



Mikrorozmnażanie *Miscanthus x giganteus* (Greef i Deu.) z eksplantatów kwiatowych

Katarzyna Głowacka¹, Maciej Zenkteler¹, Stanisław Jeżowski²

¹Zakład Botaniki Ogólnej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

²Instytut Genetyki Roślin, Polska Akademia Nauk, Poznań

Micropropagation of *Miscanthus x giganteus* (Greef & Deu.) from inflorescence explants

Summary

2 mm explants of immature inflorescences (0,5-3 cm) produced calluses on MS medium with 0,5 mg \times l⁻¹ BAP and 2,5 mg \times l⁻¹ 2,4-D. The surface sterilization in 10% sodium hypochloride for 20 min was successful in 74%. After 20 days of incubation, the surfaces of all explants were covered by callus. After 2 months of culture, from most of calluses embryo-like structures developed. The highest frequency of fully regenerated plants was observed on MS medium supplemented with 1-2 mg \times l⁻¹ BAP. The regeneration rate of the cultured calluses for the first two weeks in 16 h day fotoperiod was twice as high as the one under a continuous light. Only two out of 6 thousand cultured mature spikelets produced calluses from which 574 plants were obtained after multiplication. Most of the plants obtained from the explants representing immature as mature inflorescences survived the transfer into soil in the greenhouses.

Key words:

micropropagation, *Miscanthus x giganteus*, inflorescence explants.

Adres do korespondencji

Katarzyna Głowacka,
Instytut Genetyki Roślin,
Polska Akademia Nauk,
ul. Strzeszyńska 34,
60-479 Poznań.

biotechnologia

2 (65) 251-259 2004

1. Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się znaczny wzrost zainteresowania alternatywnymi metodami pozyskiwania energii. Zainteresowanie to dotyczy zwłaszcza szybko rosnących traw trzcinowatych takich jak *Miscanthus x giganteus*, *Miscanthus sinensis*, *Spartina pectinata* czy *Arundo donax*. Gatunki te, należące do roślin szlaku

C-4, charakteryzują się wydajną fotosyntezą czego konsekwencją jest duży przyrost biomasy w jednostce czasu na powierzchnię asymilacyjną (1). *Miscanthus x giganteus* sadzony w rozstawie 3 rośliny na m² produkuje w ciągu roku 15-25 ton suchej masy z 1 hektara. Wydajność biomasy można zwiększyć poprzez stosunkowo proste zabiegi uprawowe. Ważną cechą tego gatunku jest jego przydatność do uprawy na glebach piątej i szóstej klasy, a także na nieużytkach. Plantacje mogą być eksploatowane przez 15-20 lat, nie wymagając dodatkowego nawożenia (2). *Miscanthus* niezwykle wydajnie wykorzystuje światło, wodę i azot, dlatego zyski ze zbiorów przewyższają nakłady finansowe potrzebne do utrzymywania założonej plantacji. W związku z tym powstają projekty zastosowania *Miscanthus* w różnych dziedzinach gospodarki, np. Europejski Projekt Ulepszenia *Miscanthus* (EMI), Europejska Sieć Produktywności *Miscanthus* (The European *Miscanthus* Productivity Network) (3).

Miscanthus x giganteus jako allotriploid jest wysoce sterylny (4) i dlatego nie rozmnaża się przez nasiona. Natomiast roślinę tę rozmnaża się wegetatywnie poprzez podział kłaczy, jednak mikrorozmnażanie oferuje najwyższy współczynnik namnażania (5).

Prace eksperymentalne nad mikrorozmnażaniem gatunków z rodzaju *Miscanthus* są prowadzone w wielu europejskich uniwersytetach, np. Rolniczy Uniwersytet w Wageningen (Holandia), Uniwersytet w Kopenhadze, Królewski Uniwersytet Weterynarii i Rolnictwa w Frederikberg (Dania) czy też Uniwersytet Nauk Rolniczych w Debrecen (Węgry) (2).

W dotychczasowych badaniach nad rozmnażaniem *M. x giganteus* w kulturach *in vitro* jako eksplantatów użyto fragmentów zawiązków kwiatostanów (5-8), węzłów (8,19), apikalnych merystemów (5-8,10), liści (5-8) oraz korzeni (7). Fragmenty nie w pełni rozwiniętych kwiatostanów stanowią jeden z najlepszych eksplantatów inicjalnych dla mikropropagacji przez embriogeny kalus (7,8,11).

Celem podjętych badań było opracowanie optymalnych warunków dla mikrorozmnażania *Miscanthus x giganteus* z eksplantatów kwiatowych.

2. Materiały i metody

Do doświadczeń użyto fragmenty zawiązków kwiatostanów oraz w pełni wykształcone kłoski. Materiał pobierano z dziewięcioletniej plantacji znajdującej się na poletkach doświadczalnych i w szklarniach Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Badania wykonano od lipca 2001 do grudnia 2002 r.

Przed sterylizacją, z kwiatostanów usunięto 2-3 zewnętrzne warstwy pochwy liściowej. Materiał sterylizowano w 70% alkoholu etylowym, 10% podchlorynie sodu lub/i wodzie chlorowej, po czym trzykrotnie przepłukiwano sterylną wodą destylowaną. Najskuteczniejszą metodą sterylizacji powierzchniowej (74% odkażonych eksplantatów) było zanurzenie kwiatostanów w 10% podchlorynie sodu na 20 minut.

Odkażane eksplantaty wykładano na pożywkę Murashige i Skooga MS, (12) z dodatkiem czterech różnych kombinacji auksyn, cytokinin oraz cysteiny. Kwasowość pożyw-

ki wahała się w granicach 5,7-5,75. Pożywki zestalono 0,8% agarom oraz uzupełniano sacharozą o stężeniu 3% i regulatorami wzrostu. Pożywki sterylizowano w autoklawie w warunkach: czas – 20 min, temperatura – 121°C, ciśnienie – 0,8 atmosfery.

Kultury prowadzono w pokoju hodowlanym w temperaturze $25 \pm 2^\circ\text{C}$ przy względnej wilgotności 70-80%. Indukcję i poliferyację tkanki kalusowej stymulowano w ciemności, natomiast regenerację roślin w warunkach światła ciągłego, o intensywności $40 \mu\text{mol} \times 1\text{cm}^2 \times \text{s}^{-1}$ lub w fotoperiodzie (16 h) przy świetle o intensywności $30 \mu\text{mol} \times 1\text{cm}^2 \times \text{s}^{-1}$.

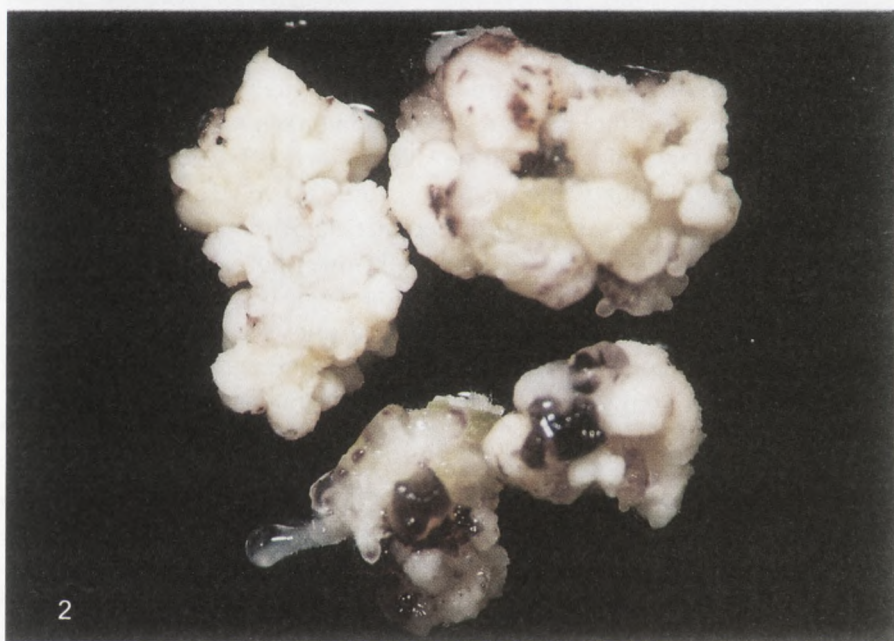
3. Wyniki

3.1. Kultury *in vitro* zawiązków kwiatostanów *Miscanthus x giganteus*

Fragmenty (0,5-2 mm) osi pojedynczych zawiązków kwiatostanów, wykładano na pożywkę MS o zróżnicowanych stężeniach regulatorów wzrostu. Eksplantaty powiększały się po 6 dniach od wyłożenia na pożywkę MS z dodatkiem $0,5 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ BAP i $2,5 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ 2,4-D. Po dwudziestu dniach na powierzchni wszystkich eksplantatów były widoczne mlecznobiałe agregaty uwodnionego kalusa (fot. 1). Im mniejszy był eksplantat tym wolniej rozwijał się kalus. Chociaż eksplantaty wydzielaly do pożywki ciemniejące eksudaty, nie miało to istotnego wpływu na dalszy przebieg kultur. Dodanie węgla aktywowanego przeciwdziało brunatnieniu pożywki oraz stymulowało wytwarzanie korzeni z tkanki kalusowej po ok. 20 dniach.

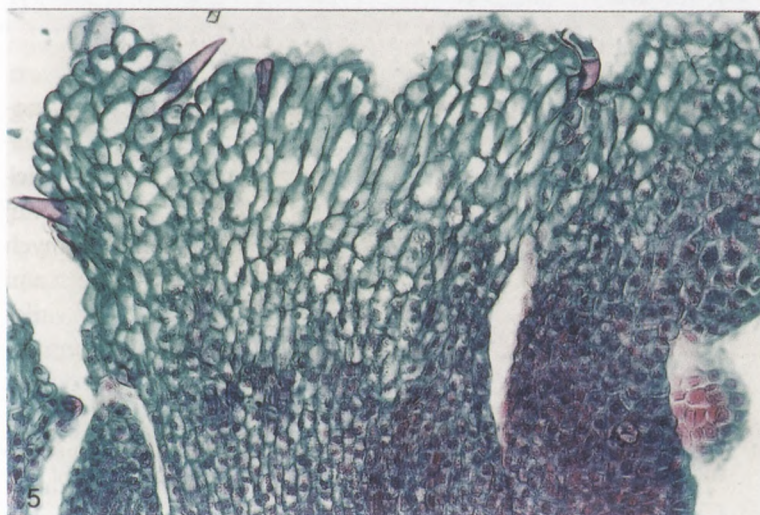
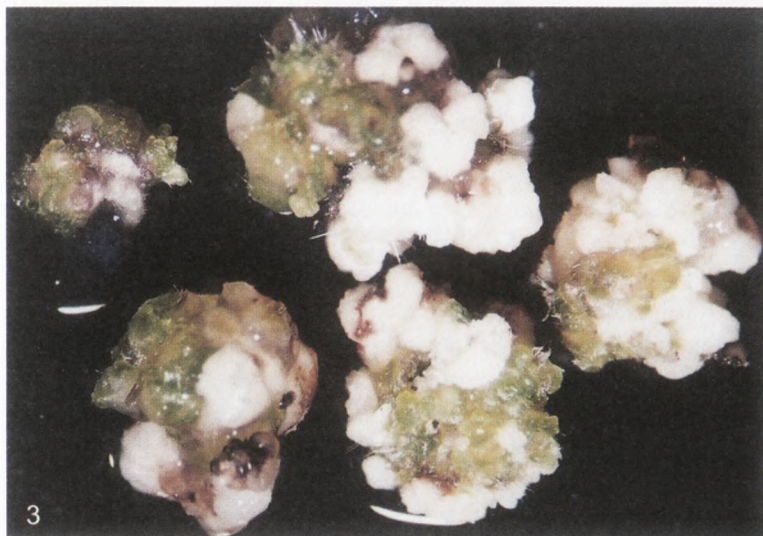
Podczas dalszych dni kultury agregaty kalusa powiększały się. Kalus żółtawego koloru był zwarty. Przedwczesne (ok. 20 dni od rozpoczęcia eksperymentu) oddzielenie tkanki kalusowej od eksplantatów inicjalnych i umieszczenie jej na świetle, na jednej z regeneracyjnych pożywek, powodowało regenerację jedynie korzeni i nielicznych zawiązków pąków.

Na powierzchni tkanki kalusowej hodowanej w ciemności na pożywce MS z $0,5 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ BAP i $2,5 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ 2,4-D po ok. 2 miesiącach pojawiały się struktury embrioidalne, a także nieliczne pąki przybyszowe i zawiązki korzeni (fot. 2). Jasnozielone embrioidy, pokryte licznymi włoskami, po 9 dniach ekspozycji na świetle przybierały ciemnozielony kolor (fot. 3). W kolejnych dniach dalsze struktury embrioidalne pokrywały całą powierzchnię kalusa. Obrazy te stwierdzono na pożywce podstawowej MS z dodatkiem $2,5 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ 2,4-D i $0,5 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ BAP i na pożywkach regeneracyjnych MS z dodatkiem 0,1 lub 2 $\text{mg} \times \text{l}^{-1}$ BAP oraz MS z dodatkiem $0,1 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ BAP i $50 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ cysteiny. Struktury przypominające zawiązki liści pojawiały się już po 11 dniach od przeniesienia kalusa z ciemności na światło. Z jednej grudki kalusa o średnicy 2-4 mm po miesięcznej kulturze na pożywce regeneracyjnej rozwijało się od 6 do 13 roślin różnej wielkości (fot. 4). Na pożywce MS z dodatkiem $0,1 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ BAP i $50 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ cysteiny w kalusie regenerowały liczne korzenie.



Fot. 1. Tkanka kalusowa poliferująca z zawiązka kwiatowego *Miscanthus x giganteus* po 23 dniach od wyłożenia na pożywkę MS z dodatkiem $0,5 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ BAP i $2,5 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ 2,4-D (pow. $\times 18,5$).

Fot. 2. Kultury embriogennej tkanki kalusowej *Miscanthus x giganteus* uzyskane w ciemności po 2,5 miesiąca (pow. $\times 18,5$).



Fot. 3. Struktury embrioidalne w kalusie regenerującym z zawiązków kwiatostanów po 9 dniach kultury na świetle. Pożywka MS z dodatkiem $0,5 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ BAP i $2,5 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ 2,4-D (pow. $\times 18,5$).

Fot. 4. Regeneracja roślin po miesiącu od pasażu tkanki kalusowej na pożywkę MS z dodatkiem $1 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ BAP.

Fot. 5. Struktury zarodkopodobne regenerujące po 2 miesiącach kultury *Miscanthus x giganteus* (przekrój podłużny, pow. $\times 175$).

Natomiast na pożywce MS z dodatkiem $2 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ BAP, część wykształconych pędów nie tworzyła systemu korzeniowego. Dla ukorzenia roślin zastosowano pożywkę MS z dodatkiem $2 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ IAA; $2 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ IBA lub $2 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ NAA. Całkowita regeneracja roślin z zawiązków kwiatostanów trwała od 2,5 do 3,5 miesiąca. W pełni wykształcone rośliny o wysokości 3-5 cm przenoszono do doniczek z ziemią. Większość zregenerowanych roślin przekazano do dalszych badań w Instytucie Genetyki Roślin PAN w Poznaniu.

W przeprowadzonej analizie anatomicznej kalusujących zawiązków kwiatostanów wykazano, że indukcja kalusa zachodziła w miększym osi zawiązka. W części peryferycznej trzytygodniowej tkanki kalusowej obserwowano szeroki pas komórek merystematycznych, a w głębiej położonych warstwach stwierdzono elementy przewodzące, często pozostające w połączeniu z wiązkami przewodzącymi eksplantatu. Struktury zarodkopodobne obserwowane na powierzchni kalusa po ok. 2 miesiącach od rozpoczęcia kultur zbudowane były z wydłużonych, silnie zwakuolizowanych komórek z ziarnami skrobi (fot. 5). Z tkanki kalusowej regenerowały również liczne struktury, które we wczesnej fazie rozwoju przypominały pąki pędowe lub korzenie.

3.2. Kultury *in vitro* dojrzałych kłosek *Miscanthus x giganteus*

Pojedyncze kłosi wyizolowane z dojrzałych kwiatostanów (zamkniętych w pochwach liściowych) regenerowały słabiej w porównaniu do eksplantatów izolowanych z zawiązków kwiatostanowych. Po miesięcznej kulturze na pożywce MS z dodatkiem $2,5 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ 2,4D i $0,5 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ BAP oraz na pożywce MS wzbogaconej w $6 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ 2,4-D, $6 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ 2,4,5,-T i $0,5 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ BAP z 6 tysięcy izolowanych eksplantatów tylko 2 eksplantaty kalusowały. Nieprzeźroczysty, biały lub miejscami lekko żółty, grudkowaty kalus bardzo dobrze proliferował w ciemności. Po trzymiesięcznym namnażaniu wyróżniono cztery typy tkanki kalusowej: ryzogenną, embrioidalną, morfogenną i niemorfogenną. Kalus namnażano przez rok, przeprowadzając 3 pasáže po trzech; jednym oraz półtora miesiąca.

Regenerację roślin uzyskano na pożywce MS o zróżnicowanych dodatkach regulatorów wzrostu. Do każdej probówki wkładano 4-6 grudek kalusa o średnicy 3-5 mm. Pożywka MS wzbogacona w $0,1 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ BAP oraz $50 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ cysteiny w znacznym stopniu indukowała regenerację korzeni. Zawiązki pędów pojawiły się w kalusie po około 10 dniach w 40% kultur. Na pożywce o zwiększonej dawce BAP, tj. $2 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ (bez dodatku cysteiny) regenerowało 70% roślin. W ciągu półrocznej regeneracji z namnożonego kalusa otrzymanego z dwóch kłosek, uzyskano 574 rośliny.

W badaniach wykazano, że zastosowanie fotoperiodu (16 h) wpłynęło bardzo korzystnie na przebieg regeneracji roślin z kalusa. Już po upływie 2 tygodni doświetlania kultur – 100% kalusów regenerowało pędy.

Po przeprowadzonej analizie anatomicznej kalusujących kłosek wykazano, że kalus poliferował z dna kwiatowego.

4. Dyskusja

Metoda mikrorozmnażania w szkle umożliwia namnażanie roślin niezależnie od sezonu wegetacyjnego, a także otrzymanie z jednego eksplantatu dużej liczby roślin.

W pracy tej próbowano rozmnożyć w warunkach *in vitro* *Miscanthus x giganteus*. Do tego celu wykorzystano zawiązki kwiatostanów oraz dojrzałe kłoski. Porównanie zdolności regeneracyjnej obu typów eksplantatów pokazało jak ważny jest wybór obiektu i organu przeznaczonego do rozmnażania w warunkach *in vitro*. Wyższą zdolność do odtworzenia całego organizmu posiadają komórki młodych organów (13). Embriogeny kalus z łatwością powstaje z zawiązków kwiatostanów, niedojrzałych zarodków, młodych liści, pąków szczytowych i stożków wzrostu korzeni (14). Różne typy eksplantatów pochodzących z roślin o tym samym genotypie wykazują często odmienne zdolności do tworzenia tkanki kalusowej i regeneracji roślin (15).

Zawiązki kwiatostanów *Miscanthus x giganteus*, podobnie do innych gatunków traw np. *Triticum aestivum* × *Leymus angustus* (15), *Sorghum bicolor* (16), najlepiej regenerowały kalus. Duża potencja regeneracyjna zawiązków kwiatostanów jest spowodowana obecnością merystematycznych komórek w rejonach rozwijających się kwiatostanów (17). Współczynnik indukcji kalusa i regeneracji roślin był najwyższy i z jednego pociętego zawiązku kwiatostanu otrzymywano aż do 280 eksplantatów.

We wcześniejszych badaniach nad mikropropagacją *Miscanthus x giganteus* stwierdzono, że fragmenty o długości 0,1-2 mm kwiatostanów tworzą niewiele embriogenego kalusa w przeciwieństwie do większych fragmentów (11). Z zawiązków kwiatostanów o długości od 2,5 do 8 mm ciętych na fragmenty 1-2 mm uzyskiwano najwięcej embriogenego kalusa. Kalus otrzymany z zawiązków kwiatostanów wykazywał największe zdolności do wytwarzania roślin, gdyż charakteryzował się luźną strukturą w przeciwieństwie do zwartego kalusa otrzymanego z innych rodzajów eksplantatów. Zwarta struktura była czynnikiem nie sprzyjającym różnicowaniu się zarodków somatycznych (7).

W badaniach własnych uzyskano wyniki podobne do osiągnięć Lewandowskiej (8), Petersen, Hansen i Krogstrup (11), Holme i Petersen (7). Fragmenty (0,5-2 mm) zawiązków kwiatostanów *M. x giganteus* o długości pomiędzy 0,5-3 cm były najaktywniejszymi eksplantatami, regenerującymi kalus z miękiszu osi zawiązków kwiatostanów.

Kalus słabiej proliferowały kłoski z w pełni rozwiniętych, ale zamkniętych w pochwach kwiatostanów *Miscanthus x giganteus*. Na 6 tysięcy izolatów regenerowały tylko 2 kłoski. Stwierdzono, że elementami, z których w tym przypadku poliferował

kalus były słupki i pręciki oraz dno kwiatowe. Tak niską zdolność regeneracji kalusa otrzymaną dla kłosek można tłumaczyć zbyt dużą dojrzałością wykładanych tkanek. Z danych literaturowych (8) wynika, że najodpowiedniejszym podłożem dla mikropropagacji *Miscanthus x giganteus* jest pożywka MS i J25-8.

Na kultury embriogenego kalusa wielu gatunków traw duży wpływ wywiera dodanie do pożywek regulatorów wzrostu, węglowodanów i aminokwasów (18,19). Prolina wprowadzona do kultur zwiększała wytwarzanie kalusa kukurydzy (20) podobnie jak w przypadku *Miscanthus x giganteus* (6). Dodanie do pożywki prolina (12,5-25 μM) wraz z wysoką dawką 2,4-D (22,6 μM) zabezpieczało eksplantaty przed ciemieniem. Natomiast cysteina w ilości 50 $\text{mg} \times \text{l}^{-1}$ zmniejszała wydzielanie przez eksplantat ciemnych eksudatów (8).

W badaniach własnych dodanie do pożywek 50 $\text{mg} \times \text{l}^{-1}$ cysteiny zmniejszało w nieznanym stopniu ich brązowienie. Z obserwacji wynika, że dyfundujące do pożywki eksudaty nie hamowały rozwoju kultur zawiązków kwiatostanów oraz kłosek *Miscanthus x giganteus*.

Porównując kombinację regulatorów wzrostu: 2,4-D z BAP i 2,4,5-T z kinetyną na powstawanie embriogenego kalusa wykazano bardziej stymulujące działanie niż kombinacja 2,4-D z kinetyną i 2,4-D z zeatyną (21). Z kolei optymalnymi stężeniami regulatorów wzrostu dla regeneracji kalusa z eksplantatów było 4-8 $\text{mg} \times \text{l}^{-1}$ 2,4-D z 0,5-2 $\text{mg} \times \text{l}^{-1}$ BAP oraz 4-8 $\text{mg} \times \text{l}^{-1}$ 2,4,5-T z 2 $\text{mg} \times \text{l}^{-1}$ kinetyny (8). Podobnie Walsh i McCarthy zastosowali pożywkę MS wzbogaconą 2,5 $\text{mg} \times \text{l}^{-1}$ 2,4-D i 0,5 $\text{mg} \times \text{l}^{-1}$ BAP (5).

Podobnie jak w wynikach Lewandowskiej (8) embriogeny kalus najobficiej powstawał z zawiązków kwiatostanów *M. x giganteus* na pożywce MS wzbogaconą 0,5 $\text{mg} \times \text{l}^{-1}$ BAP i 2,5 $\text{mg} \times \text{l}^{-1}$ 2,4-D.

W pracy Lewandowskiej (8) wykazano, że regeneracja roślin *M. x giganteus* przez somatyczną embriogenezę przebiegała najlepiej na pożywce MS z dodatkiem cytokininy (0-0,1 $\text{mg} \times \text{l}^{-1}$ BAP) i cysteiny (50 $\text{mg} \times \text{l}^{-1}$). Natomiast Holme, Krogstrup i Hansen (6) uzyskali regenerację tego samego mieszańca przez embriogeny kalus przy zastosowaniu MS z dodatkiem zarówno cytokininy (22,3 μM BA) jak i auksyny (4,5 μM 2,4-D) oraz aminokwasu (12,5 mM prolina).

W pracy własnej regenerację roślin poprzez kalus uzyskiwano na kilku rodzajach pożywek. Dodatek wysokiej dawki BAP w pożywce regeneracyjnej wpływał na liczbę roślin regenerujących z tkanki kalusowej szczególnie, gdy kalus pochodził z w pełni wykształconych kłosek. Wówczas gdy mikropropagację *Miscanthus x giganteus* prowadzono z kalusa otrzymanego z zawiązków kwiatostanów regeneracja roślin przebiegała już po kilku dniach po przeniesieniu kalusa z ciemności na światło ciągle nawet na wyjściowej pożywce z niewielką ilością BAP (0,5 $\text{mg} \times \text{l}^{-1}$) oraz dodatkiem 2,4-D. Zbyt wysoka dawka BAP (2 $\text{mg} \times \text{l}^{-1}$) w pożywce regeneracyjnej dla embriogenego kalusa hamowała rozwój korzeni u części regenerujących roślin.

5. Wnioski

1. Najlepszymi eksplantatami dla rozmnażania *Miscanthus x giganteus* w kulturach *in vitro* były fragmenty 0,5-2 mm pobrane z osi kwiatostanów, które osiągnęły długość 0,5-3 cm.

2. Optymalną pożywką dla indukcji kalusa była pożywka MS z dodatkiem $2,5 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ 2,4-D i $0,1 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ BAP.

3. Indukcja i proliferacja tkanki kalusowej przebiegała najlepiej w ciemności.

4. Traktowanie eksplantatów podczas pierwszych dwóch tygodni fotoperiodem (16-godzinny dzień) zwiększało dwukrotnie wydajność regeneracji roślin.

5. Regeneracja roślin przebiegała najwydajniej na pożywce MS zawierającej $2 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ BAP.

Literatura

1. Jeżowski S., (2001), Postępy Nauk Rolniczych, 2, 119-121.
2. Jeżowski S., (1999), Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 468, 159-166.
3. Scurlock J. M. O., (1999), *Miscanthus: A Review of European Experience with a Novel Energy Crop*, Environmental Sciences Division Publication, No. 4845.
4. Linde-Laursen I. B., (1993), Hereditas, 119, 297-300.
5. Walsh M., McCarthy, (1998), *The Miscanthus handbook*, Heperion Energii Systems Ltd., Main St. Watergrasshill, Co. Cork., Areland, 37-42, 88-91.
6. Holme I. B., Krogstrup P., Hansen J., (1997), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 50, 203-210.
7. Holme I. B., Petersen K. K., (1996), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 45, 43-45.
8. Lewandowski I., (1997), High-Tech and Micropropagation, 39, II, 239-255.
9. Nielsen J. M., Brandt K., Hansen J., (1993), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 35, 173-179.
10. Petersen K. K., (1997), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 49, 137-14.
11. Petersen K. K., Hansen J., Krogstrup P., (1999), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 58, 189-197.
12. Murashige T., Skoog F., (1962), Physiologia Plantarum, 15, 473-497.
13. Zenktele M., (1984), *Hodowla komórek i tkanek roślinnych*, PWN, Warszawa, 35-36.
14. Vasil I. K., (1987), J. Plant Physiol., 128, 193-218.
15. Tabaeizadeh Z., Plourde A., Comeau A., (1990), Plant Cell Rep., 9, 204-206.
16. Brettell R. I. S., Wernicke W., Thomas E., (1980), Protoplasma, 104, 141-148.
17. Cai T., Butler L., (1990), Plant Cell Tiss. Org. Cult., 20, 101-110.
18. Hanzel J. J., Miller J. P., Brinkman M. A., Fendos E., (1985), Crop Sci., 28, 27-31.
19. Koetje D. S., Grimes H. D., Wang Y.-C., Hodges T. K., (1989), J. Plant Physiol., 135, 184-190.
20. Paredy D. R., Petolino J. F., (1990), Plant Sci., 67, 211-219.
21. Lewandowski I., Kahnt G., (1993), Beitr Biol Pflanzen, 67, 439-451.