



Obecny stan badań nad biotechnologią żyta zwyczajnego (*Secale cereale* L.)

Elżbieta Bolesta, Jan J. Rybczyński

Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej
Polska Akademia Nauk, Warszawa

Present status of biotechnology of rye (*Secale cereale* L.)

Summary

This review paper covers the results of tissue culture and biotechnology of rye (*Secale cereale* L.) published between 1990 and 2000. The following subjects were raised: somatic embryogenesis, haploid production, intergenetic hybridisation and transformation. Upon conclusion of all the results published to date, we may say that the progress of biotechnology in the case of rye is very limited in comparison to other cereals. However, a lot of work and efforts were involved to obtain the aforementioned result. Taking into account the progress in plant genetics and molecular biology, the authors deeply believe that the New Millennium will bring a brake-through in rye biotechnology.

Key words:

rye, somatic embryogenesis, androgenesis, transformation, intergeneric hybrids.

Adres do korespondencji

Elżbieta Bolesta,
Ogród Botaniczny –
Centrum Zachowania
Różnorodności
Biologicznej,
Polska Akademia Nauk,
ul. Prawdziwka 2,
02-973 Warszawa;
e-mail:
obpan@ikp.atm.com.pl

1. Wstęp

Żyto (*Secale cereale* L.) nadal jest gatunkiem ważnym gospodarczo dla Polski, zajmującym drugie miejsce wśród zbóż pod względem areалу uprawy (1). Jest to gatunek o niewielkich wymaganiach glebowych i klimatycznych (2). Toleruje niskie temperatury, zasolone gleby oraz rośnie na glebach nieodpowiednich dla innych zbóż (3). Zmniejsza erozję gleby, a zarazem zwiąk-

sza podsiąkanie i zatrzymuje wodę w glebie. Ze względu na małe wymagania glebo-
we gatunek ten może być uprawiany na obszarach zniszczonych ekologicznie. Jego
uprawa obejmuje kraje Europy Środkowej i Wschodniej. W Polsce większość produ-
kowanego ziarna przeznaczona jest na pasze (60%) (4), w USA natomiast wykorzy-
stywane jest głównie jako roślina okrywowa (5).

Żyto jest źródłem bardzo cennych, ważnych rolniczo cech. Od dawna prowadzo-
ne są prace nad przeniesieniem niektórych z nich do innych gatunków zbóż. Posia-
da również cechy wymagające ulepszenia. W tym celu prowadzone są czasochłonne
prace hodowlane, ponieważ żyto jest gatunkiem obcopolnym o silnym efekcie de-
presji wsobnej (3,6,7). Istniejące odmiany to głównie odmiany populacyjne. Od lat
siedemdziesiątych zwraca się szczególną uwagę na możliwość wykorzystania metod
inżynierii genetycznej w jego programach hodowlanych.

Od opublikowanego w 1990 r. (8) przeglądu literatury dotyczącego kultur *in vitro* ro-
dzaju *Secale*, obserwuje się stały wzrost zainteresowania biotechnologią żyta. Opraco-
wanie wydajnej metody regenerowania roślin w kulturach *in vitro* stwarza wiele możli-
wości takich jak: mikrorozmnażanie, przechowywanie zasobów genowych w stanie za-
mrożenia, produkcji sztucznych (somaticznych) nasion, regeneracji roślin transgenicz-
nych z pojedynczych transformowanych komórek czy protoplastów, selekcji regener-
antów pod względem pożądanej cechy, mutacji na poziomie kultur komórkowych.
Wykorzystuje się dwie drogi regeneracji roślin: organogenezę czyli powstawanie me-
rystemów wierzchołkowych pędu, które następnie zostają ukorzenione oraz embrioge-
nezę somatyczną, polegającą na powstawaniu zarodków z pominięciem drogi płciowej.

W prezentowanej pracy zostaną omówione takie zagadnienia jak: somatyczna
embriogeneza, uzyskiwanie roślin haploidalnych (androgenesa, gynogeneza, elimi-
nacja chromosomów), krzyżowania oddalone oraz transformacja.

2. Somatyczna embriogeneza

Zjawisko inicjacji i rozwoju zarodków z tkanki somatycznej roślin zostało okreś-
lone mianem somatycznej embriogenezy i po raz pierwszy zostało opisane przez
Stewarda (9) i Reinerta (10). Od wielu lat prowadzone są prace nad optymalizacją
metod otrzymania somatycznych zarodków żyta z różnego typu tkanek somatycz-
nych w kulturach *in vitro* (8). Wyróżnić można 4 podstawowe czynniki wpływające
na ten proces: 1) rodzaj eksplantantu i jego stan fizjologiczny, 2) rodzaj pożywki, 3)
warunki kultury oraz 4) genotyp.

2.1. Eksplantat

Przebadano różne typy eksplantanów, m.in. takie jak: łodygi, liście młodych sie-
wek, węzły i międzywęzła, pęd główny kwiatostanu i bardzo młode kwiatki, niedoj-

rzale kwiatostany i zarodki (8). Niedojrzałe zarodki okazały się najefektywniejszym źródłem embriogenego kalusa i somatycznych zarodków (8,11-15). Zimny i wsp. (14) i Zimny (16) w pracy nad optymalizacją metody somatycznej embriogenezy u żyta, badali zdolność do embriogenezy zarodków w różnym stadium rozwojowym. W tym celu wprowadzono skalę o sześciu stadiach rozwojowych, gdzie głównym kryterium był stan zaawansowania rozwoju koleoptyla i tarczki zarodkowej. Autorzy obserwowali, że najwyższą efektywność embriogenezy u testowanych genotypów żyta wykazywały zarodki w fazie określanej jako późne stadium kulistego koleoptyla. Koleoptyl jest wówczas jeszcze kulisty, a tarczka traci swoją przezroczystość. Wskaźnik efektywności embriogenezy był niższy w przypadku młodszych stadiów i drastycznie spadał wraz ze starzeniem się eksplantatów. Pewien poziom akumulacji skrobi jest jednym ze wskaźników wczesnego okresu indukcji somatycznej embriogenezy. Należy wspomnieć, że wzrastająca akumulacja skrobi jest wykładnią zdolności morfogenetycznych komórek *scutellum* zarodka, które ulegają zmianom w jego ontogenezie. Podobnie jak u innych roślin zbożowych, u dojrzałych zarodków nie zdołano zaindukować somatycznej embriogenezy. Zimny (16) badał również zdolność do embriogenezy niedojrzałych kwiatostanów i młodych liści. Stosując te eksplantaty uzyskał wyniki wyraźnie gorsze i różne w kolejnych powtórzeniach. Natomiast Rakoczy-Trojanowska i wsp. (17,18) otrzymali wyższą efektywność embriogenezy, gdy eksplantatami były niedojrzałe kwiatostany niż niedojrzałe zarodki. Również Krumbiegel-Schroen i wsp. (19) wykładając na pożywkę z 2,4-D zarówno niedojrzałe kwiatostany jak i zarodki, lepsze wyniki otrzymali w przypadku niedojrzałych kwiatostanów. Podobne obserwacje poczyniono u *Secale vavilovii*, gdy zastosowano te same eksplantaty (20).

2.2. Pożywka

Kolejnym ważnym czynnikiem w procesie somatycznej embriogenezy żyta obok typu eksplantatu jest pożywka (8). Przebadano wiele pożywek pod względem ich przydatności do indukcji somatycznej embriogenezy: Norstog (21), Gamborg – B5 (22), Blaydes (23), White (24), Heller (25), Burstrom (26), CC (27), C₈ (28). Najczęściej jednak stosowana jest pożywka MS (29) i jej modyfikacje, polegające na wzbogacaniu różnymi kombinacjami witamin, cukrów, regulatorów wzrostu, substancji organicznych czy innych (8). Zimny i Lörz (14) i Zimny (16), badając cztery pożywki, wykazali, że pożywka CC (27) jest najodpowiedniejsza do indukowania procesu. Po jej zastosowaniu uzyskano najwyższą intensywność i efektywność somatycznej embriogenezy. Rakoczy-Trojanowska i wsp. (17,18) i Vazquez i wsp. (20) stosowali pożywkę MS (29).

Najczęściej uzupełniającymi pożywkę regulatorami wzrostu w roślinnych kulturach *in vitro*, są auksyny i cytokiny. Dobór odpowiedniego regulatora wzrostu oraz jego stężenie jest czynnikiem decydującym o powodzeniu kultury. Najczęściej sto-

sowaną auksyną indukującą somatyczną embriogenezę u żyta i innych gatunków z klasy jednoliściennych jest 2,4-D (kwas dwuchlorofenoksyoctowy) (12,13,30). Stosowano również i inne auksyny (12), a nawet cytokininy, chociaż te ostatnie, jak wykazano, nie miały korzystnego wpływu na indukowanie somatycznej embriogenezы. Natomiast badane przez Zimnego (16) trzy auksyny z grupy kwasów fenoksyoctowych indukowały proces somatycznej embriogenezы. Optymalne stężenia 2,4-D były zawarte między 1 mg dcm^{-3} a 2 mg dcm^{-3} , wyższe natomiast wpływały negatywnie na efektywność somatycznej embriogenezы. Zastosowany Picloram (kwas 4-amino3,5,6-trójkloroopikolinowy) z niską efektywnością indukował ten proces we wszystkich zbadanych stężeniach w zakresie od 1 mg dcm^{-3} do 8 mg dcm^{-3} . Najbardziej efektywnie somatyczna embriogeneza indukowana była w zakresie od 4 mg dcm^{-3} do 8 mg dcm^{-3} dicamby (kwas 3,5-dwuchloro-o-anizowy), a za optymalne stężenie uznano $6,6 \text{ mg dcm}^{-3}$.

2.3. Warunki kultury

Trzecim ważnym czynnikiem w procesie somatycznej embriogenezы są warunki kultury (8). Kultury żyta prowadzono zarówno w ciemności przez cały okres (20) jak i wobec fotoperiodu 16/8 godz. (dzień/ noc) (17,18,31) lub przy silnym natężeniu światła. Zimny (16) w swojej pracy poświęconej optymalizacji warunków somatycznej embriogenezы zbadał wpływ światła od 0 do 3,5 tys. luxów na ten proces. Eksplantaty żyta najefektywniej rozwijały kalus przy stałym natężeniu światła 750 luxów.

2.4. Genotyp

Oprócz omówionych czynników na proces somatycznej embriogenezы wpływ miał również genotyp roślinny. Wykazano, że proces somatycznej embriogenezы jest kontrolowany przez wiele genów współdziałających ze sobą. Zdolność do tworzenia embriogenicznego kalusa, jak również regeneracja roślin jest warunkowana przez geny recesywne. Natomiast powstawanie nieembriogenicznego kalusa jest determinowane przez geny dominujące, które dodatkowo mogą mieć działanie adytywne. Brak reakcji może być warunkowany dwoma genami pozostającymi ze sobą w relacji o charakterze supresji (17,18).

3. Otrzymywanie roślin haploidalnych

Żywe zainteresowanie metodami otrzymywania i wykorzystania roślin haploidalnych potocznie nazywanych haploidami datuje się od lat sześćdziesiątych ubiegłego stulecia. Opracowano szereg metod indukowania rozwoju komórek haploidalnych

w rośliny, wykorzystując w nich mikrospory (androgeneza) jak i haploidalne komórki gametofitu żeńskiego (gynogenez) oraz eliminację chromosomów zapylacza np. *Zea mays* czy *Hordeum bulbosum*. Dotychczas rozwinięto następujące drogi uzyskiwania roślin haploidalnych na drodze androgenyzy: kultury pylników (*anther culture*), kultury spontanicznie uwalnianych przez pylnik wielokomórkowych struktur mikrosporowych (*shed culture*) i kultury izolowanych mikrospor (*microspore culture*).

Próby otrzymania haploidalnych roślin żyta prowadzone są od blisko 30 lat w wielu ośrodkach badawczych. Haploidalne rośliny dotychczas uzyskano jedynie w kulturach pylnikowych, a szczególnie duży postęp w otrzymywaniu ich nastąpił po roku 1996 (32,33).

Na wynik kultur pylników i izolowanych mikrospor wpływa wiele czynników, najważniejszymi z nich to: genotyp, stan fizjologiczny roślin dawców, stadium rozwojowe mikrospory, zastosowany czynnik stresujący, pożywka oraz fizyczne warunki kultury.

3.1. Genotyp

W wielu pracach wskazuje się, że wynik indukowania androgenyzy w wysokim stopniu jest zależny od genotypu rośliny dawcy. Sprawia to, że z niektórych linii, populacji i gatunków tą drogą nie otrzymano dotychczas haploidów (34-37). U żyta *Secale cereale* L. regeneracja zielonych roślin w kulturach pylnikowych była niemożliwa (38-41) lub przypadkowa (42-47).

Podjęmowano wiele prób otrzymania zielonych roślin w kulturach pylnikowych żyta nie tylko *Secale cereale*, ale również u *S. montanum* (48) czy mieszańca *S. cereale* x *S. vavilovii* (42,43,46,49-52).

Wenzel i Thomas (53) po raz pierwszy zregenerowali pojedyncze zielone rośliny *S. cereale*. Kilka linii haploidów *S. cereale* otrzymano z formy tetraploidalnej odmiany Tero (43) i Teku (45,46). Z materiałów diploidalnych, Wenzel i wsp. (42) zregenerowali rośliny mieszańca Pekuro x Moscow Dwarf i następnie z linii L281 x L282 (54). Daniel (50) uzyskała wysoką efektywność regeneracji roślin haploidalnych wynoszącą 3,3% u linii L201. Flehinghaus-Roux (55) otrzymała linie podwojonych haploidów z odmiany Danko i Carokurz.

W poszukiwaniu genotypów o wysokiej zdolności do regeneracji w kulturach pylnikowych żyta ozimego, badano pojedyncze mieszańce pomiędzy odległymi odmianami Petkus i Carsten. Androgeniczne struktury powstały u wszystkich badanych form, z wyjątkiem mieszańców F1 zawierających tło genetyczne z Petkus. Stopień indukcji mikrospor do podziałów komórkowych u odmiany Petkus był niski, a regeneracja roślin nie powiodła się. Inną sytuację zaobserwowano u odmiany „Carsten”, u trzech mieszańców F1, a w szczególności u jednego z nich (L285-F x L283-R), z 857 wyłożonych pylników zregenerowano 5 zielonych roślin (51).

W roku 1996 nastąpił przełom w uzyskiwaniu roślin haploidalnych na drodze kultury pylników żyta. Immonen i Anttila (32) przebadaly 21 genotypów żyta ozime-

go i jarego. U wszystkich badanych genotypów obserwowano pylniki tworzące kalus androgeniczny lub zarodki, a ich procent wahał się w granicach od 1,4 do 15% wyłożonych pylników. Natomiast u czternastu linii otrzymano zielone rośliny. Najwyższa efektywność uzyskana przez Immonen i Anttila (32,56) to 30,6 zielonych roślin na 100 wyłożonych pylników u linii żyta jarego Jo02. Następnie Immonen (57) przebadala kolejnych dwadzieścia odmian i linii hodowlanych (fińskich, polskich, szwedzkich, rosyjskich i duńskich) żyta ozimego w tym takich, które wcześniej wielu autorów opisało jako niezdolne do indukcji androgenenzy. U wszystkich otrzymano kalus, a tylko w przypadku dwóch linii nie udało się zregenerować roślin. Stwierdzono, że u żyta jarego łatwiej jest zaindukować proces androgenenzy (32,56), co potwierdza wcześniejsze wyniki otrzymane u odmiany Petkus (58).

3.2. Warunki wzrostu roślin dawców

Według Jähne i Lörza (59) stan fizjologiczny roślin dawców ma duży wpływ na wynik uzyskany w kulturach pylników i izolowanych mikrospor. Najlepszymi oczywiście są warunki naturalne, ale z powodu dużej liczby zakażeń, wysokiego zainfekowania kultur poszczególnych eksperymentów uważa się, że rośliny rosnące w tych warunkach są bardzo mało przydatne do inicjacji kultur (46). Dlatego opracowano sztuczne warunki odpowiednie dla wzrostu roślin dawców (33). Jakkolwiek, Immonen i Anttila (32,56) uprawiały rośliny żyta ozimego w warunkach polowych, a żyto jare w warunkach szklarniowych. W obu przypadkach otrzymały wysoki procent zregenerowanych roślin haploidalnych. Immonen (57) uprawiała rośliny zarówno w warunkach polowych jak i szklarniowych. Indukcję kalusa zaobserwowała w obu przypadkach. Natomiast regeneracja roślin haploidalnych była wyższa z kalusa pochodzącego z roślin rosnących w warunkach szklarniowych.

3.3. Stadium rozwojowe mikrospory

Kolejnym czynnikiem, który ma decydujący wpływ na liczbę pylników tworzących kalus androgeniczny lub zarodki i na liczbę zregenerowanych roślin, jest stadium rozwojowe mikrospory inicjującej kulturę. U zbóż najlepsze wyniki uzyskano, kiedy mikrospora znajdowała się w fazie od średnio- do późnojednojądrowej (33,45,60-62).

Wpływ stadium rozwojowego mikrospory na reakcje pylników żyta w kulturze został dokładnie zbadany przez Immonen i Anttila (56). Dla ułatwienia prowadzenia eksperymentu autorki pogrupowały pylniki żyta w zależności od ich długości (od 4,5 do 8 mm) na osiem klas, które skorelowano ze stadium rozwojowym mikrosporeogenezy. Zaobserwowano, że indukcja kalusa androgenicznego jest dodatnio skorelowana ze stadium rozwojowym mikrospory. Najwięcej pylników tworzyło kalus

androgeniczny lub/i zarodki, gdy jądro ich mikrospor przeszło już pierwszy podział mitotyczny. Maksymalna liczba zregenerowanych zielonych roślin w każdej z badanych form związana była z inną fazą rozwojową mikrospory i tak na przykład u odmiany lokalnej Hännilä z mikrospor, które przeszły już pierwszy podział mitotyczny (6,5–7,5 mm długość pylnika), a u odmiany Auvinen z mikrospor, które były we wcześniejszej fazie rozwoju (5 mm długość pylnika). Malepszy (58) badał wpływ kolejnych stadiów mikrosporogenezy (komórka macierzysta pyłku, diady, tetrazy, mikrospory, dojrzały pyłek i ziarna pyłku) na reakcje pylników w kulturze. Androgeniczny kalus otrzymał tylko z pylników, u których mikrosporogeneza była w fazie tetrazy i mikrospory.

3.4. Wstępne traktowanie

Założenie kultury pylnikowej jest zazwyczaj poprzedzone traktowaniem materiału czynnikiem stresowym, któremu przypisuje się fundamentalną rolę w zmianie programu rozwojowego mikrospory z gametofitycznego na sporofityczny. Najczęściej stosowanym jest stres termiczny, polegający na przechłodzeniu lub ogrzaniu. W przypadku *Graminae* jest to inkubacja w temperaturze +4°C (35,43,59,63), a u *Brassicaceae* w +32,5°C (64).

W kulturach pylnikowych żyta powszechnie stosowane jest wstępne przechłodzenie kłosów. Thomas i wsp. (49) stosowali temperaturę +6°C przez 3 do 15 dni, Lorenz (41) natomiast +4 – +5°C przez 8 do 14 dni. Daniel (50) oraz Rakoczy-Trojnowska i wsp. (47) przetrzymywali kłosa przez 7 dni w temperaturze +4°C według procedury Flehinhaus i wsp. (45). Natomiast Immonen i Anttila (32) stwierdziły, że wydłużenie okresu wstępnego traktowania kłosów przechłodzeniem od +4°C do 4-5 tygodni, niezależnie czy były przetrzymywane na świetle czy w ciemności, zwiększa liczbę pylników tworzących kalus, jak i liczbę zregenerowanych roślin. Immonen (57) również zaobserwowała, że liczba pylników tworzących androgeniczny kalus u wszystkich badanych form była siedem razy wyższa, gdy kłosa były przetrzymywane w temperaturze +4°C przez 3 tygodnie niż przez 7 dni. Liczba zregenerowanych zielonych roślin była również wyższa, ale tylko 4,6 razy. Natomiast Immonen i Anttila (65) rozpatrując liczbę pylników formujących androgeniczny kalus, stwierdziły zależność pomiędzy czasem traktowania ich chłodem na świetle i w ciemności, a genotypem rośliny. U odmiany lokalnej Hännilä stwierdzono, że 26,1% wyłożonych pylników tworzyło kalus. Pylniki pochodziły z kłosów poddanych przechłodzeniu w +4°C przez 21 dni w ciemności. Natomiast, po 21 dniach na świetle, u odmiany Jo0 20,0% pylników tworzyło kalus. Odmiana ta charakteryzowała się wysokim procentem (18,9%) pylników reagujących w warunkach kontrolnych.

3.5. Pożywka

W kulturach pylnikowych żyta wykorzystywane były różne pożywki, specyficzne dla linii, odmiany czy populacji. Składnikami pożywki mającymi bezpośredni wpływ na liczbę pylników tworzących kalus, a następnie na regenerację roślin są: makro-, mikroelementy, źródło węgla organicznego i jego stężenie, dobór odpowiednich regulatorów wzrostu oraz rodzaj czynnika zestalającego. Wykazano również, że nie bez znaczenia jest sposób sterylizacji pożywki, a w szczególności roślinnych regulatorów wzrostu (32,46,47,57,66,67).

3.5.1. Makro- i mikroelementy pożywki

W eksperymentach dotyczących kultur pylnikowych żyta przebadano wiele pożywek. Wenzel i wsp. (43) sugerowali stosowanie pożywki z ekstraktem ziemniaczanym wg Anonymous (68). Pożywkę ziemniaczaną stosowali również Rakoczy-Trojanowska i wsp. (47). Duży wpływ odmiany ziemniaka, skomplikowany proces przygotowania tej pożywki oraz brak wiadomego czynnika stymulującego androgenezę sprawił, że nie znalazła ona powszechnego zastosowania. Wenzel i wsp. (43) polecali modyfikację pożywki N6 (69), która początkowo była stosowana w kulturach pylnikowych ryżu. Pożywkę tę używało wielu badaczy z różnym skutkiem (32,45,47). Niektórzy autorzy m.in. Daniel (50) stosowali modyfikacje pożywki MS (29), a Bicar i Darvey (70) zastosowali pożywkę MC17 (71). Immonen i Anttila (32) sprawdziły kilka pożywek: MS (29), N6 (72), AA (73), OAC-1 (74), 190-2 (75) i W14 (76) w celu znalezienia uniwersalnej dla wszystkich badanych linii i odmian. Wymienione pożywki zawierały witaminy i żelazo wg pożywki MS (29). Indukcja kalusa wystąpiła na wszystkich badanych pożywkach, ale do dalszych badań wybrano pożywkę 190-2 (75). Dla wszystkich badanych odmian i linii okazała się ona najlepsza. Na tej pożywce stwierdzono największą liczbę pylników tworzących kalus (25% wyłożonych pylników) oraz najwcześniejszą indukcję kalusa. Również Immonen i Anttila (56, 65) i Immonen (57) stosowały pożywkę 190-2 (75). Immonen i Anttila (77) ponownie zbadały sześć wymienionych pożywek, które różniły się m.in. stosunkiem formy azotu (azotowej do amonowej) i jego ilości. Tak jak poprzednio na pożywce 190-2 najwięcej pylników tworzyło kalus androgeniczny. Kalus androgeniczny pochodzący z pożywki W14 charakteryzował się natomiast największą zdolnością regeneracyjną. Obie badane pożywki: 190-2 i W14 zawierały niskie stężenie azotu, odpowiednio 12,9 mmol/L i 23,1 mmol/L.

3.5.2. Źródło i stężenie węgla organicznego

Wpływ źródła węgla organicznego na proces androgenozy jest niejasny. U żyta podobnie jak u pszenicy efektywność androgenozy wzrosła po zamianie źródła wę-

gla z sacharozy na maltozę (45). Maltoza w pożywce przyczyniła się do zwiększenia zarówno poziomu indukcji androgenyzy jak i regeneracji roślin. U linii DH5 zwiększył się czterokrotnie poziom indukcji i dziesięciokrotnie liczba zregenerowanych zielonych roślin (33). Zastosowanie maltozy zwiększyło również powtarzalność stopnia indukcji i regeneracji roślin w doświadczeniach przeprowadzonych w różnym czasie (50,55). Według Deimling i wsp. (78) kalus lub zarodki u żyta powstają tylko na pożywce z maltozą. Immonen i Anttila (56) wysoki poziom indukcji embriogenezy otrzymały na pożywce z maltozą i z 100 mg dcm⁻³ Ficoll 400 a Immonen (57) na pożywce z dodatkiem tylko Ficoll[®]400 (Pharmacia Biotech) w ilości 100 mg dcm⁻³. Immonen i Anttila (65) zaobserwowały, że maltoza w stężeniu 12% daje gorsze wyniki, niż jeżeli zastosujemy ją w stężeniu 9%. W doświadczeniach nad wpływem stężenia maltozy (6-12%) na proces indukcji androgenyzy i regeneracji haploidów żyta wykazano, że 6% jest stężeniem optymalnym.

3.5.3. Regulatory wzrostu

Najczęściej stosowanymi regulatorami wzrostu w kulturach pylnikowych żyta są 2,4-D (2 mg dcm⁻³) i kinetyna (0,5 mg dcm⁻³) (32,33,47,70). Daniel (50) zastosowała kombinację Picloramu, IAA (kwas indoliloctowy) i BA (benzyloaminopuryna). Inną kombinację 2,4-D, BA i Picloramu badała Hörlein (46), wyniki wskazywały niewielką przewagę pożywki z dodatkiem Picloramu, nie były to jednak różnice istotne. Thomas i wsp. (49) zregenerowali rośliny żyta z kultury pylników prowadzonej tylko z 2,4-D jako regulatorem wzrostu w pożywce indukcyjnej. Rakoczy-Trojanowska i wsp. (47) zastosowali 2,4-D, kinetynę i Picloram w kombinacjach i każdą z substancji z osobna. Rośliny otrzymali tylko na pożywce z 2,4-D i kinetyną. Natomiast Bicar i Darvey (70) zregenerowali rośliny zarówno z zarodków pochodzących z pożywki zawierającej 2,4-D i kinetynę, jak i pożywki zawierającej Picloram, IAA i BAP. Immonen i Anttila (56) po zastąpieniu 2,4-D Dicambą w kombinacji z kinetyną zaobserwowały, że procent pylników tworzących kalus androgeniczny lub zarodków i regeneracja roślin była na takim samym poziomie, co w przypadku stosowania 2,4-D. W kolejnych doświadczeniach stwierdzono, że Dicamba może być lepszą auksyną niż dotychczas stosowana 2,4-D, ponieważ po jej zastosowaniu otrzymały wyższy stosunek zregenerowanych roślin zielonych do albinotycznych (77).

3.5.4. Czynniki zestalające pożywkę

Kultury pylnikowe żyta prowadzi się zwykle na pożywce zestalanej (32,33,47,70). Immonen i Anttila (32,56) i Immonen (57) stosowały z powodzeniem również pożywkę płynne. Odkąd Wernicke i Kohlenbach (79) wykazali hamujące działanie agaru, w wielu pożywkach preferuje się zastosowanie agarozy lub gerlitu. W kultu-

rach pylnikowych żyta, jak się wydaje, można wymiennie stosować agarozę i gerlit. Poziom indukcji i regeneracji jest nieznacznie wyższy na pożywce zestalonej gerlitem, ale nie zawsze jest to różnica istotna (33). Różne dotychczas stosowane stężenia czynników zestalających (agarozę 2,5 lub 4,0 g dcm⁻³; gerlite 1,25 lub 2,5 g dcm⁻³) nie wpływają w istotny sposób na reakcje pylników w kulturze (45). Daniel (50) zregenerowała rośliny na pożywce zawierającej 3,2 g dcm⁻³ gerlitu, a Immonen i Anttila (32, 56) i Immonen (57) stosowały z dużym powodzeniem Phytigel w stężeniu 0,3%.

3.5.5. Sposób sterylizacji pożywki

Sposób sterylizacji pożywek lub ich wybranych składników również wpływa na reakcje kultur pylnikowych. Sterylizacja przez autoklawowanie ma wiele wad: skład pożywki może ulec zmianie, ponieważ niektóre składniki są niestabilne w wysokiej temperaturze (80), również i pH pożywki ulega wahaniom (81). Sterylizacja na zimno z zastosowaniem filtrowania jest polecana przez wielu autorów. Deimling i Flehlinghaus-Roux (33) porównały obie te metody. Sterylizacja przez autoklawowanie istotnie obniżyła poziom indukcji androgenyzy u dwóch genotypów (Y5, CF1). Zaobserwowano również drastyczny spadek regeneracji u linii SC35. Natomiast Immonen i Anttila (32,56,77) uzyskały wysoki poziom indukcji i regeneracji roślin na pożywkach, które były autoklawowane.

3.5.6. Fizyczne warunki kultury

Najczęściej stosowanymi warunkami podczas indukcji androgenyzy jest temperatura +24 – +28°C w ciemności (32,45,47,50,53,70). W bardzo szczegółowych badaniach określenia wpływu warunków świetlnych wykazano, że zastosowanie światła nie zwiększa liczby reagujących pylników, ale zwiększa żywotność kalusa w porównaniu do kalusa z kultur inkubowanych w ciemności (33,41).

3.5.7. Regeneracja roślin w kulturze pylników

Regeneracja roślin z kalusa żyta pochodzącego z pylników lub ze struktur zarodkowych była najwyższa na zmodyfikowanej pożywce N6 (69), zawierającej tylko kinetynę w stężeniu 2 mg dcm⁻³ jako regulator wzrostu (45). Dla porównania Wenzel i wsp. (43) oraz Daniel (50) zregenerowali z podobnych struktur rośliny na pożywce wolnej od regulatorów wzrostu. Hörlein (46) przebadła 11 pożywek różniących się regulatorami wzrostu i wykazała, że niskie stężenie auksyn jest konieczne do zainicjowania procesów różnicowania i otrzymania zielonych roślin. W tych doświadczeniach na pożywkach bez regulatorów wzrostu kalus nie był zdolny do różnicowania.

Immonen i Anttila (32,56) stosowały pożywkę 190-2 (75) z dodatkiem 0,05 mg dcm⁻³ NAA i 0,5 mg dcm⁻³ BAP oraz 3% sacharozy zestawioną 0,3% Phytagelem. Natomiast Immonen (57) stosowała 1/2 MS (29) uzupełnioną 2,8 mg dcm⁻³ IAA i 1 mg dcm⁻³ kinetyny. Również Bicar i Darvey (70) na pożywkę MS (29) uzupełnionej IAA (1 mg dcm⁻³) i BAP (mg dcm⁻³) zregenerowali zielone rośliny.

Deimling i Flehinghaus-Roux (33), przenosiły zielone pędy z pożywki regeneracyjnej zawierającej kinetynę na pożywkę bez regulatorów wzrostu w celu ich ukorzenienia. Powolna adaptacja zielonych roślin do wysokiej intensywności światła zwiększa ich szanse na lepszy wzrost (45). Optymalnymi warunkami polecanymi przez wielu autorów jest 14 – 16-godzinny dzień i temperatura +22 – +27°C.

3.6. Kultura mikrospor

Trudności związane ze sterylizacją materiału roślinnego oraz z samą kulturą pylników żyta wpłynęły na podjęcie prób, podobnie jak u innych roślin zbożowych, prowadzenia kultur izolowanych mikrospor. Wenzel i wsp. (82) izolowali mikrospory zarówno bezpośrednio z kłosów jak również z pylników po kulturze wstępnej *preculture*, w żadnej z kombinacji nie zregenerowali roślin. Rakoczy-Trojanowska i wsp. (83) przeprowadzili doświadczenia mające na celu określenie wpływu kilku czynników na podziały i nabrzmiwanie mikrospor u dwóch linii i jednej odmiany żyta ozimego *S. cereale* L. W doświadczeniu tym zaobserwowano pierwsze podziały mikrospor w przypadku dwóch linii L318 i L9, gdy kultura była prowadzona w kokulturze z załącznikami jęczmienia. Rakoczy-Trojanowska i wsp. (84) izolowali mikrospory mechanicznie, jak również zastosowali kulturę spontanicznie uwalnianych mikrospor. Jednakże w kulturze tej uzyskiwali zbyt małe gęstości uwolnionych mikrospor, co było prawdopodobnie jednym z czynników hamującym nabrzmiwanie i podziały mikrospor. Kultura mikrospor izolowanych mechanicznie była prowadzona w kokulturze z załącznikami jęczmienia i bez niej. Żywotność mikrospor była istotnie obniżona w kokulturze z załącznikami jęczmienia, a także była zależna od stężenia maltozy w pożywkę. Inicjalne podziały komórek mikrospor obserwowano tylko w kulturze prowadzonej w kokulturze z załącznikami jęczmienia.

Deimling i wsp. (85) zregenerowali zielone rośliny żyta w kulturze mechanicznie izolowanych mikrospor u linii SC35. Otrzymana w tych kulturach liczba roślin albinotycznych wynosiła aż 43% wszystkich regenerantów. Frekwencję regeneracji obserwowano na poziomie 10% zielonych roślin z mikrospor izolowanych ze 100 pylników. U innej dobrze reagującej w kulturze pylników linii CF1, kultury izolowanych mikrospor zdolne były do tworzenia kalusa, z którego nie udało się zregenerować roślin (33).

3.7. Oddalone krzyżowania oraz gynogeneza *in vitro*

Obecnie u wielu gatunków rośliny haploidalne otrzymuje się na drodze oddalonych krzyżowań. Otrzymane zarodki są haploidalne, ponieważ w pierwszych podziałach zarodka następuje eliminacja chromosomów ojca (86,87). Na temat haploidalnych roślin żyta pozyskiwanych tą drogą jest tylko kilka doniesień. Deimling i Flehinghaus-Roux (33) i Deimling i wsp. (85) uzyskali 6 zarodków po zapyleniu 48 000 kwiatków. Również Laurie i wsp. (88) znaleźli w kilka dni po zapyleniu odmiany żyta Petkus Spring kukurydzą „Seneca 60” zarodki w 18,7% zapyłonych kwiatków. Natomiast Altenhofer i wsp. (89) otrzymali dwie haploidalne rośliny po zapyleniu *Secale cereale* przez *Zea mays*, jakkolwiek frekwencja uzyskanych zarodków była poniżej 5% zapyłonych kwiatków. Dotychczas nie udało się otrzymać haploidalnych roślin z komórek gametofitu żeńskiego w kulturze *in vitro*, wykorzystując w tym celu niedojrzałe słupki i izolowane niedojrzałe zalążnie.

3.8. Charakterystyka roślin otrzymanych w kulturach pylników

3.8.1. Poziom ploidalności

U żyta często obserwuje się spontaniczne podwojenie liczby chromosomów u roślin zregenerowanych z kultur pylnikowych. W pierwszych pracach (53) wysoki procent zregenerowanych roślin miało spontanicznie podwojony genom. W kolejnych doświadczeniach 100% regenerantów wykazywało spontanicznie podwojoną liczbę chromosomów (42,49).

Wenzel i Forroughi-Wehr (36) szacują, że w kulturze pylników żyta 70% zregenerowanych roślin jest spontanicznie podwojonymi haploidami. W badaniach Flehinghaus-Roux (55) potwierdziła wcześniejsze doniesienia, że u linii SC35 i CF1, kolejno 66 i 75% regenerantów to spontanicznie podwojone haploidy. Natomiast wszystkie rośliny zregenerowane przez Rakoczy-Trojanowską i wsp. (47) w kulturach pylnikowych były haploidami. Jednakże Immonen (57) w przeprowadzonych eksperymentach otrzymała 69% spontanicznie podwojonych haploidów. Również Immonen i wsp. (90) donoszą o wysokim udziale roślin o spontanicznie podwojonym genie, wahającym się w zależności od linii czy odmiany w granicach 62-75%, a nawet do 80% (65). W doświadczeniach przeprowadzonych przez Bicar i Darvey (70) aż 86% zregenerowanych roślin to spontanicznie podwojone haploidy.

3.8.2. Albinizm

W kulturach pylnikowych roślin jednoliściennych często obserwowano powstawanie roślin albinotycznych (91-93). Z niektórych danych wynika, że procent zrege-

nerowanych roślin zielonych w kulturze pylników u zbóż jest kontrolowany przez geny jądrowe lub cytoplazmatyczne oraz ich interakcje (94-97).

Kultury pylnikowe żyta nie różnią się od kultur pozostałych roślin zbożowych i charakteryzują wysoką frekwencją regeneracji roślin albinotycznych. We wczesnych pracach z mieszańcem *S. cereale* x *S. vavilovii* otrzymywano rośliny albinotyczne z częstotliwością od 9,7 do 70,4% (42,43,49). Na podstawie otrzymanych danych wskazuje się na wyraźną zależność liczby roślin albinotycznych od genotypu. Zwykle większy procent roślin albinotycznych otrzymano u *S. cereale* L. w porównaniu do genotypów, które częściowo zawierały genom *S. vavilovii*, tylko u linii L201 (50) sytuacja była odwrotna. Negatywnym przykładem jest kultura pylników odmiany Carokurz oraz F1 z krzyżowań, gdzie formą mateczną była odmiana Petkus, a ojcowską Cartesn, w której rośliny albinotyczne stanowiły 100% regenerantów. Również u mieszańców zawierających linie L283, L289, L290, wyprowadzone z odmiany Carsen obserwowano wysoki procent roślin albinotycznych. Wpływ genotypu był wyraźnie widoczny, gdy porównano mieszańce L283-R x L289-R i L285-R x L289-R. Wszystkie zregenerowane rośliny z pierwszego mieszańca były albinotyczne, podczas gdy z drugiego 80% regenerantów to zielone rośliny. Deimling i Flehinghaus-Roux (33) i Flehinghaus-Roux i wsp. (51) sugerują, że linia L285 może zawierać czynniki genetyczne pozytywnie wpływające na udział roślin zielonych wśród regenerantów. Również Immonen i Anttila (32) donosiły o zależności liczby zregenerowanych roślin albinotycznych od genotypu. Jakkolwiek w późniejszej pracy, w której opisano wysoki udział roślin albinotycznych w kulturze, nie zaobserwowano już wyraźnej genotypowej zależności. Autorki obserwowały raczej wyraźny wpływ takich czynników jak: rok w którym przeprowadzone zostały doświadczenia, wprowadzone modyfikacje warunków kultury (56). Na podstawie kolejnych doświadczeń przeprowadzonych przez Immonen (57) sugeruje się, że duży wpływ na proporcje roślin zielonych do albinotycznych mogą mieć warunki uprawy roślin dawców oraz zastosowany Ficoll 400.

3.8.3. Cechy morfologiczne

Linie podwojonych haploidów żyta otrzymuje się rzadko, jednakże uzyskano szereg pozytywnych rezultatów, które mogą mieć znaczenie hodowlane. Deimling i Flehinghaus-Roux (33) po raz pierwszy zbadały większą liczbę bo aż 150 linii podwojonych haploidów żyta. Zaobserwowały wyraźne różnice morfologiczne wśród linii DH pochodzących z pojedynczych krzyżowań, natomiast różnic w obrębie linii nie stwierdzono. Immonen i Anttila (65) zaobserwowały u wszystkich badanych zregenerowanych roślin symptomy depresji wsobnej. Rośliny były samoniezgodne, miały słabo rozwinięte pylniki i pyłek co ograniczało ich wykorzystanie do krzyżowań.

Bicar i Darvey (70) wykorzystali kultury pylników, w celu otrzymania komponentów potrzebnych do uzyskania mieszańców heterozyjnych z wykorzystaniem cyto-

plazmatycznej męskiej sterylności typu „Pampa”. Roślinami donorowymi były rośliny pokolenia F1, powstałego po krzyżowaniu obukierunkowym odmiany „Lunchs” o cytoplazmie typu Pampa, z odmianami australijskimi. Wśród zregenerowanych roślin były zarówno rośliny męskopłodne jak i męskosterylne. Zarówno jedne jak i drugie wystąpiły tylko, gdy donorem pylników było pokolenie F1 powstałe z krzyżowania, gdzie formą mateczną była odmiana „Lunchs”, a ojcowską odmiany australijskie. Z pylników z F1 z krzyżowania odwrotnego wszystkie zregenerowane rośliny były męskopłodne lub częściowo męskopłodne. Przyczyną braku roślin całkowicie męskoniepłodnych w krzyżowaniach odwrotnych według autorów jest niska ogólna liczba roślin otrzymanych w kulturach pylnikowych. Rośliny uzyskane w wyniku przeprowadzonych krzyżowań pojedynczych, gdzie komponentami były podwojone haploidy męskosterylne i męskopłodne, wykazały wysoki stopień heterozji.

4. Krzyżowania międzygatunkowe i międzyrodzajowe

Mieszańce oddalone stanowią interesujący materiał do badań genetycznych i prac hodowlanych, a ponadto dostarczają danych o pokrewieństwie fiologentycznym krzyżowanych taksonów (98). Tworzenie mieszańców oddalonych ograniczają lub uniemożliwiają różne bariery. Na przykład w międzyrodzajowym krzyżowaniu gatunków z rodzaju *Hordeum*, *Secale* i *Triticum* ziarniaki bardzo często zamierają przed dojrzeniem, a uzyskane zarodki mieszańcowe wykazują bardzo szeroki wachlarz zaburzeń rozwojowych. Najbardziej znanym wyjątkiem z tej grupy roślin jest możliwość otrzymania w warunkach naturalnych dojrzałych ziarniaków i roślin z krzyżowania pszenicy z żytem.

Od lat prowadzone są prace nad otrzymywaniem mieszańców między *H. jubatum* a *S. cereale* przez Wojciechowską (99-102). Otrzymywane zarodki mieszańcowe wykładano na pożywki Linsmaier i Skoog (103), B5 (99-102,104) zwykle uzupełniane 2,4-D. Zarodki wykładane na pożywkę znajdowały się w różnych stadiach rozwoju. Zarodki będące w stadium globularnym i dodatkowo zniekształcone wykładano na pożywkę z 2,4-D w celu zaindukowania kalusa. Powstały tą drogą kalus pasażowano na pożywki różniące się stężeniem auksyn. Wynikiem tego była regeneracja roślin zarówno na drodze organogenezy jak i somatycznej embriogenezy (105). Kolejnym krokiem zwiększającym efektywność regeneracji roślin z zarodków mieszańcowych *H. vulgare* x *S. cereale* było podanie na kwiatki roztworu GA₃ w ciągu 24-48 godzin od zapylenia (106). Do czasów obecnych uzyskano szereg mieszańców *H. jubatum* x *S. cereale*, *H. vulgare* x *S. cereale*, *Triticum* (4x) x *Secale*, *Triticale* x *Secale* (107,108) jak również *Aegilops* x *Secale* (109).

5. Transformacja żyta

Transformacja genetyczna roślin polega na wprowadzeniu do komórek egzogenego DNA, a następnie jego integracji z genomem biorcy i ekspresji transgeny. Znanymi i stosowanymi jest kilka metod transformacji. W przypadku żyta tylko jedna z nich znalazła zastosowanie, jest to metoda wykorzystująca strzelbę genową (110-114). Jednak pierwsze transgeniczne rośliny żyta otrzymali de la Pena i wsp. (115) po wstrzyknięciu *in planta* DNA do młodych kwiatostanów. Wynikiem tego eksperymentu były dwie rośliny transgeniczne. O kolejnych transgenicznych roślinach żyta donosili Castillo i wsp. (110). W tych doświadczeniach otrzymano zielone transgeniczne rośliny, stosując strzelbę genową do wprowadzenia plazmidu pAHC25 zawierającego gen markerowy *uidA* i selekcyjny *bar*. Eksperymenty prowadzono z trzema rodzajami eksplantatów: niedojrzałymi zarodkami, młodym embriogenicznym kalusem i 5-miesięczną embriogeniczną tkanką kalusową. Transgeniczny kalus otrzymano u wszystkich typów eksplantatów, co sugeruje, że komórki w różnym wieku są zdolne do przyjmowania i integracji transgeny, ale rośliny zregenerowano tylko z młodej embriogenicznej tkanki kalusowej. Według Krumbielgel-Schroeren i wsp. (19) efektywność regeneracji żyta w kulturach zarodków jest niska i spada szybko wraz ze starzeniem się kultury. O kolejnych transgenicznych roślinach żyta donosili również Castillo i wsp. (111). Poddając transformacji takie same typy eksplantatów jak uprzednio i stosując ten sam konstrukt, wyselekcjonowali na pożywkę selekcyjnej zawierającej 5-30 mg dcm⁻³PPT czternaście linii kalusa. Następnie przenieśli je na pożywkę regeneracyjną zawierającą 5 lub 10 mg dcm⁻³ Basta. Tylko z dwóch linii kalusa zregenerowano rośliny, w obu przypadkach kalus pochodził z zarodków, które transformowano po 18-25 dniach kultury. Otrzymane w tym doświadczeniu rośliny nie różniły się morfologicznie od roślin kontrolnych oraz były płodne. Przeprowadzone analizy *Southern blot* potwierdziły obecność obu genów w genomie roślin pokolenia R0 i R1.

W Polsce również prowadzone są prace nad otrzymaniem transgenicznych roślin żyta w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie (112) oraz w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin w SGGW w Warszawie (informacja ustna Rakoczy-Trojanowska, 2000). Sowa i wsp. (112) podobnie jak inni autorzy otrzymali transgeniczne rośliny żyta przy użyciu strzelby genowej. Obiektem transformacji były niedojrzałe zygotyczne zarodki żyta. W eksperymencie wykorzystano plazmid pDB1, który zawierał gen reporterowy *uidA*, kodujący β-glukuronidazę pod kontrolą promotora aktywny ryżu oraz gen markerowy *bar*, kodujący acetylotransferazę fosfotrycyny pod kontrolą promotora 35S wirusa mozaiki kalafiora. Tylko dwie rośliny jarej odmiany Petka i jedna ozimej odmiany Tur po przeprowadzeniu badania histochemicznego wykazywały obecność enzymu β-glukuronidazy oraz przeżyły oprysk herbicydem Basta. Przeprowadzona analiza *Southern blot* i PCR potwierdziły obecność obu genów markerowych w genomach badanych roślin. Według Sowy i wsp. (112) na efektywność transformacji wpływają trzy czynniki: 1) metoda

transformacji, 2) efektywność somatycznej embriogenezy i 3) zdolności regeneracyjne tkanki transformowanej. Ponieważ w przypadku żyta zarówno efektywność somatycznej embriogenezy jak i regeneracji jest bardzo niska w porównaniu do innych roślin zbożowych, dlatego tak trudno jest otrzymać transgeniczne rośliny żyta. W kolejnej pracy Sowa i wsp. (113) zanim przystąpili do eksperymentów nad transformacją, przebadali 50 różnych genotypów żyta pod kątem ich zdolności do somatycznej embriogenezy. Wybrano 6 z nich do których wprowadzono dwa konstrukty jednocześnie: pDB1 oraz pAWact-Sec zawierający fragment 196 pz 5' genu *sec-1* żyta w orientacji antysensowej pod kontrolą promotora Act-1. Transformowano 6914 niedojrzałych zarodków, które uprzednio hodowano na pożywcze w obecności Dicamby przez 2-6 dni. Po etapie selekcji zregenerowano 117 roślin, z których tylko 15 przeżyło oprysk herbicydem Basta. Przeprowadzona analiza PCR i *Southern blot* na obecność genów *bar* i *uidA* wykazała obecność obydwu genów tylko w genomie siedmiu roślin, a tylko dwie z nich posiadały transgen pAWact-Sec.

6. Podsumowanie

W przedstawionym przeglądzie literatury z ostatniego dziesięciolecia wskazujemy, że możliwości manipulacji genomem żyta są nadal ograniczone. Wynika to z recesywnego charakteru cech, które w warunkach kultur *in vitro* odgrywają pierwszoplanową rolę. Mając na uwadze postęp biologii molekularnej i możliwość izolacji genów odpowiedzialnych za morfogenezę oraz opanowanie podstawowych techniki kultur *in vitro* żyta należałoby dokonać takiej transformacji dzięki której wprowadzono by dodatkowe geny zdolności morfogenetycznych odpowiedzialne za somatyczną i haploidalną embriogenezę. Autorzy wierzą, że taki wynik z pewnością przyczyniłby się do lepszego wykorzystania biotechnologii w genetyce i hodowli żyta.

Literatura

1. Rocznik statystyczny, (1999), ZWS.
2. Bushuk W., (1976), *Rye-production, chemistry and technology*, Am. Ass. Cer. Chem., St. Paul, Minn.
3. Tarkowski Cz., (1983), *Biologia żyta*, PWN, Warszawa.
4. Kowalczyk Cz., Ratajczak P., (1994), w: *Żyto, chemia i technologia*, PWRiL, Warszawa, 11-19.
5. Oelke E. A., Oplinger E. S., Bahri H., Durgan B. R., Putnam D. H., Doll J. D., Kelling K. A., (2000), *Rye*, in: *Alternative Field Crops Manual*, Internet: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/rye.html>.
6. Ruebenbaur T., (1964), *Hodowla roślin*, PWRiL, Warszawa.
7. Hoffman W., Mudra A., Plarre W., (1979), *Szczegółowa hodowla roślin*, PWRiL, Warszawa.
8. Rybczyński J. J., (1990), *Euphytica*, 46, 57-70.
9. Steward F. C., Mapes M. O., Mears K., (1958), *Am. J. Bot.*, 45, 705-708.
10. Reinert J., (1959), *Planta*, 58, 318-333.
11. Eapen S., Rao P. S., (1985), *Euphytica*, 34, 153-159.
12. Lu C., Chandler S. F., Vasil I. K., (1984), *J. Plant Physiol.*, 115, 237-244.

13. Zimny J., Lörz H., (1986), in: *Genetic Manipulation in Plant Breeding*, Eds. Horn W., Jensen C. J., Odenbach W., Schieder O., Walter de Gruyter, Berlin, 503-505.
14. Zimny J., Lörz H., (1989), *Plant Breed.*, 102, 89-100.
15. Rybczyński J. J., Zimny J., (1986), *Proc. of Eucarpia Meeting of the Cereal Section on Rye*, Svalov, (June 11-13), 33-53.
16. Zimny J., (1993), *Somatyczna embriogeneza żyta (Secale cereale L.) w kulturach in vitro*, IHAR, Radziaków, Blonie, 1-71.
17. Rakoczy-Trojanowska M., Malepszy S., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 86, 406-410.
18. Rakoczy-Trojanowska M., Malepszy S., (1995), *Euphytica*, 83, 233-239.
19. Krumbiegel-Schroen G., Finger J., Schroeren V., Binding H., (1984), *Z. Pflanzen.*, 92, 89-94.
20. Vazquez A. M., Espino F. J., Rueda J., Candela M., Sendino A. M., (1991), *Plant Cell Rep.*, 10, 265-268.
21. Norstog K., (1967), *Dev. Biol.*, 23, 655-670.
22. Gamborg O. L., Muller R. A., Ojimak K., (1968), *Exp. Cell. Res.*, 50, 151-158.
23. Blaydes D. F., (1966), *Physiol. Plant.*, 19, 748-753.
24. White P. R., (1954), *The cultivation of animal and plant cell*, Ronald Press., Co., N.Y.
25. Heller R., (1953), *Ann. Sc. Nat. Bot. et Biol. Veg.*, 14, 1-223.
26. Burstrom H., (1941), *Bot. Noits*, 94, 310-334.
27. Potrykus I., Harma C. T., Lörz H., (1979), *Theor. Appl. Genet.*, 54, 209-214.
28. Dudits D., Hadlaczy G., Levi E., Fejer O., Haydu Z., Lazar O., (1977), *Theor. Appl. Genet.*, 51, 127-132.
29. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
30. Vasil V., Vasil I. K., (1981), *Am. J. Bot.*, 68, 864-872.
31. Linacero R., Vasques A. M., (1986), *Plant Sci.*, 44, 219-222.
32. Immonen S., Anttila H., (1996), *Int. Symposium on Rye Breeding and Genetics*, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany (27-29 June), *Votr. Pflanzen.*, 35, 237-244.
33. Deimling S., T. Flehinghaus-Roux, (1997), *Haploidy in rye*, in: *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*, Eds. Jain S. M., Sporyi S. K., Veilleux R. E., Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, vol. 4, 181-204.
34. Wenzel G., Uhring H., (1981), *Theor. Appl. Genet.*, 59, 333-340.
35. Lazar M. D., Schaeffer S. W., Baenzinger P. S., (1984), *Theor. Appl. Genet.*, 67, 131-134.
36. Wenzel G., Foroughi-Wehr B., (1984), in: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Ed. Vasil I. K., Academic Press Inc., 311-327.
37. Barloy D., Denis L., Beckert M., (1989), *Maydica*, 34, 303-308.
38. Orlikowska T., (1977), *Genet. Pol.*, 18, 51-59.
39. Sharma G. C., Wang W. C., Sapra V. T., (1982), *Cereal Res. Comm.*, 10, 143-150.
40. Milewska-Pawliczuk E., (1987), *Biol. Plant.*, 29, 295-298.
41. Lorenz I., (1989), *Arch. Züchtungsforsch. Beril.*, 19(6), 415-420.
42. Wenzel G., Hoffman F., Thomas E., (1976), *Theor. Appl. Genet.*, 48, 201-208.
43. Wenzel G., Hoffman F., Thomas E., (1977), *Theor. Appl. Genet.*, 51, 81-86.
44. Hoffman F., Wenzel G., (1981), *Theor. Appl. Genet.*, 60, 129-133.
45. Flehinghaus T., Deimling S., Geiger H. H., (1991), *Plant Cell Rep.*, 10, 397-400.
46. Hörlein A. J., (1991), Ph. D. Thesis, University of Hohenheim, Stuttgart.
47. Rakoczy-Trojanowska M., Śmiech M., Malepszy S., (1997), *Plant. Cell Tissue Organ Cult.*, 48, 14-21.
48. Zenkteler M., Misiura E., (1974), *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, 165, 337-340.
49. Thomas E., Hoffman F., Wenzel G., (1975), *Z. Pflanzen.*, 75, 106-113.
50. Daniel G., (1993), *Plant Breed.*, 110, 259-261.
51. Flehinghaus-Roux T., Deimling S., Geiger H. H., (1995), *Plant Breed.*, 114, 259-261.
52. Deimling S., Geiger H. H., (1996), *Votr. Pflanzen.*, 35, 225-235.
53. Wenzel G., Thomas E., (1974), *Z. Pflanzen.*, 72, 89-94.
54. Wenzel G., Foroughi-Wehr B., Friedt W., Köhler F., (1985), in: *Biotechnology in International Agricultural Research*, Proceedings, Manila, (April 23-27), 65-73.

55. Flehinghaus-Roux T., (1994), Ph. D. Thesis, University of Hohenheim, Stuttgart.
56. Immonen S., Anttila H., (1998), *Plant Sci.*, 139, 213-222.
57. Immonen S., (1999), *Plant Breed.*, 118, 319-322.
58. Malepszy S., (1975), *L. Bull. de L'acad. Pol. des Sci.*, 3, 167-172.
59. Jänhe A., Lörz H., (1995), *Plant Sci.*, 109, 1-12.
60. He D. G., Ouyang J. W., (1984), *Plant Sci. Lett.*, 33, 71-79.
61. Pan C. L., Kao K. H., (1978), In *Proc. Symp. Plant Tissue Culture*, 25-30 May, Science Press, Beijing, 133-142.
62. Forster B. P., Powell W., (1997), *Haploidy in barley*, in: *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*, Eds. Jain S. M., Spory S. K., Veilleux R. E., Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, 4, 99-115.
63. Sunderland N., Xu Z. H., (1982), *J. Exp. Bot.*, 33, 1086-1095.
64. Reynolds T., (1997), *Plant Mol. Biol.*, 33, 1-10.
65. Immonen S., Anttila H., (1999), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 57, 121-127.
66. Deimling S., Flehinghaus-Roux T., Schneider I., Geiger H. H., (1990), *Abs. 8th Int. Congress on Plant Tissue Culture*, Amsterdam, 195.
67. Ferrle A. M. R., Palmer C. E., Keller W. A., (1994), *Biotechnological applications of haploids*, by CRC Press. Inc., USA.
68. Anonymous, (1976), *Acta Genet. Sin.*, 3, 25-31.
69. Chu C. C., (1978), *Proc. Symp. Plant. Tissue Culture: Science Press, Beijing*, 43-50.
70. Bicar E. H., Darvey N. L., (1997), *Euphytica*, 97, 151-160.
71. Luckett D. J., Venkatanagapa S., Darvey N. L., Smithard R. A., (1991), *Aust. J. Plant Physiol.*, 18, 357-367.
72. Chu C. C., Wang C. C., Sun C. S., (1975), *Sci. Sinica*, 28, 659-668.
73. Müller A. J., Grafe R., (1978), *Molec. Gen. Genet.*, 161, 67-76.
74. Polsoni L., (1991), M. Sc. Thesis, The University of Guelph, Canada.
75. Wang X., Hu H., (1984), *Plant Sci. Lett.*, 36, 237-239.
76. Ouyang J. W., He D. G., Feng G. H., Jia S. E., (1989), in: *Recent Advance on Studies of Appl. and Fundamental Aspects of Plant Cell Engineering*, Eds. Kuo C. S., et. al., Sci. J. Press, Beijing, 122-125.
77. Immonen S., Anttila H., (2000), *J. Plant Physiol.*, 156, 204-210.
78. Deimling S., Flehinghaus-Roux T., Bohn M., Geiger H. H., (1992), *Abs. 13th EUCARPIA Congress, Angers, (July 6-11)*, 153-154.
79. Wernicke W., Kohlenbach H. W., (1976), *Z. Pflanzenphysiol.*, 79, 189-198.
80. Pierik R. L. M., (1987), *In Vitro Culture of Higher Plants*, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1-334.
81. Owen H. R., Wengerd D., Miller A. R., (1991), *Plant Cell Rep.*, 10, 583-586.
82. Wenzel G., Foroughi-Wehr B., Potrykus I., Thomas E., (1975), *Mol. Gen. Genet.*, 138, 293-297.
83. Rakoczy-Trojanowska M., Śmiech M., Malepszy S., (1996), *Genet. Pol.*, 37A, 223-226.
84. Rakoczy-Trojanowska M., Kwaśniak A., Malepszy S., (1997), *Zeszyty Naukowe AR, Kraków*, 318, 317-320.
85. Deimling S., Flehinghaus-Roux T., Röber F., Schechert A., Roux S. R., Geiger H. H., (1994), *Abs. 8th Int. Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze, (12-17 June)*, 95.
86. Laurie D. A., Bennett M. D., (1986), *J. Genet. Cytol.*, 28, 313-316.
87. Laurie D. A., (1989), *Plant Breed.*, 103, 133-140.
88. Laurie D. A., O'Donoghue L. S., Bennett M. D., (1990), *Gene Manipulation in Plant Improvement*, Ed. Gustafson J. P., Plenum Press, New York, 95-126.
89. Altenhofer P., Oertel C., Matzk F., (1997), *Curr. Topics in Plant Cytogenet. Related to Plant Improvement*, 310-317.
90. Immonen S., Taurianen A., Manninen O., (1999), in: *Anther and Pollen: From Biology to Biotechnology*, Eds. Clément C., Pacini E., Audran J. C., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 237-245.
91. Zhou H., Konzak C. F., (1992), *Genome*, 35, 957-961.
92. Kasha K. J., Ziauddin A., Cho U. H., (1990), in: *Gene Manipulation in Plant Improvement II*, Ed. Gustafson J. P., Plenum Press, New York, 213-234.

93. Quimio C. A., Zapata F. J., (1990), *Crop. Sci.*, 30, 188-192.
94. Ekiz H., Konzak C. F., (1991), *Crop Sci.*, 31, 1421-1427.
95. Larsen E. T., Tuveesson I. K. D., Anderson S. B., (1991), *Theor. Appl. Genet.*, 82, 417-420.
96. Sagi L., Barnabas B., (1989), *Theor. Appl. Genet.*, 78, 867-872.
97. Tuveesson I. K. D., Peterson S., Andersen S. B., (1989), *Theor. Appl. Genet.*, 71, 879-883.
98. Suliniowski S., (1982), *Wybrane zagadnienia z genetyki i hodowli traw*, w: *Trawy Polski*, red. Falkowski M., PWRL, Warszawa, 55-62.
99. Wojciechowska B., (1978), *Genet. Pol.*, 19, 265-285.
100. Wojciechowska B., (1982), *Genet. Pol.*, 23, 1-9.
101. Wojciechowska B., (1984), *Genet. Pol.*, 25, 247-255.
102. Wojciechowska B., (1985), *Genet. Pol.*, 26, 317-327.
103. Linsmaier E. M., Skoog F., (1965), *Physiol. Plant.*, 18, 100-127.
104. Gamborg L., Eveleigh D. E., (1968), *Can. J. Biochem.*, 46, 417-421.
105. Rybczyński J. J., Wojciechowska B., Ponitka A., (1986), *Genet. Pol.*, 27, 13-19.
106. Wojciechowska B., Pudelska H., (1995), *J. Appl. Genet.*, 36, 313-325.
107. Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A., (1993), *In vitro culture of Gramineae fertilized ovules*, in: *Proces Embryogenezy Rastlin in situ a in vitro*, Zboronik referatov zo VI konferenci rastlinnych embryologov Slovenska, Ceska a Polska: Nitra, (20-23 IX), 145.
108. Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A., Zwierzykowski Z., (1994), *Genet. Pol.*, 35, 135-142.
109. Wojciechowska B., (1996), *Genet. Pol.*, 37A, 174-178.
110. Castillo A. M., Vasil V., Vasil I. K., (1994), *Bio/technology*, 12, 1366-1377.
111. Castillo A. M., Vasil V., Vasil I. K., (1996), *Vort. Pflanzen.*, 35, 219-223.
112. Sowa S., Zimny J., Lörz H., (1997), *Zeszyty Naukowe AR, Kraków*, 318, 581-583.
113. Sowa S., Sowa A., Zimny J., (2000), *Biotechnologia*, 4 (51), 88-92.
114. Sowa S., Zimny J., Lörz H., (2000), *Abs.3th Int. Crop Science Congress*, 223.
115. De la Pena, Lörz H., Schell J., (1987), *Nature*, 325, 274-276.