, kłaczkowatej tkanki roślinnej (C) zawierającej wczesne stadia somatycznych zarodków, zdolnej do namnażania w nieograniczonych ilościach

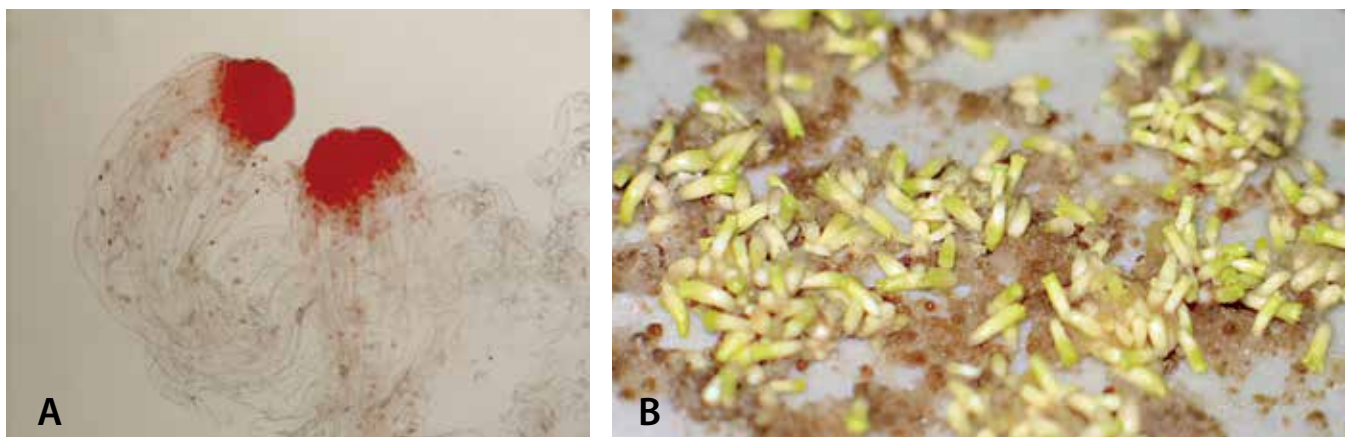
Fig. 3. Mature *P. omorika* embryos as explants (A) susceptible to induction of embryogenic tissue (B), a specific flocculent plant tissue (C) containing early somatic embryo stages capable of multiplying in unlimited quantities

świerka była determinowana przez stężenie sacharozy lub auksyny w pożywkach (Hazubska-Przybył i in., 2016). W przypadku gatunków drzew iglastych, w tym świerków, decydującą rolę w indukcji embriogenezy, ale także na kolejnych etapach rozwoju somatycznego zarodka, odgrywa genotyp eksplantatu, z którego otrzymano kulturę embriogenną (Szczygieł i in., 2007; Hazubska-Przybył i in., 2020). Im więcej tkanek embriogennych określonych genotypów będzie wykazywało zdolność do namnażania i produkcji somatycznych zarodków, tym szanse wdrożenia techniki somatycznej embriogenezy do praktyki hodowlanej będą wyższe. Jednakże u większości gatunków drzew iglastych naukowcy borykają się z problemem utraty zdolności namnażania tkanek roślin określonych genotypów oraz ich potencjału do wytwarzania somatycznych zarodków. Jest to równoznaczne ze znacznym zmniejszeniem różnorodności mnożonego materiału, co ogranicza praktyczne stosowanie tej techniki mikrorozmnażania.

Tkanki embriogenne namnażane są na ogół na tych samych pożywkach (ewentualnie o nieco obniżonej dawce cytokininy) i w takich samych warunkach (ciemność) jak podczas ich indukcji z eksplantatów (ryc. 3C). Większość gatunków drzew iglastych do zapoczątkowania procesu

embriogenezy wymaga obecności auksyny i cytokininy w pożywce. Z auksyn zazwyczaj stosuje się kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D), czasami również kwas 1-naftylooctowy (NAA) lub 4-amino-3,5,6-trichloropikolinowy (Pikloram) w zakresie stężeń 9,0–10,0 μM , a z cytokinin benzyloadeninę (BA) w stężeniach 4,5–5,0 μM . Kultury embriogenne świerków są indukowane i namnażane na stałych lub półpłynnych pożywkach. Wykazano ponadto, że tkanki *P. abies* mają również zdolność do namnażania w kulturach płynnych (Filonova i in., 2000a; Välimäki i in., 2021). W dalszej perspektywie daje to możliwość częściowej automatyzacji procesu, ograniczenia kosztów robocizny i w efekcie obniżenie kosztów produkcji roślin somatycznych świerka, co w niedalekiej przyszłości będzie miało kluczowe znaczenie dla wdrożenia techniki somatycznej embriogenezy do zastosowań praktycznych na szerszą skalę.

Tkanki embriogenne namnażane *in vitro* zawierają specyficzne struktury o charakterystycznej budowie morfologicznej zbliżonej do pierwszych etapów rozwoju zarodka w nasieniu. Struktury te to tzw. prazarodki (ang. proembryos), składające się ze skupiska intensywnie dzielących się komórek merystematycznych tworzących tzw. region



Ryc. 4. Wczesne stadium rozwojowe zarodka *P. omorika* (A); wybarwiony na czerwono region embriogennej z komórkami merystematycznymi, z którego rozwija się dojrzały zarodek somatyczny oraz wydłużone bezbarwne komórki wieszadelka. Dojrzałe (liścieniowe) zarodki *P. abies* (B) przed wyłożeniem na pożywkę do kiełkowania

Fig. 4. Early developmental stage of a *P. omorika* embryo (A); red stained embryogenic region with meristematic cells, from which the mature somatic embryo develops, and elongated, colorless hanger cells. Mature (cotyledonous) embryos of *P. abies* (B) before transfer to the germination medium

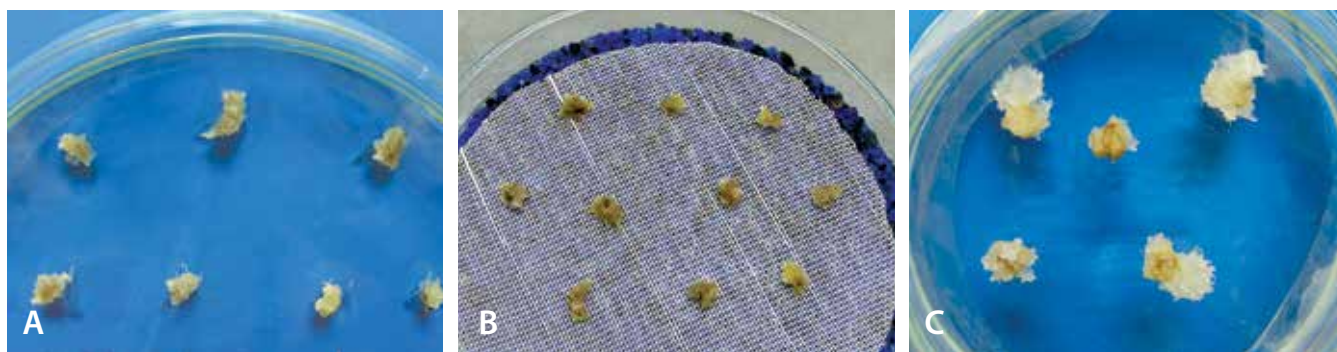
embriogeny, które z czasem przekształcają się w zarodek somatyczny, oraz z wydłużonych, silnie zwakuolizowanych komórek tworzących wieszadełko (ryc. 4A).

W obrębie tychże tkanek Filonova wraz z zespołem (2000b) zidentyfikowała prazarodki w różnych stadiach rozwojowych i wyróżniła trzy rodzaje tzw. struktur proembriogennych (ang. proembryogenic structures – PEMs). Są to struktury typu PEM I oraz PEM II i najbardziej zaawansowane pod względem budowy anatomicznej struktury typu PEM III, które w odpowiednich warunkach są w stanie przejść do etapu dojrzewania (ryc. 4B). Tkanka zawierająca prazarodki może być namnażana w kulturze *in vitro* długotrwale w obecności auksyny oraz cytokiny. Nasze ostatnie badania wykazały, że u obu gatunków świerka średnia liczebność prazarodków w tkankach embriogennych zależała istotnie od rodzaju zastosowanej auksyny (Hazubska-Przybył i in., 2020). Po zastosowaniu w pożywce kombinacji regulatorów wzrostu NAA/BA uzyskaliśmy istotnie wyższą liczbę prazarodków w porównaniu z wariantami Pikloram/BA i 2,4-D/BA. Rodzaj zastosowanej auksyny wpływał także znacząco na średnią wielkość regionu embriogennego prazarodka w jego poszczególnych stadiach rozwojowych (PEM I, PEM II i PEM III). Tkanki embriogenne, ze względu na obecność wczesnych stadiów rozwojowych zarodka, są doskonałym materiałem do przechowywania w ciekłym azocie. Tkanki utrzymywane zarówno *in vitro*, jak i w warunkach ultraniskiej temperatury, są potencjalnie bardzo wydajnym materiałem wyjściowym do wyprodukowania nieograniczonej liczby dojrzałych zarodków obu testowanych gatunków świerka.

Powiązanie techniki somatycznej embriogenezy z możliwością krioprezachowywania tkanek embriogennych to ważne rozwiązanie w przypadku gatunków drzew iglastych. Pozwala ono na zredukowanie prac manualnych związanych z utrzymywaniem kultur, na ograniczenie do minimum ryzyka kontaminacji i zmian somaklonalnych w namnażanych tkankach oraz na znaczną redukcję powierzchni, na której przechowuje się tysiące genotypów linii embriogennych określonego gatunku drzewa. Krio-

konserwacja jest pomocnym narzędziem w standardowych programach hodowlanych, kiedy potrzeba bardzo długiego czasu, aby dokonać identyfikacji genotypu w testach polowych. Jednocześnie drzewa osiągają w tym czasie wiek, który uniemożliwia ich rozmnażanie przy zastosowaniu metod wegetatywnych. W rezultacie dochodzi do utraty cennych genotypów, które mogą stanowić drzewa rodzicielskie dopiero w kolejnej generacji. Krioprezachowywane tkanki, po ich rozmrożeniu i namnożeniu w kulturze *in vitro*, mogą być wykorzystywane dla potrzeb różnego rodzaju programów genetycznych. Dzięki kriokonserwacji tkanki embriogenne mogą być też wykorzystane do ochrony zasobów genowych, ponieważ nie tracą one juwenilności i zachowują stabilność materiału genetycznego (Szczygieł, 2006), dlatego są one często stosowane do zachowania roślinnych zasobów genowych w bankach klonów linii elitarnych, cennych pod względem ekonomicznym (Cyr, 1999).

Tkanki embriogenne gatunków drzew iglastych to bardzo dogodny materiał do przechowywania w ciekłym azocie. Jednym z naszych celów było zatem opracowanie innowacyjnej metody kriokonserwacji tkanek *P. abies* i *P. omorika* z wykorzystaniem stopniowej dehydratacji przed ich zamrożeniem w ciekłym azocie. Metoda stopniowej dehydratacji (ang. pre-growth dehydration method) tkanek embriogennych opiera się na zjawisku witrifikacji, czyli szybkim schłodzeniu, co w efekcie powoduje przejście wody w stały stan skupienia bez powstawania kryształów lodu, które uszkodziłyby komórki tych tkanek. W naszych eksperymentach materiał był wstępnie traktowany (podany prekulturze) pożywkami zawierającymi sacharozę we wzrastających dawkach (0,25 M sacharozy przez 24 h, 0,5 M przez 24 h, 0,75 M przez 2 dni, 1,0 M przez 3 dni) przez 7 dni, w temperaturze 25°C i w ciemności. Zabieg ten prowadził do osmotycznej dehydratacji materiału (ryc. 5A). Po upływie tego czasu fragmenty tkanki (ang. clumps) były poddawane dalszemu podsuszaniu – w sterylnym powietrzu nad żelem krzemionkowym, aż do utraty przez nie wody do zawartości ok. 20% (ryc. 5B). Po tych zabiegach próbki zamrażano w ciekłym azocie na 24 h. Następnie tkanki były rozmrażane w temperaturze 42°C i stopniowo uwadnia-



Ryc. 5. Kriokonserwacja tkanki embriogennej świerka metodą stopniowej dehydratacji.

A – dehydratacja osmotyczna tkanki na pożywce z sacharozą (0,25–1,0 M); B – suszenie fragmentów tkanki (clumps) w sterylnym powietrzu nad żelem krzemionkowym; C – regeneracja tkanki embriogennej po rozmrożeniu z ciekłego azotu (fot. A. Obarska)

Fig. 5. Cryopreservation of *Picea* embryogenic tissue by stepwise dehydration.

A – osmotic dehydration of tissue on sucrose medium (0.25–1.0 M); B – drying of tissue fragments (clumps) in sterile air over silica gel; C – regeneration of embryogenic tissue after thawing from liquid nitrogen (photo A. Obarska)

ne na pożywkach zawierających sacharozę (od najwyższej do najniższej dawki) i ostatecznie przenoszone na pożywkę do namnażania, na której podejmowały wzrost (ryc. 5C; Hazubska-Przybył i in., 2010).

Opracowana przez nas procedura pozwoliła na uzyskanie niemal 100% przeżywalności tkanki embriogennej *P. omorika*, która z sukcesem namnażała się w kulturze *in vitro* po kriokonserwacji. Z kolei w przypadku *P. abies* powyższa procedura została nieco zmodyfikowana ze względu na niską przeżywalność tkanki po zabiegu kriokonserwacji. Z tego powodu pożywki zawierające sacharozę o określonych stężeniach zostały uzupełnione dodatkowo 10 μ M ABA, co w efekcie poprawiło wydajność metody. Uzyskana przeżywalność tkanki embriogennej wynosiła wówczas 54,4%, podczas gdy zastosowanie samej sacharozy dało tylko 20% przeżywalności tkanki (Hazubska-Przybył i in., 2013). Jednocześnie dodatek ABA do pożywek na etapie prekultury wpłynął pozytywnie na zdolność tkanek embriogennych do formowania większej liczby zarodków w stadium dojrzalym.

Zaletą opracowanej przez nas metody jest to, że nie wymaga ona stosowania toksycznego dimetylosulfotlenku (DMSO) rutynowo używanego w innych technikach kriokonserwacji. Według niektórych doniesień DMSO może przyczyniać się do pewnych niepożądanych zmian, zarówno na poziomie biochemicznym, genetycznym, jak i epigenetycznym (Finkle i in., 1985; Aronen i in., 1999). Z tego powodu nowa procedura stanowić może bezpieczniejszą alternatywę w stosunku do innych metod krioprzehowywania kultur embriogennych świerka.

Zarodki we wczesnych stadiach rozwojowych obecne w tkankach embriogennych, zarówno przechowywanych w ciekłym azocie, jak i w kulturze *in vitro*, można stymulować do dojrzewania. U świerków rozwój zarodków somatycznych jest pobudzany poprzez zastąpienie auksyn i cytokinin w pożywkach namnażających kwasem abscysynowym (ABA). ABA pobudza akumulację materiałów zapasowych (białka i lipidy), które są niezbędne do prawidłowego i zsynchronizowanego rozwoju zarodków, oraz odpowiada za zahamowanie ich przedwczesnego kiełkowania. Zarodki somatyczne gatunków drzew iglastych przechodzą kilka etapów rozwojowych (globularne, sercowate, torpedy, wczesnoliścieniowe i liścieniowe). Ich dojrzewanie jest zazwyczaj wspomagane poprzez ekspozycję tkanek embriogennych na stres osmotyczny, np. w obecności wysokiego stężenia cukrów lub związków o wysokiej masie molekularnej, takich jak glikol polietylenowy 4000 (PEG 4000), bądź też poprzez ekspozycję na obniżoną temperaturę otoczenia. Wyniki naszych badań wykazały znaczący wpływ stężenia ABA i stresu osmotycznego na dojrzewanie i produkcję somatycznych zarodków obu gatunków świerka, co w efekcie determinowało jakość uzyskanego materiału roślinnego (Hazubska-Przybył i in., 2016). Przykładowo, PEG 4000 jest stosowany w celu poprawienia jakości somatycznych zarodków u niektórych gatunków drzew iglastych (Ahn i in., 2017; Jouini i in., 2023). Z naszych eksperymentów wynika jednak, że w przypadku świerka jego wpływ może być uzależniony od gatunku drzewa oraz od genotypu tkanki embriogennej, z któ-

rej rozwijają się somatyczne zarodki (Hazubska-Przybył i Wawrzyniak, 2017). Z kolei ostatnio badania Tikkinena i współpracowników (2018) wykazały możliwość poprawienia rozwoju zarodków podczas ich kiełkowania i konwersji w siewki po przechowywaniu dojrzałych (w stadium liścieniowym) somatycznych zarodków *P. abies* w temperaturze 4°C.

Aby poprawić jakość somatycznych siewek *P. abies* i *P. omorika*, testowaliśmy skuteczność zabiegu częściowego podsuszania i suszenia zarodków. Efektem obniżenia zawartości wody w dojrzałych zarodkach jest z reguły poprawa jakości siewek oraz wzrost liczby roślin zdolnych do aklimatyzacji w warunkach szklarniowych. Somatyczne zarodki w stadium liścieniowym zostały poddane procedurze podsuszania w warunkach relatywnie wysokiej wilgotności względnej powietrza (97%) lub suszeniu w obecności nasyconego roztworu siarczanu amonu (NH_4)₂SO₄ (79%). Uzyskaliśmy najwyższą skuteczność procedury częściowego podsuszania dla zarodków *P. abies*, dla którego po dwóch tygodniach w warunkach 97% wilgotności powietrza stwierdzono 45% poziom konwersji dojrzałych zarodków w siewki (Hazubska-Przybył i in., 2015). W przypadku zarodków *P. omorika* procedura ta okazała się nieskuteczna z uwagi na słaby wzrost hipokotylu, co uniemożliwiło uzyskanie prawidłowo wykształconych siewek. Druga testowana przez nas procedura była mniej skuteczna, a nawet prowadziła do obumierania zarodków.

Według niektórych danych literaturowych stężenie regulatorów wzrostu, które stosowano w pożywkach przed dojrzewaniem zarodków, warunkowało poziom produkcji zarodków u gatunków drzew iglastych z traktowanych tkanek embriogennych (Klimaszewska i in., 2001; Leljak-Levanic i in., 2009). Postawiono hipotezę, że zahamowanie rozwoju zarodków może wynikać z nadmiernego nagromadzenia auksyn i cytokinin w tkankach embriogennych, co zapobiega procesowi różnicowania i wzrostu zarodków (Klimaszewska i in., 2001). Wyniki naszych badań pokazują, że egzogenne auksyny znacząco wpływały na rozwój hipokotyli i korzonka zarodkowego u obu gatunków świerka podczas kiełkowania somatycznych zarodków. Bardziej zsynchronizowany rozwój korzenia i hipokotyli uzyskano dla *P. abies* po uprzednim traktowaniu tkanek NAA/BA, natomiast u *P. omorika* synchronizacja rozwoju obu tych organów była niższa (Hazubska-Przybył i in., 2020).

Problem z kiełkowaniem zarodków somatycznych i konwersją w siewki jest nadal nierozwiązaną kwestią u wielu gatunków roślin rozmnażanych *in vitro*, włączając w to drzewa (Garcia i in., 2019). W ostatnio przeprowadzonym przez nas eksperymencie tylko 30% zarodków świerka pospolitego i 5% zarodków świerka serbskiego przekształciło się w siewki, mimo że ponad 95% zarodków obu gatunków wykazywało zdolność do kiełkowania (Hazubska-Przybył i in., 2020). Najczęściej wynikało to ze wspomnianych utrudnień związanych z zaburzeniami w synchronizacji wzrostu pędu i korzenia, zwłaszcza w przypadku siewek świerka serbskiego, co uniemożliwiło aklimatyzację tych roślin do warunków szklarniowych. Niemniej jednak we wcześniejszych podejmowanych próbach uzyskaliśmy w Instytucie Dendrologii PAN prawidłowo



Ryc. 6. Aklimatyzacja siewek *P. omorika* i *P. abies* w tzw. doniczkach Jiffy (A) i wzrost rocznych sadzonek somatycznych w glebie (B)

Fig. 6. Acclimatization of *P. omorika* and *P. abies* seedlings in so-called Jiffy pots (A) and growth of annual somatic seedlings in soil (B)

wykształcone siewki i sadzonki somatyczne obu gatunków świerka, które były zdolne do wzrostu w warunkach pozalaboratoryjnych (ryc. 6A i 6B; Hazubska-Przybył i Bojarczuk, 2008).

Badania nad optymalizacją metody somatycznej embriogenezy i kriokonserwacją tkanek embriogennych świerka serbskiego i pospolitego były prowadzone w ramach dwóch projektów badawczych, finansowanych przez Komitet Badań Naukowy (nr 3P06L 055 25) i przez Narodowe Centrum Nauki (nr NN 309 130 837) oraz w ramach badań statutowych ID PAN.

Podsumowanie

Przedstawiona metoda wegetatywnego rozmnażania drzew drogą somatycznej embriogenezy daje możliwości produkowania wysokiej jakości sadzonek obu gatunków świerka. Włączenie dodatkowych metod wspomagających ten proces, takich jak kriokonserwacja materiału roślinnego i automatyzacja niektórych etapów produkcji somatycznych siewek, może dać podstawę do wdrożenia zaprezentowanej metody w szerszej skali gospodarczej. Wyniki naszych badań pokazują, że znajdzie ona zastosowanie nie tylko w celach ściśle komercyjnych, ale także ekologicznych. Metoda somatycznej embriogenezy może stanowić bardzo dobre narzędzie pozwalające na zachowanie bioróżnorodności biologicznej zagrożonych gatunków drzew, co zostało wykazane na przykładzie świerka serbskiego. W dobie intensywnych zmian klimatycznych, na ogół niekorzystnych dla gatunków drzew iglastych, może ona stanowić doskonałą alternatywę dla tradycyjnie stosowanych metod, których wydajność jest często ograniczona.

Literatura

- Ahn C-H, Tull AR, Montello PM, Merkle SA. 2017. A clonal propagation system for Atlantic white cedar (*Chamaecyparis thyoides*) via somatic embryogenesis without the use of plant growth regulators. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 130:91–101 DOI: 10.1007/s11240-017-1206-7.
- Aronen TS, Krajnakova J, Häggman HM, Ryyänen LA. 1999. Genetic fidelity of cryopreserved embryogenic cultures of open-pollinated *Abies cephalonica*. *Plant Science* 142:163–172 DOI: 10.1016/S0168-9452(98)00244-1.
- Ballian D, Longauer R, Miki T, Paule L, Kajba D, Gömöry D. 2006. Genetic structure of rare European conifer, Serbian spruce (*Picea omorika* (Panč.) Purk.). *Plant Systematics and Evolution* 260:53–63 DOI: 10.1007/s00606-006-0431-z.
- Bonga JM. 2015. A comparative evaluation of the application of somatic embryogenesis, rooting of cuttings, and organogenesis of conifers. *Canadian Journal of Forest Research* 45:379–383 DOI: 10.1139/cjfr-2014-0360.
- Boratyński A, Bugała W red. 1998. *Biologia świerka pospolitego*. Poznań: Bogucki Wydawnictwo Naukowe.
- Budimir S, Vujičić R. 1992. Benzyladenine induction of buds and somatic embryogenesis in *Picea omorika* (Pančić) Purk. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31:89–94 DOI: 10.1007/BF00037691.
- Bugała W. 2000. *Drzewa i krzewy*. Warszawa: PWRiL.
- Carlsson J, Egertsdotter U, Ganeteg U, Svennerstam H. 2019. Nitrogen utilization during germination of somatic embryos of Norway spruce: revealing the importance of supplied glutamine for nitrogen metabolism. *Trees* 33:383–394 DOI: 10.1007/s00468-018-1784-y.
- Chalupa V. 1985. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. 14:57–63.
- Cyr DR. 1999. Cryopreservation of embryogenic cultures of conifers and its application to clonal forestry. W: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ red. *Somatic embryogenesis in woody plants*. Kluwer Academic Publishers, 239–261.
- Cyr DR, Attree SM, El-Kassaby YA, Ellis DD, Polonenko DR, Sutton BCS. 2001. Application of somatic embryogenesis to tree improvement in conifers. *Progress in Biotechnology* 18:305–312 DOI: 10.1016/S0921-0423(01)80086-1.

- Dahrendorf J, Clapham D, Egertsdotter U. 2018. Analysis of nitrogen utilization capability during the proliferation and maturation phases of Norway spruce (*Picea abies* (L.) H.Karst.) somatic embryogenesis. *Forests* 9(6):288 DOI: 10.3390/f9060288.
- Dell’Oro M, Mataruga M, Sass-Klaassen U, Fonti P. 2020. Climate change threatens on endangered relict Serbian spruce. *Dendrochronologia* 59:125651 DOI: 10.1016/j.dendro.2019.125651.
- Denchev P, Grossnickle SC. 2019. Somatic embryogenesis for conifer seedling production: The biology of scaling. *Reforesta* 7:109–137 DOI: 10.21750/REFOR.7.08.70.
- Dyderski MK, Paż S, Frelich LE, Jagodziński AM. 2018. How much does climate change threaten European forest tree species distributions? *Global Change Biology* 24:1150–1163 DOI: 10.1111/gcb.13925.
- Egertsdotter U, Ahmad I, Clapham D. 2019. Automation and scale up of somatic embryogenesis for commercial plant production, with emphasis on conifers. *Frontiers in Plant Science* 10:109 DOI: 10.3389/fpls.2019.00109.
- Filonova LH, Bozhkov PV, von Arnold S. 2000a. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *Journal of Experimental Botany* 51:249–264 DOI: 10.1093/jexbot/51.343.249.
- Filonova LH, Bozhkov PV, Brukhin VB, Daniel G, Zhivotovsky B, von Arnold S. 2000b. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *Journal of Cell Science* 113:4399–4411 DOI: 10.1242/jcs.113.24.4399.
- Finkle BJ, Zavala ME, Ulrich IM. 1985. Cryoprotective compounds in the viable freezing of plant tissues. W: Kartha KK red. *Cryopreservation of plant cells and organs*. Boca Raton: CRC Press, 75–113.
- Garcia C, Furtado de Almeida AA, Costa M, Britto D, Valle R, Royaert S, Marelli JP. 2019. Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 137:193–212 DOI: 10.1007/s11240-019-01569-8.
- Grossnickle S, Major J. 1994. Interior spruce seedlings compared with emblings produced from somatic embryogenesis. III. Physiological-response and morphological development on a reforestation site. *Canadian Journal of Forest Research* 24:1397–1407 DOI: 10.1139/x94-180.
- Hakman I, Fowke LC, von Arnold S, Eriksson T. 1985. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Science* 38:53–59 DOI: 10.1016/0168-9452(85)90079-2.
- Hazubska T, Szczygieł K. 2003. Induction of somatic embryogenesis in spruce: *Picea omorika*, *P. pungens* “*Glauca*”, *P. breweriana* and *P. abies*. *Dendrobiology* 50:17–24.
- Hazubska-Przybył T, Bojarczuk K. 2008. Somatic embryogenesis of selected spruce species (*Picea abies*, *P. omorika*, *P. pungens* “*Glauca*” and *P. breweriana*). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 77:189–199 DOI: 10.5586/asbp.2008.023.
- Hazubska-Przybył T, Bojarczuk K. 2016. Tree somatic embryogenesis in science and forestry. *Dendrobiology* 76:105–116 DOI: 10.12657/denbio.076.010.
- Hazubska-Przybył T, Chmielarz P, Bojarczuk K. 2015. In vitro responses of various explants of *Fagus sylvatica*. *Dendrobiology* 73:135–144 DOI: 10.12657/denbio.073.014.
- Hazubska-Przybył T, Chmielarz P, Michalak M, Bojarczuk K. 2010. Cryopreservation of embryogenic tissues of *Picea omorika* (Serbian spruce). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 102:35–44 DOI: 10.1007/s11240-010-9701-0.
- Hazubska-Przybył T, Chmielarz P, Michalak M, Dering M, Bojarczuk K. 2013. Survival and genetic stability of *Picea abies* embryogenic cultures after cryopreservation using a pregrowth-dehydration method. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 113:303–313 DOI: 10.1007/s11240-012-0270-2.
- Hazubska-Przybył T, Kalemba EM, Ratajczak E, Bojarczuk K. 2016. Effects of abscisic acid and an osmoticum on the maturation, starch accumulation and germination of *Picea* spp. somatic embryos. *Acta Physiologiae Plantarum* 38:59 DOI: 10.1007/s11738-016-2078-x.
- Hazubska-Przybył T, Ratajczak E, Obarska A, Pers-Kamczyc E. 2020. Different roles of auxins in somatic embryogenesis efficiency in two *Picea* species. *International Journal of Molecular Sciences* 21:3394 DOI: 10.3390/ijms21093394.
- Hazubska-Przybył T, Wawrzyniak M. 2017. Stimulation of somatic embryo growth and development in *Picea* spp. by polyethylene glycol. *Dendrobiology* 78:168–178 DOI: 10.12657/denbio.078.016.
- Högberg K, Varis S. 2016. Vegetative propagation of Norway spruce: Experiences and present situation in Sweden and Finland. W: Park YS, Bonga JM, Moon H-K red. *Vegetative propagation of forest trees*. Seoul: National Institute of Forest Science, 528–550.
- Hudec L, Konrádová H, Hašková A, Lipavská H. 2016. Norway spruce embryogenesis: changes in carbohydrate profile, structural development and response to polyethylene glycol. *Tree Physiology* 36:548–561 DOI: 10.1093/treephys/tpw016.
- Ivetić V, Aleksić JM. 2019. Serbian spruce and climate change: Possible outcomes and conservation strategy. W: Šijačić-Nikolić M, Milovanović J, Nonić M red. *Forests of Southeast Europe under a changing climate*. Advances in Global Change Research 65. Cham: Springer, 353–371 DOI: 10.1007/978-3-319-95267-3_30.
- Jouini N, Yahyaoui E, Tarraf W, İzgü T, Benelli C, Lambardi M, Germanà MA. 2023. Somatic embryogenesis in *Abies nebrodensis*, an endangered Sicilian fir. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 152:393–404 DOI: 10.1007/s11240-022-02415-0.
- Klimaszewska K, Overton C, Stewart D, Rutledge RG. 2011. Initiation of somatic embryos and regeneration of plants from primordial shoots of 10-year-old somatic white spruce and expression profiles of 11 genes followed during the tissue culture process. *Planta* 233:635–647 DOI: 10.1007/s00425-010-1325-4.
- Klimaszewska K, Park Y-S, Overton C, Maceacheron I, Bonga JM. 2001. Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 37:392–399 DOI: 10.1007/s11627-001-0069-z.

- Kolevska-Pletikapi B, Krsnik-Rasol M, Lorkovi Z, Besendorfer V, Tramisak T, Jelaska S. 1995. Somatic embryogenesis in *Picea omorika* (Pan.) Purk. *Acta Pharmaceutica* 45:267–271.
- Koski V, Skrøppa T, Paule L, Wolf H, Turok J. 1997. Technical guidelines for genetic conservation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). Rome: International Plant Genetic Resources Institute.
- Latkowska M. J. 2002. Somatyczna embriogeneza roślin iglastych na przykładzie świerka pospolitego (*Picea abies* [L.] Karst.). *Biotechnologia* 4(59):210–226.
- Leljak-Levanić D, Mihaljević S, Jelaska S. 2009. Variations in DNA methylation in *Picea omorika* (Panč) Purk. Embryogenic tissue and the ability for embryo maturation. *Propagation of Ornamental Plants* 9:3–9.
- Lelu-Walter M-A, Thompson D, Harvengt L, Sanchez L, Toribio M, Pâques LE. 2013. Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genetics & Genomes* 9:883–899 DOI: 10.1007/s11295-013-0620-1.
- Mikuła A, Chmielarz P, Hazubska-Przybył T, Kulus D, Maślanka M, Pawłowska B, Zimnoch-Guzowska E. 2022. Cryopreservation of plant tissues in Poland: Research contributions, current status, and applications. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 91:9132 DOI: 10.5586/asbp.9132.
- Montwé D, Spiecker H, Hamann A. 2014. An experimentally controlled extreme drought in a Norway spruce forest reveals fast hydraulic response and subsequent recovery of growth rates. *Trees* 28:891–900 DOI: 10.1007/s00468-014-1002-5.
- Nawrot-Chorabik K. 2016. Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in Nordmann's fir (*Abies nordmanniana*). *Journal of Forestry Research* 27:1219–1228 DOI: 10.1007/s11676-016-0265-7.
- Nawrot-Chorabik K, Marcol-Rumak N, Latowski D. 2021. Investigation of the biocontrol potential of two ash endophytes against *Hymenoscyphus fraxineus* using in vitro plant–fungus dual cultures. *Forests* 12:1750 DOI: 10.3390/f12121750.
- Nawrot-Chorabik K, Sułkowska M, Osmenda M, Mohytych V, Surówka E, Latowski D. 2022. The impact of biotic and abiotic stress factors on development of European ash tissue cultures. *Forests* 13:59 DOI: 10.3390/f13010059.
- Pérez-Luna A, Wehenkel C, Prieto-Ruiz JÁ, López-Upton J, Solís-González S, Chávez-Simental JA, Hernández-Díaz JC. 2020. Grafting in conifers. A review. *Pakistan Journal of Botany* 52:1369–1378 DOI: 10.30848/PJB 2020-4(10).
- Rosvall O. 2019. Using Norway spruce clones in Swedish forestry: general overview and concepts. *Scandinavian Journal of Forest Research* 34:336–341 DOI: 10.1080/02827581.2019.1614659.
- Ruad J-N, Bercetche J, Pâques M. 1992. First evidence of somatic embryogenesis from needles of 1-year-old *Picea abies* plants. *Plant Cell Reports* 11:563–566 DOI: 10.1007/BF00233093.
- Salonen F, Varis S, Aronen TS. 2017. From Petri dishes to bioreactors – First experiences on optimization of Norway spruce SE-process for bioreactors. W: Bonga JM Park Y-S, Trontin J-F red. *Proceedings of the 4th International Conference of the IUFRO Unit 2.09.02. on: “Development and application of vegetative propagation technologies in plantation forestry to cope with a changing climate and environment”*. September 19–23, 2016. La Plata, 317–321.
- Salopek B, Milaković TT, Mihaljević S, Jelaska S. 1997. Storage product accumulation during the maturation of *Picea omorika* (Panc.) Purk. somatic embryos. *Periodicum Biologorum* 99:117–124.
- Sierota Z, Grodzki W, Szczepkowski A. 2019. Abiotic and biotic disturbances affecting forest health in Poland over the past 30 years: Impacts of climate and forest management. *Forests* 10:75 DOI: 10.3390/f10010075.
- Subramanian N, Bergh J, Johansson U, Nilsson U, Sallnäs O. 2016. Adaptation of forest management regimes in southern Sweden to increased risks associated with climate change. *Forests* 7:8 DOI: 10.3390/f7010008.
- Szczygieł K. 2003. Somatyczna embriogeneza świerka pospolitego (*Picea abies* Karst.), jodły pospolitej (*Abies alba* Mill.) oraz modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.). (praca doktorska) Warszawa: Instytut Badawczy Leśnictwa.
- Szczygieł K. 2005. Somatyczna embriogeneza – alternatywny sposób uzyskania wyselekcjonowanego materiału sadzeniowego gatunków drzew iglastych. *Leśne Prace Badawcze* 2005(3):71–92.
- Szczygieł K. 2006. Możliwości wegetatywnego rozmnażania drzew leśnych in vitro. W: Sabor J red. *Elementy genetyki i hodowli selekcyjnej drzew leśnych*. Centrum Informacyjne Lasów Państwowych, 399–406.
- Szczygieł K, Hazubska-Przybył T. 2010. Światowe tendencje wykorzystania metod wegetatywnego rozmnażania drzew. *Leśne Prace Badawcze* 71(2):208–211.
- Szczygieł K, Hazubska-Przybył T, Bojarczuk K. 2007. Somatic embryogenesis of selected coniferous tree species of the genera *Picea*, *Abies* and *Larix*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 76:7–15.
- Tikka M, Varis S, Peltola H, Aronen T. 2018. Improved germination conditions for Norway spruce somatic cotyledonary embryos increased survival and height growth of emblings. *Trees* 32:1489–1504 DOI: 10.1007/s00468-018-1728-6.
- Tramišak-Milaković T, Mihaljević S, Jelaska S. 1999. Effects of abscisic acid and carbohydrates on the maturation of *Picea omorika* (Panč.) Purk. somatic embryos. *Acta Botanica Croatica* 58:87–97.
- Välimäki S, Hazubska-Przybył T, Ratajczak E, Tikkinen M, Varis S, Aronen T. 2021. Somatic embryo yield and quality from Norway spruce embryogenic tissue proliferated in suspension culture. *Frontiers in Plant Science* 12:791549 DOI: 10.3389/fpls.2021.791549.
- Varis S, Tikkinen M, Välimäki S, Aronen T. 2021. Light spectra during somatic embryogenesis of Norway spruce – impact on growth, embryo productivity, and embling survival. *Forests* 12:301 DOI: 10.3390/f12030301.