



## Gynogeneza *in vitro* jako metoda haploidyzacji roślin

Rafał Mól

Zakład Botaniki Ogólnej, Wydział Biologii  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

### *In vitro* gynogenesis as a method for haploid plant production

#### Summary

This paper reviews last three decades of work on *in vitro* cultures of unpollinated ovaries or ovules. During *in vitro* gynogenesis, plants are produced from embryos or callus tissue of haploid (parthenogenetic or apogamic) origin. Thus, *in vitro* gynogenesis offers an efficient method for plant breeders who want to obtain haploid plants and homozygous lines. Stability of DH-lines and very limited albinism of regenerated plants are major advantages of the method. The limiting factors are genotype effects in particular species and relatively high labour compared to anther or microspore cultures. Since 1976, the studies on *in vitro* gynogenesis have been performed in 27 species including many crops. Furthermore, gynogenetic haploids have been routinely used in breeding programmes for sugar beet, onion and rice. Because of labour expenses, cultures of unpollinated ovaries or ovules are usually chosen when no other efficient method is available for haploid production in a given species.

#### Key words:

gynogenesis, ovary/ovule culture, parthenogenesis, apogamy, doubled haploids, DH.

#### Adres do korespondencji

Rafał Mól,  
Zakład Botaniki Ogólnej,  
Wydział Biologii,  
Uniwersytet  
im. Adama Mickiewicza,  
al. Niepodległości 14,  
61-713 Poznań;  
e-mail:  
ramol@amu.edu.pl

### 1. Wstęp

Haploidy są wykorzystywane w hodowli roślin i mają podstawowe znaczenie dla przyspieszenia homozygotyzacji roślinnych materiałów hodowlanych. Wytwarzanie haploidów na drodze kultur pylników lub mikrospor (androgenesa *in vitro*), albo kultur niezapylonych zalążni lub zalążków (gynogeneza *in vitro*) są zatem

cennymi metodami dla hodowców roślin, a ponadto stanowią niezwykle interesujące systemy dla badania procesów rozwojowych u roślin.

Termin „gynogeneza” wprowadził w 1925 r. Wilson (1) dla opisanego sytuacji, gdy podczas zapłodnienia nie dochodzi do kariogamii, jądro plemnikowe zanika w cytoplazmie komórki jajowej, a zarodek rozwija się tylko w oparciu na materiale genetycznym zawartym w jądrze żeńskim. Powstające w ten sposób żeńskie potomstwo spotyka się u ryb i płazów (2), a także sporadycznie u roślin okrytozalążkowych (3). Bohanec (4) dokonał przeglądu metod stosowanych współcześnie dla otrzymywania roślin gynogenetycznych, których rozwój można indukować poprzez zapylenie pyłkiem obcego gatunku, pyłkiem napromieniowanym lub pyłkiem specjalnie dobranej linii indukującej.

San Noeum (5) w 1979 r. otrzymała po raz pierwszy haploidy jęczmienia z kultur niezapylnych zalążni i, przez analogię do haploidów w kulturach pylnikowych, nazwała rośliny gynogenetycznymi, a cały proces gynogenezą. W późniejszych badaniach wykazano, że inne są mechanizmy tak rozumianej gynogenezy, gdy porównać je do omówionych procesów zachodzących *in vivo*. Uznano zatem (6), że dla odróżnienia od definicji wprowadzonej przez Wilsona (1), należy w tym przypadku stosować termin „gynogeneza *in vitro*”. W tej pracy przedstawiono aktualny stan badań nad gynogenezą indukowaną w warunkach kultur *in vitro* niezapylnych zalążni lub zalążków.

## 2. Przebieg gynogenezy *in vitro*

U większości badanych gatunków eksplantaty, tzn. zalążnie, zalążki wraz z łożyskiem lub izolowane zalążki, powiększają się zazwyczaj w pierwszych dniach kultury *in vitro* i po dalszych 3-7 tygodniach wyrastają z zalążków korzenie lub, rzadziej, pędy gynogenetycznych siewek. Na fotografii przedstawiono przykład regeneracji roślin gynogenetycznych u *Melandrium album* (7). U zbóż i kilku innych gatunków obserwowano tworzenie się tkanki kalusowej z zalążków i regenerowano z niej rośliny (tab. 1).

W embriologicznej analizie hodowanych *in vitro* zalążków ujawniono (tab. 2), że jeśli eksplantaty zawierają młode stadia gametofitów, woreczki zalążkowe najczęściej rozwijają się prawidłowo (typ Polygonum) i haploidalne zarodki powstają z komórki jajowej (partenogeneza), z synergidy lub z antypody (apogamia). Apogamiczne zarodki w ryżu tworzyły się z synergid również w nietypowych woreczkach zalążkowych (13, 36), natomiast u *Melandrium album* mogły też powstawać z układów komórek po nietypowej celularyzacji gametofitu żeńskiego (34).

Tabela 1

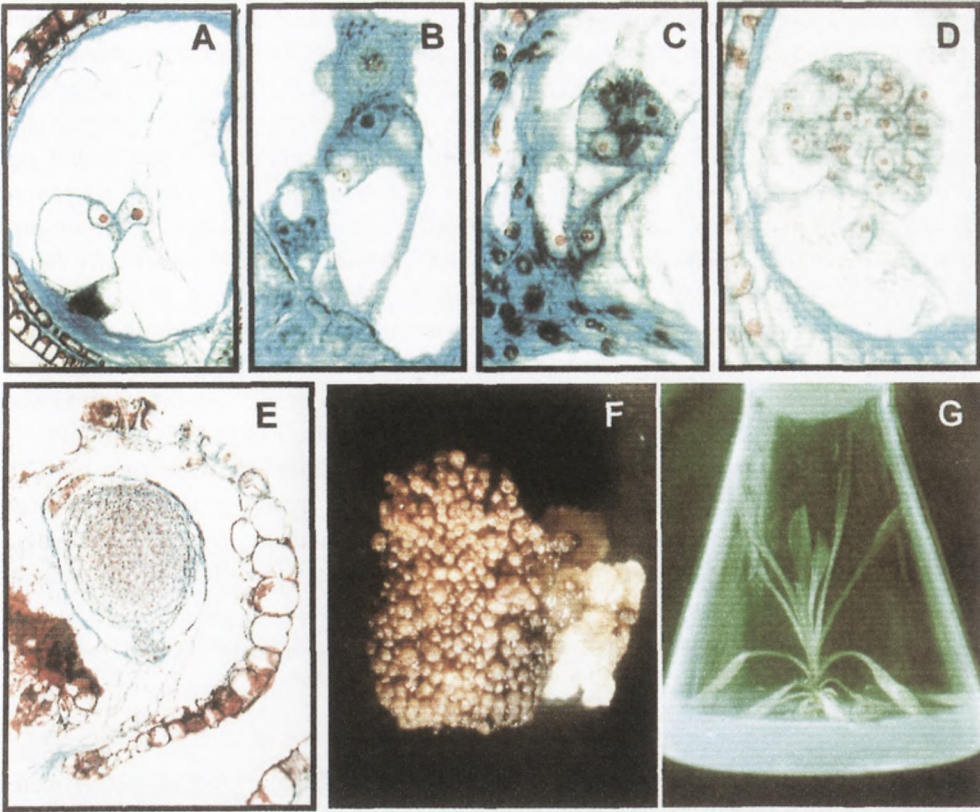
Zestawienie gatunków, u których regenerowano rośliny z gynogenetycznego kalusa

Rodzina	Gatunek	Literatura
<i>Gramineae</i>	<i>Fagopyrum esculentum</i>	(8)
	<i>Hordeum vulgare</i>	(9,10)
	<i>Oryza sativa</i>	(11-13)
	<i>Panicum miliaceum</i>	(14)
	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>durum</i>	(15)
	<i>Zea mays</i>	(16,17)
<i>Asteraceae</i>	<i>Gerbera jamesonii</i>	(18-20)
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Beta vulgaris</i>	(21)
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Hevea brasiliensis</i>	(22)
<i>Salicaceae</i>	<i>Populus x simonigra</i>	(23)
<i>Solanaceae</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	(24)
	<i>Solanum tuberosum</i>	(25)

Tabela 2

Procesy embriologiczne prowadzące do rozwoju haploidalnych zarodków w kulturach *in vitro* zalążni lub zalążków

Gatunek	Sposób rozwoju	Literatura
<i>Allium tuberosum</i>	partenogeneza, apogamia z antypod	(26)
<i>Astragalus cicer</i>	partenogeneza	(27)
<i>Baptisia australis</i>	partenogeneza	(27)
<i>Beta vulgaris</i>	partenogeneza	(28,29)
<i>Coriandrum sativum</i>	apogamia z synergid	(30)
<i>Helianthus annuus</i>	partenogeneza	(31)
<i>Hordeum vulgare</i>	partenogeneza, apogamia z antypod	(32)
<i>Lavandula</i> sp.	partenogeneza	(30)
<i>Lilium davidii</i>	embriogeneza z megaspor	(33)
<i>Melandrium album</i>	partenogeneza, embriogeneza z nietypowych komórek	(7,34)
<i>Nicotiana rustica</i> , <i>N. tabacum</i>	partenogeneza, apogamia z synergid, apogamia z antypod, embriogeneza z megaspor	(35)
<i>Oryza sativa</i>	apogamia z synergid	(13,36)
<i>Salvia sclarea</i>	partenogeneza	(37)
<i>Zea mays</i>	partenogeneza	(38)



Fot. Regeneracja roślin na drodze partenogenezy w kulturze niezapylonych zalążków na łożysku u *Melandrium album*. (A) Woreczek zalążkowy zawierający, po 6 dniach *in vitro*, komórkę jajową, komórkę centralną i zdegenerowaną synergidę; pow.  $\times 215$ . (B-D) Rozwój kulistego prazarodka z komórki jajowej; pow.  $\times 535$  (B),  $\times 425$  (C i D). (E) Duży kulisty zarodek wypełniający cały woreczek zalążkowy po 32 dniach *in vitro*; pow.  $\times 100$ . (F) Powiększone zalążki wytwarzające białe struktury gynogenetyczne w 2 miesiącu kultury; pow.  $\times 5$ . (G) Roślinka na pożywce regeneracyjnej 3 miesiące od początku kultury zalążków; pow.  $\times 0,7$ .

### 3. Czynniki wpływające na wydajność

#### 3.1. Genotyp

Genotyp jest jednym z najważniejszych czynników, od których zależy częstość indukcji zarodków gynogenetycznych oraz efektywność regeneracji roślin. Wielu autorów wskazywało na znaczenie tego czynnika, ale dobrze udokumentowane są omówione przykłady.

Geoffriau i wsp. (39) badali indukcję i regenerację roślin gynogenetycznych w kulturach pąków kwiatowych cebuli (*Allium cepa*) i porównywali odmiany w popula-

cjach, linie wsobne i odmiany syntetyczne. Geograficzne pochodzenie populacji (północna, południowa i wschodnia Europa, Stany Zjednoczone AP) nie wpływało na ich zdolność do gynogenezy, natomiast zarówno indukcja zarodków jak i regeneracja roślin gynogenetycznych zależały od genotypu. Najlepsze wyniki otrzymano dla materiałów wsobnych i syntetycznych. W populacjach odsetek zarodków wahał się od 0 do 7,7%, a wydajność regeneracji wynosiła 0-4%. Najlepsza okazała się jedna z populacji cebuli cv. Wolska. Dla odmiany Rijnsburger porównywano materiały populacyjne i wsobne – najlepsza populacja dała 2,4% indukcji zarodków i 0,6% regeneracji roślin, podczas gdy linia wsobna odpowiednio 17,4 i 11,1%. Bardzo dobrą zdolność do gynogenezy wykazała syntetyczna odmiana Hard Globe (indukcja 10,5%, regeneracja 4,3%). W innych badaniach nad 30 polskimi odmianami cebuli stwierdzono również znaczenie genotypu dla indukcji gynogenezy (40). Podobny efekt obserwowano u *Oryza sativa* – z porównywanych przez Zhou i Yang (11) odmian bardziej wydajne były odmiany *japonica*, u których tkanka kalusowa powstawała z 2-12% zalążni. Dla odmian ryżu *indica* uzyskano 0-2,8% kalusa gynogenetycznego. Hosemans i Bosoutrot (41) badali gynogenezę w kulturach zalążków buraka cukrowego i stwierdzili, że linie męskosterylne *B. vulgaris* dały 4 razy więcej haploidów (z 0,8% zalążków) niż linie płodne (0,2%).

### 3.2. Stadium woreczka zalążkowego

U gatunków, dla których stosowano kultury zalążni lub zalążków, gametofit żeński rozwija się wg typu Polygonum przechodząc, po mejozie, od stadium 1-jądrowej komórki do 8-jądrowego i 7-komórkowego woreczka zalążkowego, a ostateczna liczba komórek w dojrzałym gametoficie zależy od degeneracji lub podziałów antypod. W kulturach *in vitro* młodych zalążków dojrzałość osiąga 20-97% woreczków zalążkowych, ale większość z nich później degeneruje.

Aby uzyskać haploidy, u większości gatunków stosowano eksplantaty zawierające dojrzałe woreczki zalążkowe, ale wpływ stadium gametofitu żeńskiego na wydajność procesu gynogenezy badano tylko u trzech gatunków. Dla jęczmienia (*Hordeum vulgare*) optymalne okazało się stadium dojrzałego woreczka zalążkowego (5,10,32). Natomiast u ryżu i u *Melandrium album* najlepsze były niedojrzałe 2-4-jądrowe woreczki zalążkowe (7,13). Jedynie u *Nicotiana tabacum*, *N. rustica* i u *Lilium davidii* hodowano *in vitro* zalążki w stadium mejozy i powstające megaspory przekształcały się bezpośrednio w embrioidy (33,35). Z przedstawionych tu prac wynika, że dodatkowe podziały i formowanie się haploidalnych zarodków można stymulować we wszystkich stadiach rozwoju woreczka zalążkowego, ale optymalne stadium może być odmienne w zależności od gatunku i warunków kultur *in vitro*.

### 3.3. Warunki kultury *in vitro*

Na pożywki wykładane są najczęściej całe załączniki, ale eksplantatami mogą być też fragmenty załączni, załączki (izolowane lub na łożysku), a nawet całe pąki kwiatowe. Decydujące znaczenie dla uzyskanych efektów ma skład pożywki. Sole mineralne pożywek dla gynogenezy to zazwyczaj makro- i mikroelementy MS (42), N6 (43) lub B5 (44). Również skład aminokwasów i witamin jest taki, jak w wymienionych pożywkach. W początkowym okresie kultury, kiedy komórki pobudzone są do tworzenia zarodków, stosuje się 6-10% sacharozy, natomiast dla regeneracji roślin 2-3%. Ważny jest skład hormonalny podłoża – stosowane są auksyny (2,4-D, IAA lub NAA najczęściej w stężeniach  $0,5-2 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ ) i cytokininy (BAP lub kinetyna;  $1-2 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ ). Kashin i wsp. (14) określili, że dla *Panicum miliaceum* optymalny stosunek stężenia auksyn do cytokinin jest inny dla aktywacji komórek woreczka załączkowego (1:2 lub 1:5) niż dla rozwoju gynogenetycznych zarodków (5:1 lub 10:1). Ponadto dodawane są do pożywek hydrolizat kazeiny lub ekstrakt drożdżowy, a Martinez i wsp. (45) stwierdzili ostatnio, że poliaminy (putrescyna 2 mM i spermidyna 0,1 mM) istotnie zwiększały częstość indukcji haploidalnych zarodków cebuli.

Z opublikowanych prac wynika, że fizyczne warunki kultur gynogenetycznych mają mniejsze znaczenie dla wydajności procesu. Powszechnie stosuje się temperaturę w zakresie 22-26°C i oświetlenie 500-3000 lx przy długości dnia 12-16 h. U kilku gatunków rośliny, z których pobiera się eksplantaty, przetrzymywano w niskiej temperaturze co miało korzystny wpływ na proces gynogenezy. Dla pszenicy i jęczmienia stosowano 5-15-dniową inkubację w 3-5°C (15,46), a u cebuli 10-krotnie zwiększono wydajność gynogenezy stosując pąki kwiatowe z roślin uprawianych w 15°C (47).

## 4. Charakterystyka roślin gynogenetycznych

Rośliny regenerowane w kulturach załączni lub załączków są haploidalne, diploidalne lub miksploidalne (tab. 3). Spontaniczna diploidyzacja może zaczynać się już w trakcie rozwoju zarodka (7) i prowadzi do otrzymania ok. 20% podwojonych haploidów (13,19,47,57). Zazwyczaj konieczne jest też kolchicynowanie zregenerowanych haploidów. Alternatywnie, przy zastosowaniu kolchicyny w fazie kultury *in vitro*, powstawało 64-70% podwojonych haploidów buraka cukrowego i cebuli (48,62).

Znakomitą większość regenerantów otrzymanych na drodze gynogenezy *in vitro* stanowią rośliny zielone, a linie DH mają morfologię typową dla materiału wyjściowego. Problem albinizmu, dość silnie przejawiający się u androgenetycznych haploidów zbóż, nie jest czynnikiem ograniczającym wykorzystanie roślin gynogenetycznych w pracach hodowlanych. U ryżu odsetek albinotycznych regenerantów nie przekraczał 13%, podczas gdy u roślin androgenetycznych osiągał 64% (13). Jeszcze większe różnice stwierdzono u *Triticum turgidum* ssp. *durum*, gdzie rośliny regenerowane w kulturach załączni były wyłącznie zielone, a w kulturach pylników wszystkie

były albinotyczne (15). Wśród licznych prac nad cebulą jedynie Muren (49) zaobserwował <1% roślin albinotycznych. Wydłużenie okresu kultury kalusa gynogenetycznego może prowadzić do późniejszego pojawienia się regenerantów albinotycznych, co zanotowano u jęczmienia (9).

Tabela 3

Ploidalność roślin otrzymanych w kulturach *in vitro* zalążni lub zalążków

Stopień ploidalności	Gatunek	Bibliografia
1	2	3
haploidy (n) i spontaniczne DH (2n)	<i>Allium cepa</i> <i>Cucumis sativus</i> <i>Cucurbita pepo</i> <i>Fagopyrum esculentum</i> <i>Gerbera jamesonii</i> <i>Oryza sativa</i>	(39,47-52) (53) (54) (8) (19,20) (11,13)
haploidy (n)	<i>Beta vulgaris</i> <i>Hordeum vulgare</i> <i>Lilium davidii</i> <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>N. rustica</i> <i>Populus x simonigra</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i> <i>Zea mays</i>	(21,41,55-57) (5,9,10) (33) (35) (23) (24) (15) (58,59)
diploidy (2n)	<i>Dianthus caryophyllus</i> <i>Solanum tuberosum</i>	(60) (25)
miksoploidy (n-2n, n-2n-4n), diploidy (2n) i haploidy (n)	<i>Helianthus annuus</i> <i>Hevea brasiliensis</i> <i>Melandrium album</i> <i>Zea mays</i>	(61) (22) (7) (16)

San Noeum i Ahmadi (63) porównywali w 4 pokoleniach linii DH jęczmienia agromomicznie ważne cechy morfologiczne (wysokość, termin kwitnienia, masa 100 ziaren, liczba ziaren w kłosie) i stwierdzili, że linie gynogenetyczne i otrzymane metodą „bulbosum” wykazywały istotnie większe podobieństwo do cech odmiany wyjściowej (cv. Berenice) niż linie androgenetyczne. U *Oryza sativa* cv. Zao Geng 19 wszystkie regeneranty z kultur zalążni miały cechy typowe, ale w drugim pokoleniu linii DH pojawiło się kilka roślin sterylnych i jedna bezzieleniowa (13). U cebuli 25% roślin otrzymanych w kulturach zalążni miało zmienioną morfologię (49). Wysoką stabilność linii homozygotycznych *Allium cepa* zaobserwowali Javornik i wsp. (64) po regeneracji roślin z hodowanych *in vitro* kwiatów pobranych z roślin gynogenetycznych otrzymanych wcześniej. Metoda ta, nazwana przez autorów gynogenezą drugiego cyklu (*second cycle gynogenesis*) pozwoliła też na prawie 20-krotne zwiększenie wydajności (64) i stanowi ważną perspektywę dla lepszego wykorzystania procesu gynogenezy *in vitro* dla pozyskiwania homozygot w hodowli roślin.

## 5. Podsumowanie

Gynogeneza *in vitro*, proces opierający się na partenogenezie lub apogamii indukowanych w warunkach kultur tkankowych, może być wydajną metodą haploidyzacji i homozygotyzacji roślin dla potrzeb hodowli. Zaletami tej techniki *in vitro* są stabilność otrzymanych linii DH, i bardzo ograniczone zjawisko albinizmu. W minionym trzydziestoleciu prowadzono badania nad gynogenezą u 27 gatunków – w większości uprawnych. Rośliny gynogenetyczne wprowadzono do programów hodowlanych buraka cukrowego, cebuli i ryżu. Czynniki ograniczającymi powszechniejsze wykorzystanie gynogenezy w hodowli roślin są zależność jej przebiegu i wydajności od genotypu oraz stosunkowo duża pracochłonność w porównaniu z kulturami pylników lub mikrospor. W praktyce o wyborze sposobu haploidyzacji u danego gatunku decyduje zatem brak innych metod, jak u buraka i cebuli, albo wysokość kosztów pracy, jak np. u jęczmienia.

## Literatura

1. Wilson E. B., (1925), *The Cell in Development and Heredity*, McMillan, New York.
2. Lakra W. S., Das P., (1998), *Indian J. Animal Sci.*, 68, 873-879.
3. Poddubnaya-Arnoldi W. A., (1964), *General Embryology of Angiosperm Plants*, 1-482, Izdat. Nauka, Moscow, (in Russian).
4. Bohanec B., (1994), *Proceedings of the International Colloquium on Plant Biotechnology on Agriculture*, Eds. Bohanec B., Javornik B., 43-55, Rogla, Ljubljana.
5. San Noeum L. H., (1979), *Proceedings of the Conference on Broadening Genetic Base of Crops*, 327-329, Pudoc, Wageningen.
6. Mól R., (1999), *Acta Biol. Cracov. Ser. Botanica*, 41, 67-74.
7. Mól R., (1992), *Plant Sci.*, 81, 261-269.
8. Bohanec B., (1992), *Abstracts of the 18<sup>th</sup> Eucarpia Congress*, 139-140, Malgogne, Angers.
9. Mól R., (1992), *Hodowla Roślin Aklimatyzacja i Nasiennictwo*, 36, 61-66, (in Polish).
10. Castillo A. M., Cistue L., (1993), *Plant Cell Rep.*, 12, 139-143.
11. Zhou C., Yang H. Y., (1981), *Plant Sci. Lett.*, 20, 231-237.
12. Davoyan E. I., Rymar V. T., (1984), *Abstracts of the International Symposium on Plant Tissue and Cell Culture Application to Crop Improvement*, 38, Tisk MTZ, Olomouc.
13. Zhou C., Yang H. Y., Tian H. Q., Liu Z. L., Yan H., (1986), *Haploids of Higher Plants in Vitro*, Eds. Hu H., Yang H. Y., 165-181, China Acad. Press, Beijing, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
14. Kashin A. S., Blyudneva E. A., Silkin M. A., (2000), *Russ. J. Plant Physiol.*, 47, 260-269.
15. Mdarhri-Alaoui M., Saidi N., Chlyah A., Chlyah H., (1998), *C. R. Acad. Sci. Paris, Sci. de la Vie*, 321, 25-30, (in French).
16. Truong-Andre I., Demarly Y., (1984), *Z. Pflanzenzüchtg.*, 92, 309-320.
17. Alatortseva T. A., Sukhanov V. M., Tyrnov V. S., (1988), *Proceedings of the International Conference on Biology of Cultured Cells and Biotechnology*, 201, Novosibirsk, (in Russian).
18. Meynet J., Sibi M., (1984), *Z. Pflanzenzüchtg.*, 93, 78-85.
19. Cappadocia M., Chretien L., Laublin G., (1988), *Can. J. Bot.*, 66, 1107-1110.
20. Miyoshi K., Asakura N., (1996), *Plant Cell Rep.*, 16, 1-5.
21. Hosemans D., Bossoutrot D., (1983), *Z. Pflanzenzüchtg.*, 91, 74-77.
22. Chen Z., Xu X., Pan R., (1990), *Handbook of Plant Cell Culture, Perennial Crops*, Eds. Chen Z., Evans D. A., Sharp W. R., Ammirato P. V., Söndahl M. R., 6, 453-467, McGraw-Hill Publ. Comp., New York, St. Louis, San Francisco.



23. Wu K., (1990), *Handbook of Plant Cell Culture, Perennial Crops*, Eds. Chen Z., Evans D. A., Sharp W. R., Ammirato P. V., Söndahl M. R., 6, 183-190, McGraw-Hill Publ. Comp., New York, St. Louis, San Francisco.
24. Zhu Z., Wu H., An Q., (1984), *Acta Genet. Sinica*, 11, 281-287, (in Chinese).
25. Tao Z., Liu M., Zhu Z., (1988), *Acta Genet. Sinica*, 15, 329-334, (in Chinese).
26. Tian H. Q., Yang H. Y., (1989), *Acta Biol. Exp. Sinica*, 22, 139-147.
27. Ponitka A., Ślusarkiewicz-Jarzina A., (1987), *Genet. Polonica*, 28, 339-342.
28. Olesen P., Buck E., Keimer B., (1988), *Sexual Reproduction in Higher Plants, Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Symposium on Sexual Reproduction of Higher Plants*, Eds. Cresti M., Gori P., Paccini E., 107-112, Springer, Berlin, Heidelberg.
29. Ferrant V., Bouharmont J., (1994), *Sex. Plant Reprod.*, 7, 12-16.
30. Bugara A. M., (1988), *Proceedings of the International Conference on Biology of Cultured Cells and Biotechnology*, 225, Novosibirsk, (in Russian).
31. Yang H. Y., Zhou C., Cai D. T., Yan H., Chen X. M., (1986), *Haploids of Higher Plants in Vitro*, Eds. Hu H., Yang H. Y., 183-191, China Acad. Press, Beijing, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
32. Huang Q. F., Yang H. Y., Zhou C., (1982), *Acta Bot. Sinica*, 24, 299-300, (in Chinese).
33. Gu Z. P., Cheng K. C., (1983), *Acta Bot. Sinica*, 25, 24-28, (in Chinese).
34. Mól R., (1993), *Biologia Plantarum*, 35, 25-30.
35. Wu B. J., Cheng K. C., (1982), *Plant Tissue Culture, Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*, Ed. Fujiwara A., 119-120, Abe Photo Printing Co. Ltd., Tokyo.
36. Li G. M., Yang H. Y., (1986), *Acta Bot. Sinica*, 28, 229-234, (in Chinese).
37. Bugara A. M., Rusina L. V., (1989), *Fiziologia i Biokhimiya Kulturnykh Rastienii*, 20, 554-560, (in Russian).
38. Zverzhanskaya L. S., Grishina E. V., Komarova P. I., (1977), *Genetika*, 13, 969-972, (in Russian).
39. Geoffriau E., Kahane R., Rancillac M., (1997), *Euphytica*, 94, 37-44.
40. Michalik B., Adamus A., Nowak E., (2000), *J. Plant Physiol.*, 156, 211-216.
41. Hosemans D., Bossoutrot D., (1985), *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, Eds. Chapman G. P., Mantell S. H., Daniels R. W., 79-88, Longman, New York, London.
42. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
43. Chu C. C., (1978), *Proceedings of the Symposium on Plant Tissue Culture*, 43-50, Science Press, Beijing.
44. Gomborg O., Miller R., Ojima K., (1968), *Exp. Cell Res.*, 150, 151-158.
45. Martinez L. E., Aguero C. B., Lopez M. E., Galmarini C. R., (2000), *Plant Sci.*, 156, 221-226.
46. San L. H., Gelebart P., (1986), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Ed. Vasil I. K., 3, 305-322, Academic Press Inc., Orlando.
47. Puddephat I. J., Robinson H. T., Smith B. M., Lynn J., (1999), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 52, 145-148.
48. Geoffriau E., Kahane R., Bellamy C., Rancillac M., (1997), *Plant Sci.*, 122, 201-208.
49. Muren R. C., (1989), *HortScience*, 24, 833-834.
50. Champion B., Alloni C., (1990), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 20, 1-6.
51. Sulistyningish E., Yamashita K., Tashiro Y., (2002), *Euphytica*, 125, 139-144.
52. Bohanec B., Jakse M., (1999), *Plant Cell Rep.*, 18, 737-742.
53. Gemez-Juhász A., Balogh P., Ferenczy A., Kristof Z., (2002), *Plant Cell Rep.*, 21, 105-111.
54. Mately E. I., Moustafa S. A., Elsayy B. I., Haroun S. A., Shalaby T. A., (1998), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 52, 117-121.
55. van Geyt J., Speckmann Jr. G. J., D'Halluin K., Jacobs M., (1987), *Theor. Appl. Genet.*, 73, 920-925.
56. Goška M., (1985), *Bull. Polish Acad. Sci. Biol.*, 33, 31-33.
57. Slavova J. V., Rafailova E. T., (1988), *Proceedings of the International Conference on Biology of Cultured Cells and Biotechnology*, 229, Novosibirsk, (in Russian).
58. Ao G. M., Zhao S. X., Li G. H., (1982), *Acta Genet. Sinica*, 9, 281-283, (in Chinese).
59. Alatortseva T. A., Tyrnov V. S., (1992), *Abstracts of the 18<sup>th</sup> Eucarpia Congress*, 329-330, Malgogne, Angers.

60. Sato S., Katoh N., Yoshida H., Iwai S., Hagimori M., (2000), *Sci. Hortic.*, 83, 301-310.
61. Yang H. Y., Yan H., Zhou C., (1990), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Legumes and Oilseed Crops*, Ed. Bajaj Y. P. S., 10, 472-483, Springer, Berlin, Heidelberg.
62. Bossoutrot D., Hosemans D., (1985), *Plant Cell Rep.*, 4, 300-303.
63. San Noeum L. H., Ahmadi N., (1982), *Variability in Plants Regenerated from Tissue Culture*, Eds. Earle E. D., Demarly Y., 273-283, Praeger Publishers, New York.
64. Javornik B., Bohanec B., Campion B., (1998), *Plant Breed.*, 117, 275-278.