



Haploidyżacja roślin warzywnych

Barbara Michalik

Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa, Wydział Ogrodniczy,
Akademia Rolnicza, Kraków

Haploidization of vegetable crops

Summary

This review was prepared mainly on the basis of papers published after 1997. It describes the current knowledge on the use of gametic embryogenesis for haploid production in vegetable crops. Data on the results of research on androgenesis and gynogenesis are presented for different species, induction methods and factors affecting the efficiency of the processes.

Key words:

androgenesis, gynogenesis, haploid, cabbage, broccoli, brussels sprout, pepper, tomato, garden beet, onion, carrot.

1. Wprowadzenie

Otrzymywanie haploidów w kulturach *in vitro* jest nadal przedmiotem bardzo intensywnych badań naukowych, mimo że od czasu otrzymania po raz pierwszy zarodków w kulturach pylników *Datura innoxia* minęło już prawie 40 lat (20). U roślin warzywnych w celu otrzymywania form o haploidalnej liczbie chromosomów wykorzystuje się andro- lub gynogenezę. W procesie androgenezy dochodzi do rozwoju haploidalnego zarodka z mikrospery lub ziarna pyłku, w procesie gynogenezy rozwojowi ulega gametofit żeński w kulturach *in vitro* zalążków, zalążni lub kwiatów. Można go również stymulować zapylając kwiaty nieżywotnym pyłkiem uprzednio napromieniowanym lub pyłkiem innego gatunku (indukowana partenogeneza). Rozwijające się w haploidalne zarodki po przeniesieniu do kultury regenerują rośliny.

Adres do korespondencji

Barbara Michalik,
Katedra Genetyki, Hodowli
i Nasiennictwa,
Wydział Ogrodniczy
Akademii Rolniczej,
al. 29 Listopada 54,
31-425 Kraków;
e-mail:
romichal@cyf-kr.edu.pl

biotechnologia

1 (52) 73-80 2001

Zmiana drogi rozwoju niedojrzałych komórek o zredukowanej (n) liczbie chromosomów z gametofitycznej na sporofityczną jest pierwszym etapem prowadzącym do otrzymania haploidalnych zarodków. Kolejnym jest opracowanie warunków dla ich dalszego rozwoju w rośliny. Rośliny takie są zazwyczaj haploidami. Jeżeli nie zajdzie spontaniczne podwojenie genomu to konieczna jest diploidyzacja roślin, aby możliwe było uzyskanie potomnych nasion linii podwojonych haploidów (DH). Dla każdego z wymienionych etapów konieczne jest opracowanie właściwej metody postępowania z materiałem roślinnym, dostosowanej do specyfiki gatunku lub genotypu.

W dotychczasowych badaniach wykazano szereg prawidłowości, które występują przy haploidyzacji materiału roślinnego. Wydajność gametycznej embriogenezy w obrębie gatunku i typu użytkowego w bardzo dużym stopniu zależy od właściwości genetycznych roślin donorowych, warunków ich uprawy, składu pożywki, warunków prowadzenia kultury oraz optymalnego stadium rozwoju eksplantatu. Stadium to łatwiej określić pobierając do kultury pylniki. Dla indukcji androgenozy mikrospory powinny być w stadium późno jednojądrowym.

Dobór metody otrzymywania roślin haploidalnych w dużym stopniu zależy od przynależności systematycznej gatunku. Dobrze opracowana jest metodyka indukcji gametycznej embriogenezy u warzyw kapustnych, papryki, buraka, cebuli, ogórka i innych dyniowatych oraz papryki. W stadium eksperymentalnym są prace nad haploidami marchwi i pomidora. Nadal nie otrzymano haploidów u warzyw strączkowych (groch, fasola).

2. Rośliny kapustne

Wśród roślin dwuliściennych rodzaj *Brassica* można uznać za modelowy dla badań podstawowych i aplikacyjnych nad otrzymywaniem i wykorzystywaniem haploidów. Pierwsze rośliny haploidalne otrzymano już w roku 1975 (28). Najwięcej prac dotyczy rzepaku *Brassica napus* L., zarówno ze względu na jego znaczenie gospodarcze i możliwość wykorzystywania haploidów w procesie hodowli, jak też ze względu na znalezione wysoce embriogenne genotypy (np. odmiana Topas) bardzo przydatne do badań nad rozwojem zarodków z izolowanych mikrospor.

Aktualnie haploidy uzyskuje się w procesie androgenozy metodą kultur pylników lub izolowanych mikrospor. Pierwsza z wymienionych metod jest bardziej pracochłonna, ale pozwala uzyskać pozytywne wyniki u bardzo wielu genotypów. Druga, wymagająca lepiej wyposażonej pracowni, pozwala na znaczne ograniczenie robocizny przy zakładaniu kultury, eliminuje wpływ ścian pylnika, daje pewność, że wszystkie zarodki powstały z komórek o haploidalnej liczbie chromosomów, pozwala na śledzenie procesu podziałów komórkowych i rozwoju zarodków.

Wśród warzyw z gatunku *Brassica oleracea* pierwsze haploidy otrzymano w kapuście brukselskiej (45), a następnie w innych formach użytkowych jak brokuł, kapusta

głowiasta biała, znacznie później u kalafiora i kalarepy (56,57). W Polsce tematyka ta była przedmiotem prac prowadzonych w dwóch ośrodkach: Instytucie Warzywnictwa w Skierniewicach i Akademii Rolniczej w Krakowie. W pierwszym z wymienionych, u trzech odmian kapusty głowiastej białej (18) najwyższy plon zarodków średnio 6 szt./100 pylników w kulturze *in vitro* uzyskano w odmianie Kamienna Głowa, a najmniej 0,9 dały klony odmiany Sława z Enkhuizen. Otrzymane rośliny miały zróżnicowaną ploidalność, około 30% było haploidami, a 62% spontanicznymi diploidami. Linie podwojonych haploidów (DH) zostały wykorzystane do produkcji mieszańców F_1 . W ośrodku krakowskim indukowano androgenezę początkowo również w kulturach pylników, najwięcej zarodków otrzymano u kapusty brukselskiej, kolejno brokuła, a znacznie mniej u kapusty głowiastej białej (1). Dla zwiększenia efektywności procesu androgenazy modyfikowano skład pożywki, oraz warunki uprawy roślin donorowych. Od dwóch lat stosuje się również kultury izolowanych mikrospor. Opracowana metodyka została wdrożona w trzech polskich stacjach hodowlanych (POLAN Kraków, PlantiCo Zielonki, PHRO Krzeszowice), a otrzymywane linie DH są wykorzystywane w programach hodowlanych (27).

U roślin kapustnych, podobnie jak u innych gatunków, genotyp jest najważniejszym czynnikiem wpływającym na efektywność androgenazy. Prawidłowość ta jest potwierdzana przez wyniki z wielu ośrodków. Kultury mikrospor izolowanych z polskich genotypów wykazały, że u 4 odmian kapusty brukselskiej liczba zarodków na szalkę wynosiła od 0,4 do 2,4 szt., natomiast u kapusty głowiastej białej tylko od 0 do 0,8 w porównaniu do wysoce embriogenicznej odmiany Hawke dającej 28 zarodków na szalkę (2). Podobnie większą wydajność embriogenezy w kulturach mikrospor stwierdzono u brokuła i kapusty brukselskiej niż kapusty głowiastej (32).

W obrębie każdej formy użytkowej stwierdzone są też duże różnice między odmianami w zdolności do embriogenezy. W zależności od właściwości genetycznych obserwuje się odmiany odporne nie dające zarodków aż do wysoce wydajnych (61). Z tego względu nadal konieczne jest prowadzenie badań nad optymalizacją warunków indukcji rozwoju zarodków u dotychczas nie analizowanych genotypów, ważnych ze względu na prace selekcyjne. W tym celu stosuje się różne modyfikacje składu podstawowych pożywek B5 i NLN-13, np. poprzez dodanie azotanu srebra (10,52), aktywnego węgla (9,60), czy N-nitroso-N-metylomocznika (24).

Coraz popularniejszym na naszym rynku warzywem jest kapusta pekińska należąca do gatunku *Brassica campestris* L. Również w tym gatunku stwierdzono różnice odmianowe w zdolności formowania androgenicznych zarodków w kulturach mikrospor (30,31). W niektórych materiałach wydajność procesu i liczba otrzymywanych linii DH pozwoliła na ich zastosowanie w tworzeniu odmian syntetycznych lub mieszańcowych.

Wydajność androgenazy można podnieść poprzez krzyżowanie genotypów opornych z wysoce embriogenicznymi (49). Użyta w tym celu odmiana Hawke o średnim plonie zarodków 28,7 na szalkę krzyżowana z odmianą Varazdinsko (o plonie 0,1 zarodka) dała rośliny pokolenia F_1 z plonem w kulturach mikrospor od 19 aż do 64 zarodków na szalkę Petriego.

Rośliny z rodzaju *Brassica* zregenerowane z zarodków otrzymanych w kulturach pylników lub mikrospor stanowią populację o zróżnicowanym poziomie ploidalności (1,13,18). Porównując ploidalności regenerantów otrzymanych z kultur pylnikowych i mikrospor, prowadzonych równolegle dla tych samych 4 odmian brokuła wykazano, że większość roślin była diploidami, ale nieco większą zmienność w ploidalności stwierdzono wśród roślin otrzymanych z kultur pylnikowych (58).

Wykorzystanie roślin DH do badań genetycznych jest możliwe w przypadku braku różnic między gametami o różnym składzie genowym w zdolności do formowania zarodków i otrzymania wystarczająco dużej liczby androgenicznych roślin (55). Dlatego bardzo ważne jest opracowanie metodyki pozwalającej na regenerację roślin z jak największej liczby otrzymanych zarodków. U kapusty głowiastej zwiększoną częstotliwość regeneracji uzyskiwano po wysuszeniu zarodków, obniżeniu ich wilgotności od 80 do 12% (21).

3. Papryka

Rośliny haploidalne są otrzymywane już od 20 lat poprzez kultury pylników (12). Efektywność procesu androgenyzy może być modyfikowana warunkami termicznymi w czasie pierwszych dni prowadzenia kultury, składem pożywki itp. Nowo opracowane protokoły dla indukcji embriogenezy pozwoliły tak zwiększyć formowanie embrionów, że czynnikiem ograniczającym, jak się okazało, był proces dojrzewania i kiełkowania zarodków w rośliny (11,51). Linie DH znalazły już zastosowanie w produkcji odmian F_1 i hodowli odpornościowej (8).

4. Pomidor

Jest gatunkiem opornym na bezpośrednią indukcję gametycznych zarodków, natomiast powiodły się próby otrzymania roślin poprzez organogenezę w tkance kalusowej, rozwijającej się na pylnikach umieszczonych w kulturach na pożywce Murashige i Skoog'a (MS) z różnym dodatkiem regulatorów wzrostu. W opublikowanych ostatnio wynikach prac wykonanych w Instytucie Genetyki Bułgarskiej Akademii Nauk wykazano, że zdolność do formowania kalusa jest przede wszystkim zależna od obecności w genotypie roślin donorowych recesywnego genu *ms 10³⁵* warunkującego męską sterility roślin pomidora. Również liczba regenerujących roślin z kalusa była wyższa w przypadku roślin homozygotycznie recesywnych pod względem allelu *ms*. Wśród regenerantów stwierdzono występowanie części roślin haploidalnych (50,59). Podobną prawidłowość w rozwoju kalusa na pylnikach sterylnych mutantów pomidora wykazał zespół badaczy japońskich (33), ale nie podano czy z kalusa zregenerowano rośliny.

5. Burak ćwikłowy

Należy do tego samego gatunku *Beta vulgaris* L. jak inne formy uprawne: burak cukrowy, pastewny i liściowy. Prace nad otrzymywaniem form haploidalnych dotyczyły głównie buraka cukrowego, a pierwsze rośliny udało się uzyskać w roku 1983 w kulturach *in vitro* zalążków pobieranych z zamkniętych pąków kwiatowych (22). Przez kolejne 10 lat prowadzono prace nad zwiększeniem ilości rozwijających się zalążków poprzez modyfikowanie składu stosowanych pożywek i warunków kultury (17). Dotyczyły one prawie wyłącznie różnych odmian i materiałów hodowlanych buraka cukrowego.

Pierwsze rośliny haploidalne buraka ćwikłowego zostały otrzymane w wyniku gynogenezy w Akademii Rolniczej w Krakowie (4). Podobnie jak u innych form uprawnych buraka, procent rozwijających zalążków izolowanych z 15 różnych genotypów wahał się od 0 do 12%, w zależności od warunków w jakich kwitły rośliny oraz sposobu prowadzenia kultury. Obserwowano zarówno bezpośrednią embriogenezę jak też znacznie częściej pośrednią poprzez kalus.

6. Cebula (*Allium cepa* L.)

Dziesięć lat badań nad otrzymaniem haploidów w różnych krajach (29,39), w tym również pięć lat prac prowadzonych w Akademii Rolniczej w Krakowie (37) zaowocowało opracowaniem optymalnych warunków dla procesu gynogenezy w kulturze *in vitro* pąków kwiatowych różnych odmian cebuli. Liczba niezapłodnionych zalążków formujących zarodki, a następnie rośliny zależy przede wszystkim od właściwości genetycznych użytego materiału. Liczba zarodków otrzymanych ze 100 pąków w kulturze przeważnie nie przekracza 8%, ale może się wahać od 0 nawet do 118 szt., przy indukcji gynogenezy w liniach DH otrzymanych z obiektów o wysokim poziomie zarodków (23). Odmiany cebuli pochodzenia amerykańskiego mają na ogół wyższą zdolność do formowania haploidalnych roślin od zachodnioeuropejskich, a te nieznacznie wyższą niż odmiany z Europy Centralnej (5,16,25).

Efektywność gynogenezy można podwyższać u opornych genotypów stosując dla kwitnących roślin donorowych stałą temperaturę 14-15°C i optymalną dla nich pożywkę (38,48). Otrzymane regeneranty są w 70-90% haploidami, stąd konieczność ich diploidyzacji. Najczęściej w tym celu stosowana jest kolchicina (6,16). Podobnie jak u innych gatunków roślin, krzyżowanie genotypów o wysokiej zdolności do tworzenia haploidalnych zarodków z opornymi pozwala otrzymać rośliny o genetycznej predyspozycji do embriogenezy w kulturach pąków kwiatowych.

Poważnym utrudnieniem w przypadku cebuli jest długi okres od założenia kultury do otrzymania kwitnących roślin i nasion linii DH, często wynoszący trzy lata. W Polsce homozygotyczne linie DH są już włączane w programy hodowlane, zastępując długotrwały chów wsobny, stosowany dotychczas w celu otrzymania wyrównanych linii rodzicielskich potrzebnych dla tworzenia odmian mieszańcowych.

7. Rośliny dyniowate

We Francji już z końcem lat osiemdziesiątych poprzez indukcję partenogenezy otrzymano zarodki i rośliny haploidalne ogórka (*Cucumis sativus* L.) i melona (*Cucumis melo* L.) (53). Metoda ta z różnymi modyfikacjami jest stosowana w Polsce przez zespół Niemirowicz-Szczytt oraz w innych krajach (7,47). Jako czynnik indukujący rozwój komórki jajowej używany jest pyłek uprzednio uszkodzony promieniami gamma w dawce około 300 Gy, którym zapyla się rośliny. Około połowa zapylanych kwiatów może dawać owoce, a część rozwijających się w nich nasion zawiera tworzące się zarodki. Po około trzydziestu dniach od zapylenia kwiatów trzeba izolować zarodki z nasion i przenosić do warunków kultury *in vitro* na właściwą pożywkę, aby mogły rozwijać się w rośliny. Rośliny takie są prawie w 100% haploidami. Mogą one być utrzymywane w kulturach *in vitro* (42) lub służyć do produkcji linii DH po podwojeniu genomu (43,44). Opisana metoda otrzymywania haploidalnych roślin ogórka jest wdrażana w kilku firmach hodowlano-nasiennych w Polsce.

W przypadku innych gatunków z rodziny dyniowatych haploidy uzyskuje się również w kulturze niezapłodnionych zalążni, pobieranych na dzień przed otwarciem kwiatów i umieszczanych na pożywce. Metoda ta była bardziej wydajna u dyni zwyczajnej *Cucurbita pepo* niż u melona *C. melo*. Wśród regenerantów 70% było haploidami, a pozostałe diploidami lub aneuploidami (26). Otrzymane podobną metodą regeneranty u odmiany Eskandavari (*C. pepo*) były w 57% diploidami (36). Zastosowanie kultur pylników u tej odmiany zakończyło się także sukcesem, przy czym rozwój następował poprzez fazę kalusa. Regenerujące z niego rośliny (20 szt.) były w połowie haploidalne (35).

8. Marchew

Mimo bardzo wielu prac prowadzonych od ponad pięćdziesięciu lat nad kulturami *in vitro* tkanek i komórek *Daucus carota* L. i opracowania bardzo wydajnych metod dla somatycznej embriogenezy, gatunek ten, jak się okazało, był stosunkowo oporny na indukcję gametogenezy. Prace badawcze były dotychczas prowadzone w kilku ośrodkach, lecz do rozwoju haploidalnych komórek dochodziło tylko sporadycznie. Andersen ze współpracownikami którzy w latach osiemdziesiątych prowadzili kultury pylników marchwi, otrzymywali po 2-4 miesiącach albo pojedyncze zarodki kiełkujące w rośliny albo kalus. W wyniku 3 lat badań ogółem oceniono ploidalność 88 klonów, wśród których stwierdzono 15 klonów z wyłącznie haploidalnymi roślinami, 62 klony roślin diploidalnych i 12 klonów tetra- lub mikrosploidalnych (3).

Matsubara i Murakami w kulturach pylników także otrzymali zarodki lub kalus, z których zregenerowało 18 roślin (16 haploidów i 2 aneuploidy) (34).

Tjukavin i Shmykova w kulturach pąków kwiatowych marchwi obserwowali rozwój niezapłodnionych zalążków oraz pojawianie się zarodków na pylnikach. Nie po-

dali jednak jaka była liczba chromosomów otrzymanych roślin (54). W Polsce badania nad indukcją androgenezy są prowadzone w Instytucie Warzywnictwa w Skiernewicach (19).

9. Podsumowanie

W przeglądzie tym zawarte są tylko wyniki opublikowanych prac. Powszechnie wiadomo natomiast, że wiele badań prowadzonych w ośrodkach naukowych na zlecenie kontrahenta jest utajnionych na kilka lat, podobnie jak rezultaty prac prywatnych firm biotechnologicznych.

Znaczenie i zastosowanie roślin haploidalnych zostało omówione przez Niemirowicz-Szczytt (40,41) z tego względu pragnę jedynie podkreślić, że w badaniach genetycznych można wykorzystać populację roślin otrzymanych w wyniku gametycznej embriogenezy wtedy, jeżeli rzeczywiście jest reprezentatywna dla gamet z których powstała. W przeprowadzonej analizie segregacji cech wśród roślin DH u szeregu gatunków, np. brokuła (46), rzepaku (15) i papryki (11) wykazano, że odbiegają one od przewidywanych. Przeważają rośliny o właściwościach zbliżonych do jednego z rodziców.

Nieco inaczej przedstawia się sytuacja w pracach hodowlanych, gdzie nawet mała liczba roślin DH może zastąpić długotrwały proces homozygotyzacji materiału. Wartość uzyskanych linii może być bardzo różna, wymaga zatem sprawdzenia przez hodowcę (14).

Literatura

1. Adamus A., (1998), Zeszyty Naukowe AR, Kraków, rozprawy, z. 237.
2. Adamus A., Samek L., (1999), Abstracts of: *Gametic embryogenesis in dicots*, COST 824 WG2, Meeting, Kraków, 10-11.
3. Andersen S. B., Christiansen J., Farestveit B., (1990), *Haploids in Crop Improvement*, Ed. Bajaj Y. P. S., 393-402, Springer-Verlag, Berlin.
4. Barański R., (1996), *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 65, 57-60.
5. Bohanec B., Jakše M., (1999), *Plant Cell Reports*, 18, 737-742.
6. Campion B., Perri E., Azzimonti M. T., Vicini E., Schiavi M., (1995), *Plant Breeding*, 114, 243-246.
7. Caglar G., Abak K., Buyukalaca S., (1999), *Acta Horticulturae*, 492, 317-322.
8. Damasso A., Abad P., (1999), *Theor. Appl. Genet.*, 99, 496-502.
9. Dias-JC-da; da-Silva-Dias-JC., (1999), *Euphytica*, 108, 65-69.
10. Dias-JC., Martins M. G., (1999), *Scientia Horticulturae*, 82, 299-307.
11. Dolcet-Sanjuan R., Claveria E., Huerta A., (1997), *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 122, 468-475.
12. Dumas de Vaulx R., Chambonnet D., Pochard E., (1981), *Agronomie*, 1, 859-863.
13. Farnham M. W., (1998), *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 123, 73-77.
14. Friesen H., Scarth R., (2000), *Can. J. Plant Sci.*, 80, 75-82.
15. Foisset N., Delourne R., Lucas M. O., (1993), *Plant Cell Reports*, 16, 464-468.
16. Geoffriau E., Kahane R., Rancillac M., (1997), *Euphytica*, 94, 37-44.
17. Goška M., (1997), *Monografie i rozprawy naukowe, IHAR*, 2, 4-81.

18. Górecka K., (1998), I. W. Skierniewice, praca habilitacyjna, 14.
19. Górecka K., (1999), Materiały VIII Zjazdu Naukowego Lublin, 193-195.
20. Guha S., Maheshwari S. C., (1964), Nature, 204, 497.
21. Hansen M., (2000), J. Plant Physiology, 156, 164-167.
22. Hosemans D., Bossoutrot D., (1983), Z. Pflanzenzuchtg, 91, 74-77.
23. Javornik B., Bohanec B., Campion B., (1998), Plant Breeding, 117, 275-278.
24. Jeong H. W., Lee S. S., (1997), J. Korean Society Hort. Sci., 38, 379-383.
25. Juhasz A. G., Martinovich L., (1998), Zoldsegetermesztes Kutato Intezet Bulletinje, 28, 39-45.
26. Juhasz A. G., Venczel G., Balogh P., Altman A., Ziv M., (1997), Acta Horticulturae, 447, 623-624.
27. Kaczmarek B., Róg L., Rutkowska W., Żukowska E., Adamus A., (1999), Abstracts of: *Gametic embryogenesis in dicots*, COST 824 WG2, Meeting, Kraków, 12-13.
28. Keller W. A., Rajhathy T., Lacapra J., (1975), Can. J. Bot., 66, 1658-1664.
29. Keller R. E. J., Korzun L., (1996), *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*, Eds. Jain S. M., Sopory S. K., Veilleux R. E., Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 3, 51-75.
30. Kim Y. H., Lee S. S., (1997), Korean Soc. Hort. Sci., 38, 368-371.
31. Kuginuki Y., Nakamura K., Hida K. I., Yosikawa H., (1997), Breeding-Science, 47, 341-346.
32. Kuginuki Y., Miyajima T., Masuda H., Hida K., Hirai M., (1999), Breeding Science, 49, 251-256.
33. Ma Y. H., Kato K., Masuda M., (1999), Japanese Soc. Hort. Sci., 68, 768-773.
34. Matsubara S., Murakami K., (1993), Japanese Soc. Hort. Sci., 63, 561-565.
35. Metwally E. I., Moustafa S. A., El Sawy B. I., Shalaby T. A., (1998), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 52, 171-176.
36. Metwally E. I., Moustafa S. A., El Sawy B. I., Haroun S. A., Shalaby T. A., (1998), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 52, 117-121.
37. Michalik B., Adamus A., Nowak E., (2000), J. Plant Physiol., 156, 211-216.
38. Michalik B., Adamus A., Samek I., Nowak E., (2000), Abstracts of: Biotechnological approaches for utilization of gametic cell, COST 824 meeting, Bled (Slovenia): 28.
39. Muren R. C., (1999), HortScience, 24, 833-834.
40. Niemirowicz-Szczytt K., (1995), Kosmos, 44, 703-708.
41. Niemirowicz-Szczytt K., (1997), Acta Physiologiae Plantarum, 19, 155-167.
42. Niemirowicz-Szczytt K., Faris N. M., Rucińska M., Nikolova V., (2000), Plant Cell Reports, 19, 311-314.
43. Nikolova V., Niemirowicz-Szczytt K., (1995), Caryologia, 48, 275-283.
44. Nikolova V., Niemirowicz-Szczytt K., (1996), Acta Soc. Botanicorum Poloniae, 65, 311-317.
45. Ockendon D. J., (1984), Ann. Appl. Biol., 105, 285-291.
46. Orton T. J., Browers M. A., (1985), Theor. Appl. Genet., 69, 637-643.
47. Przyborowski J., Niemirowicz-Szczytt K., (1994), Plant Breeding, 112, 70-75.
48. Puddephat I. J., Robinson H. T., Smith B. M., Lynn J., (1999), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 57, 145-148.
49. Rudolf K., Bohanec B., Hansen N., (1999), Plant-Breeding, 118, 237-241.
50. Shtereva L. A., Zagorska N. A., Dimitrov B. D., Kruleva M. M., Oanh H. K., (1998), Plant Cell Reports, 18, 312-317.
51. Steinitz B., Wolf D., Matzevitch J. T., Zelcer A., (1999), Capsicum and Eggplant Newsletter, 18, 9-15.
52. Stipic M., Campion B., (1997), Plant-Breeding, 116, 153-157.
53. Sauton A., Dumas de Vaulx R., (1987), Agronomie, 7, 141-148.
54. Tjukavin G. B., Shmykova N. A., (1998), Abstracts of IX Int. Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Jerusalem, 122.
55. Voorrips R. E., Jongerius M. C., Kanne H. J., (1997), Theor. Appl. Genet., 94, 75-82.
56. Vyvadiłova M., Kucera V., Tomaskova D., (1998), Zahradnictvi, 25, 9-14.
57. Vyvadiłova M. Klima M., Kucera V., (1998), Zahradnictvi, 25, 137-144.
58. Wang M., Farnham M. W., Nannes J. S. P., (1999), Plant Breeding, 118, 249-252.
59. Zagorska N. A., Shtereva A., Dimitrov B. D., Kruleva M. M., (1998), Plant Cell Reports, 17, 968-973.
60. Zhang D. S., Cao M. Q., Qin Z. W., (1998), Cruciferae Newsletter, 20, 45-46.
61. Zhang D. S., Cao M. Q., Qin Z. W., (1998), Acta Agriculturae Boreali Sinica, 13, 102-106.