



## Mikrospory zbóż w kulturach *in vitro*

S. Oleszczuk, J. Zimny

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

### *In Vitro* Culture of Cereal Microspores

#### Summary

The development of microspore culture methods in the *Poaceae* family has received considerable attention in recent years. Isolated microspore culture can be induced *in vitro* to switch their development from gametophytic to a sporophytic pathway, resulting in embryoid or callus formation. Different stresses like cold or heat shock and nitrogen starvation have been identified as the major trigger in inducing microspore embryogenesis. Microspore culture appears to be a promising tool for future production of double haploids in cereals. Isolated microspore culture has several advantages over anther culture in genetic manipulation and haploid study, such as: direct observation of microspore development, unique possibility to study plant embryogenesis, easier *in vitro* selection and mutation, easier transformation of single cells. Moreover, isolated microspores are the most efficient way of double haploid regeneration. Many factors such as genotypes, physiological status of donor plants, stage of microspores development, pretreatment of anthers or spikes, method of microspores isolation, culture media, nurse culture and culture conditions, have a great influence on microspore culture. These and other problems concerning *in vitro* culture of isolated microspore are discussed in this review.

#### Key words:

microspore culture, cereals, embryogenesis, doubled haploids.

#### Adres do korespondencji

Sylwia Oleszczuk,  
Zakład Biotechnologii  
i Cytogenetyki Roślin,  
Instytut Hodowli  
i Aklimatyzacji Roślin,  
Radzików,  
05-870 Błonie.

**biotechnologia**

2 (49) 142-160 2000

### 1. Wstęp

Historia kultur tkankowych liczy 100 lat. Przez cały ten czas zregenerowanie rośliny z pojedynczej komórki było wyzwaniem dla badaczy. Dziś niektóre techniki kultur *in vitro* osiągnęły poziom sztuki. Dzięki temu w wysoko wyspecjalizowanych labo-

ratoriach możliwe było prześledzenie rozwoju roślin od pojedynczej mikrospory, poprzez stadium zarodka, aż do dojrzałej rośliny.

*In vivo* mikrospory są komórkami pokolenia haploidalnego, a po asymetrycznym podziale jądra, rozwijają się w męski gametofit otoczony wykształconą sporodermą (ziarno pyłku). Procesy różnicowania mikrospor, pod wpływem specyficznych warunków, mogą ulec zmianie z gametofitowego na rozwój sporofitowy, co zasadniczo warunkuje powstawanie roślin haploidalnych – proces androgenezy (haploidalna embriogeneza). W kulturze *in vitro* może on zachodzić: a) bezpośrednio – z tworzących się zarodków powstają rośliny, b) pośrednio – z udziałem kalusa. W warunkach *in vitro* izolowane mikrospory stanowią grupę komórek strukturalnie jednorodnych, zdolnych do synchronicznego rozwoju przez co są doskonałym narzędziem w manipulacjach genetycznych, dają możliwość bezpośredniego śledzenia rozwoju, m.in. z tworzących się zarodków, umożliwiają przeprowadzenie selekcji rekombinantów pod względem określonej cechy, stanowią dogodny materiał w badaniach biochemicznych oraz do analizy procesu embriogenezy za pomocą technik molekularnych. Kultury mikrospor z powodzeniem mogą być wykorzystane do produkcji roślin homozygotycznych. Otrzymywanie haploidów i podwojonych haploidów metodami stosowanymi w kulturach izolowanych mikrospor pozwala na skrócenie cyklu otrzymywania linii homozygotycznych do jednego pokolenia, podczas gdy uzyskanie takich linii w hodowli tradycyjnej trwa ponad 6 pokoleń. Poza tym mikrospory mogą być wykorzystane do otrzymywania roślin transgenicznych o pożądanym cechach.

Otrzymanie roślin z izolowanych mikrospor wymaga znajomości technik i metod izolacji oraz kultury wyizolowanych mikrospor i temu poświęcony jest ten artykuł.

## 2. Genotyp rośliny wyjściowej

Czynnikiem decydującym o wydajności androgenezy jest m.in. genotyp rośliny. Różnice między genotypami są związane z działaniem czynników genetycznych. **Reakcje** mikrospor – wyizolowanych z różnych rodzajów, gatunków, a nawet odmian roślin – na te same warunki wzrostu i rozwoju są **najczęściej odmienne** i wyrażają się mniejszą lub większą zdolnością do wytwarzania zarodków, a następnie zielonych roślin. Na podstawie danych z wielu przeprowadzonych eksperymentów można stwierdzić, że rozwój mikrospor warunkowany jest poligenicznie, a zdolność mikrospor do embriogenezy może być modyfikowana przez szereg czynników (1). Bardziej podatne na androgenezę są rośliny poliploidalne aniżeli rośliny diploidalne (2). Genotypową zależność między zdolnością mikrospor do regeneracji a liczbą regenerantów wykazano u jęczmienia (3-6), pszenicy (7-11) i ryżu (12,13). Liczba zregenerowanych roślin jęczmienia odmiany Igrí wynosiła 759 na  $1 \times 10^5$  żywotnych mikrospor i była wyższa w porównaniu z odmianą Gimpel (232 na  $1 \times 10^5$  żywotnych mikrospor). Natomiast częstość inicjowania podziałów była wyższa u Gimpel (28%) niż

u Igri (14%) (14). Wśród odmian jęczmienia wyodrębniono odmiany charakteryzujące się wysoką zdolnością do regeneracji, gdzie wskaźnik regeneracji w kulturze pylników wynosił kilkadziesiąt roślin na 100 pylników (Igri, Tapir), i niską zdolnością do regeneracji – wskaźnik regeneracji nie przekroczył kilku procent (Digger, Alis) (15). Podobne rezultaty otrzymano u testowanych odmian pszenicy (16). U pewnych genotypów w ogóle nie zregenerowano roślin (Miradur, Farmer), a u najlepszych odmian zregenerowano 20 roślin na 1000 wyłożonych pylników (Florida).

### 3. Warunki wzrostu i rozwoju roślin

Liczba wyizolowanych mikrospor, zdolnych do podziałów i regeneracji, może być znacząco różna między odmianami w obrębie gatunku, co często spowodowane jest reakcją tych roślin na działanie odmiennych warunków wzrostu i rozwoju roślin – jako dawców eksplantatów. Temperatura, fotoperiod, jakość i intensywność oświetlenia oraz poziom nawożenia mają wpływ na wzrost i rozwój roślin (17). Wzrost roślin pszenicy (18) i jęczmienia (19,20) w niskich temperaturach miał pozytywny wpływ na dalsze etapy kultury. Większą żywotność i liczbę dzielących się mikrospor (około 5-krotnie) otrzymano uprawiając pszenicę w wyższej (18°C dzień/15°C noc) w porównaniu z niższą temperaturą (15°C dzień/12°C noc) (62). Uprawa kukurydzy w niższej temperaturze wpłynęła na dwu-trzykrotny wzrost liczby struktur zarodkopodobnych w porównaniu z roślinami uprawianymi w wyższej temperaturze (21).

Warunki uprawy roślin jęczmienia, pszenicy (22) oraz ryżu (23-25) dla uzyskania dobrego materiału do kultury *in vitro* były najbardziej sprzyjające w szklarni. Rośliny kukurydzy uprawiane w pokoju hodowlanym (26), szklarni (27) jak i na polu (28) były w podobnym stopniu dobrymi dawcami mikrospor. Niewłaściwy termin siewu (np. zbyt późny) roślin rodzicielskich może wpłynąć ujemnie na regenerację roślin z mikrospor. Wpływ terminu siewu roślin donorowych na rozwój mikrospor badano u ryżu. Stwierdzono, że tylko kalus uzyskany z mikrospor izolowanych z roślin wysadzonych w pierwszym (25.05) i drugim (15. 06) terminie był zdolny do regeneracji zielonych roślin (29). Z danych literaturowych wynika, że warunki uprawy decydujące o wigorze roślin-donorów powinny być pod ciągłą kontrolą.

### 4. Stadium rozwojowe mikrospor

Podstawowym warunkiem umożliwiającym indukcję androgenезy jest odpowiednio dobrane stadium rozwojowe mikrospor. Określa się je za pomocą mikroskopowych obserwacji cytologicznych. Najbardziej podatne na androgenезę są pylniki zawierające mikrospory zwakuolizowane (2), ze ściennym położeniem jądra. U kukurydzy, wśród testowanych różnych stadiów rozwojowych, tj. komórek macie-

rzystych mikrospor, diad, tetrad, wolnych mikrospor oraz pyłku, tylko mikrospory uwolnione z tetrad wykazywały zdolność tworzenia sporofitu (30). Istnieją przypuszczenia, że genotypy, które w jednym pylniku zawierają mikrospory w różnych stadiach rozwojowych, charakteryzują się niewielką zdolnością do embriogenezy. Właściwa faza rozwoju kłosów czy wiech warunkuje efektywną regenerację z mikrospor. Stwierdzono, że stadium mikrospory jest ściśle związane ze stadium rozwojowym rośliny. Zwiększenie liczby embriogennych struktur jęczmienia uzyskano izolując mikrospory z kłosów w odpowiedniej fazie wzrostu (31). W praktyce, wstępna selekcja kłosów zbóż polega na oszacowaniu grubości źdźbeł oraz długości odcinka pomiędzy liściem flagowym a liściem podflagowym. U jęczmienia, najczęściej pobierano kłosa zawierające w pylnikach mikrospory w stadiach od średnio do późno jednojądrowych (32-39). W kulturze mikrospor pszenicy, brano pod uwagę kłosa posiadające pyłek w stadiach rozwojowych od późnoodnojądrowych do wczesnodwukomórkowych (8,9,40-42). Wiechy ryżu ścinano w stadiach od wczesnoodnojądrowych mikrospor do wczesnodwukomórkowych ziaren pyłku (3,24,25). Wiechy kukurydzy pobierano zwykle w stadiach od późnoodnojądrowych mikrospor do wczesnodwukomórkowych ziaren pyłku (26,28,43,44).

## 5. Traktowanie wstępne kłosów i wstępna kultura pylników

Zmiana kierunku rozwoju mikrospor, z gametofitowego na sporofitowy, wymaga zadziałania odpowiedniego sygnału, którym mogą być: szok termiczny (drastyczne podwyższenie lub obniżenie temperatury), zanurzenie pylników w pożywce pozbawionej regulatorów wzrostu, „głodzenie” pylników w pożywce bez cukrów lub azotu, traktowanie kolchicyną (45,46). U większości gatunków czynnikiem powodującym zaburzenie „równowagi” wewnętrznej pylnika jest niska, dodatnia temperatura. Przechowywanie kłosów w warunkach chłodu wpływa na indukowanie androgenezy. Chłodzenie roślin może zaburzyć biegunowość cytoplazmy i zakłócić kierunek tworzenia się wrzeciona, co prowadzi do zmiany drogi rozwoju mikrospor w kierunku tworzenia zarodków (42). Traktowanie kłosów chłodem przedłuża żywotność pylników, może sprzyjać synchronizacji podziałów jądrowych oraz inaktywacji substancji hamujących androgenezę (47). Chłód wpływa na polaryzację cytoplazmy mikrospor i zakłóca podziały jądra w wyniku dezorganizacji i rozpadu mikrotubul. Optymalny czas chłodzenia kłosów lub wyizolowanych pylników zależy od genotypu (6) i dlatego musi być ustalany dla każdego gatunku odrębnie. Kłosa jęczmienia, przed izolacją mikrospor, były przechowywane w ciemności w 4°C przez 2 tygodnie (3), 4 tygodnie (48) lub od 2-5 tygodni (36). Kłosa pszenicy chłodzono od 0 do 14 dni (8,41,49,50). W zależności od intensywności i czasu chłodzenia pylników pszenicy uzyskano różną efektywność tworzenia się kalusa (51). Preinkubacja selekcyjonowanych kwiatów kukurydzy w płynnej pożywce w 8°C przez 10-14 dni była najbardziej skutecznym sposobem indukowania podziałów mikrospor (30).

W kulturze pylników i kulturze izolowanych mikrospor zalecana jest preinkubacja wiech kukurydzy w temperaturze 7-8°C przez 14 dni (43,52,53). Dłuższe chłodzenie wiech kukurydzy może mieć czasami pozytywny wpływ na dalszą kulturę mikrospor *in vitro*. Gaillard i inni (26) wykazali, że 18-dniowe przetrzymywanie wiech kukurydzy w 7°C spowodowało wzrost liczby mikrospor zdolnych do wytworzenia zarodków. Zakresy stosowanej temperatury podczas wstępnego traktowania i czasu we wstępnej kulturze mikrospor ryżu były różne (13,23,25,29,54). Kłosa żyta umieszczone w roztworze soli poddawano najczęściej działaniu temperatury 26°C przez 5-7 dni (J. Kumlehn – doniesienie ustne).

Wstępne traktowanie polega na poddaniu szokowi termicznemu całych kłosów oraz wiech, a wstępna kultura (prekultura) dotyczy wyizolowanych pylników. Prekulturę pylników zazwyczaj prowadzi się przez 3-4 dni na pożywce z mannitolem (9,20,23,24,49,55-58). W kulturze mikrospor jęczmienia najwięcej zarodków i zielonych roślin uzyskano po 4-dniowej kulturze pylników umieszczonych w mannitolu w 25°C. Takie głodzenie pylników, zdaniem niektórych autorów, przeważa w uzyskaniu wyższej efektywności androgenezy nad szokiem termicznym (14 dni w 4°C) (59). W kulturze mikrospor pszenicy wstępna kultura pylników w mannitolu (7 dni w 28°C) wpłynęła znacznie na wzrost liczby wielokomórkowych struktur, w porównaniu do liczby takich struktur uzyskanych z mikrospor wyizolowanych z kłosów, które były chłodzone (28 dni w 4°C) (60). Regeneracja roślin w kulturze pylników jęczmienia (po zastosowaniu fitohormonu) była możliwa bez prekultury pylników w mannitolu, ale użycie mannitolu zwiększyło 10-krotnie liczbę zregenerowanych roślin (61). Nie obserwowano podziałów w wyizolowanych mikrosporach ryżu bez wstępnej kultury pylników lub wiech w mannitolu (12). Są również doniesienia, głównie dotyczące kukurydzy, w których prowadzono efektywną kulturę mikrospor bez traktowania mannitolem (26,52) i bez wstępnego traktowania wiech (62,63). Prekultura pylników ryżu w 24°C przez 3 dni + 27°C przez 2 dni lub 35°C przez 1 dzień + 27°C przez 4 dni dawała lepsze rezultaty niż wstępna kultura w 27°C przez 5 dni (29).

U zbóż udało się zaindukować androgenezę poddając materiał wyjściowy krótkiemu działaniu niskiej temperatury (42,64), wysokiej temperatury (64-66) lub pominięto zabiegi chłodzenia (11,49,67). Z szerokiego przeglądu literatury wynika, że warunki wstępnej kultury powinny być zoptymalizowane dla każdej odmiany.

## 6. Metody izolacji mikrospor

Izolacja ma na celu uwolnienie jak największej liczby mikrospor bezpośrednio z wypreparowanych pylników lub z całych kłosów czy wiech, przy użyciu różnych technik. Pierwsze eksperymenty z kulturą izolowanych mikrospor zbóż opierały się na technikach opracowanych dla tytoniu (68). Pylniki tytoniu umieszczane w specjalnych pożywkach zawierających wysokie stężenie cukrów pękały, a wydostające się

z pylników nieuszkodzone mikrospory rozwijały się w kalus. Najczęściej spotykane są obecnie modyfikacje tej techniki polegające na uwalnianiu pobudzonych do androgenezy mikrospor (po wstępnej kulturze pylników) i ich dalszej kulturze – w obecności lub bez udziału pylników. Skuteczną techniką, jak się okazało, były również kultury ziaren pyłku na powierzchni pylników, które spełniały rolę „niańki”. W tym przypadku pyłek odizolowany był od pylników specjalną bibułą (47).

Z uwolnionego pyłku (*shed pollen culture*) w kulturze jęczmienia (57,69-71), pszenicy (7,8,72) i ryżu (12,25,73) zregenerowano kalus i rośliny po uprzedniej 2-7-dniowej wstępnej kulturze pylników. Stosując kulturę uwolnionego pyłku, po 25 dniach od pobrania materiału, zregenerowano rośliny jęczmienia (39). Największą liczbę kalusów uzyskano stosując ciągłą kulturę pylników w płynnej pożywce z uwolnionymi mikrosporami *in situ* (*in situ shed microspores*), w porównaniu z liczbą kalusów uzyskanych innymi metodami izolacji (74). Modyfikację kultur uwolnionych mikrospor zastosowano w kulturze ryżu i pszenicy, pylniki poddawano wstępnemu traktowaniu w płynnej pożywce przez 7-10 dni, a następnie za pomocą wirowania otrzymano wolne mikrospory (8-10,23,24).

Jedną z metod mechanicznej izolacji mikrospor jest rozgniatanie pylników i przeciskanie ich przez sita o ustalonej wielkości oczek. Technikę taką wykorzystano u pszenicy (8,11,40), jęczmienia (33,35,37,58,75-78), kukurydzy (28,30,52,79,80) i ryżu (13).

Inna i coraz częściej stosowana metoda izolowania mikrospor związana jest z użyciem blendera, który w swym działaniu przypomina pracę młynka do kawy. Blender umożliwia szybką izolację znacznej liczby mikrospor, co z powodzeniem wykorzystano w kulturze, bowiem zregenerowano rośliny z mikrospor jęczmienia (3,14,38,81), pszenicy (41,42,82), kukurydzy (26,43,77,83), pszenżyta (84) i żyta (J. Kumlehn – doniesienie ustne).

Największą liczbę wyizolowanych mikrospor oraz najlepszą regenerację roślin jęczmienia (37) i kukurydzy (52,79) uzyskano stosując blender w porównaniu z metodą maceracji. Wykorzystanie blendera do izolacji mikrospor zapewniło uzyskanie największej (75%) liczby żywotnych mikrospor pszenicy w porównaniu do innych metod (8). Istnieją gatunki wymagające łagodniejszej procedury, dlatego też czasami preferowana jest technika oparta na samoistnym uwalnianiu się mikrospor z pylników (20).

## 7. Dymorfizm i żywotność mikrospor

Obserwacje *in vitro* pozwoliły wyróżnić cztery typy mikrospor, w zależności od sposobu ich różnicowania się. Pierwszy typ – A, zwanym typem komórki wegetatywnej określono m.in. u jęczmienia i pszenżyta. Charakterystyczne są dla tego typu asymetryczne podziały jąder mikrospor, po których powstawały potomne jądra komórki wegetatywnej i generatywnej. Dalszym podziałem mitotycznym podlegała

tylko komórka wegetatywna tworząc wielokomórkową strukturę, co następnie prowadziło do pęknięcia egzyny. Z takich „odsłoniętych” struktur różnicowały się kalus i zarodki. Drugi typ – B, zwany typem komórki generatywnej, oraz trzeci typ – C, tj. typ komórki wegetatywnej i generatywnej, opisano u niektórych gatunków zbóż, ale występowały one z mniejszą częstością. Czwarty, typ – D, najczęściej obserwowany u ryżu i pszenicy, zwany był typem mikrospory. W tym przypadku charakterystyczne są symetryczne podziały jądra w mikrosporze prowadzące do tworzenia się dwóch nieodróżnionych komórek, z których w następstwie podziałów mitotycznych powstawał kalus lub zarodki (2).

Podczas wstępnego traktowania kłosów, wstępnej kultury pylników oraz izolacji mikrospor część wyizolowanych mikrospor traci swoją żywotność i wykazuje dymorfizm. Identyfikacji różnych typów mikrospor ryżu dokonano przy użyciu metody polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) (85). Wyizolowane mikrospory ryżu po wstępnej kulturze w mannitolu wykazywały dymorfizm w porównaniu z mikrosporami bez prekultury z mannitolem (12). U jęczmienia, po mechanicznej izolacji zaobserwowano dwa rodzaje mikrospor: 1) małe, splazmolizowane, nie wykazujące zdolności do podziałów, 2) duże, bogate w cytoplazmę wykazujące zdolność do androgenezy (34,37). Takie zróżnicowanie mikrospor, tłumaczono jako skutek wstępnej kultury, a nie rezultat mechanicznej izolacji ponieważ w pylnikach podczas wstępnego traktowania obserwowano obecność małych, „ginących” mikrospor. Dwa typy cytoplazmy w mikrosporach jęczmienia opisali Bolik i Koop (32). Pierwszym typem była cytoplazma embriogenna o charakterze granularnym, natomiast nieembriogenna cytoplazma (drugi typ) była gładka i gwiaździsta. Embriogenne mikrospory kukurydzy (43) i pszenicy (7) charakteryzowały się obecnością dużej wakuoli. Inną podstawą klasyfikacji mikrospor było zabarwienie sporodermy. Dla embriogennych mikrospor ryżu charakterystyczna była czerwona barwa egzyny (24). Sporoderma w mikrosporach jęczmienia miała czerwone i niebieskie zabarwienie, ale embriogenne były tylko mikrospory z niebieską „otoczką”, u których egzyna pękała (37).

Po wyizolowaniu mikrospor z pylników jest możliwe rozróżnienie mikrospor żywotnych od nieżywotnych za pomocą barwnika fluorescencyjnego (FDA – *fluorescein diacetate*) (86). Stwierdzono, że stosunek mikrospor żywotnych do nieżywotnych w kulturze jęczmienia wynosił 1:3 (14). U jęczmienia (35,37), pszenicy (65) i kukurydzy (26) w celu rozdzielenia obu typów mikrospor przeprowadzono wirowanie w gradiencie Percollu. Do rozdzielenia dwóch typów mikrospor użyto też wirowania w roztworze 19 lub 20% maltozy (14,40,42,81,84). Duże mikrospory były skupione w formie „obrączki” na granicy faz, zaś małe w postaci osadu na dnie próbki. Oddzielenie żywotnych od nieżywotnych mikrospor przyczyniło się do wzrostu liczby uzyskanych zarodków i zregenerowanych roślin w kulturze mikrospor jęczmienia (31), ale całkowita liczba otrzymanych zielonych roślin w tej kulturze była dwukrotnie wyższa w kulturze, gdzie znajdowały się wszystkie mikrospory.

## 8. Pożywki stosowane w kulturach mikrospor

W większości badań przeprowadzonych z wykorzystaniem kultur pylników i mikrospor zbóż zmierzano do optymalizacji składu podłoża. Wśród testowanych substancji wchodzących w skład pożywki ważną rolę odgrywają przede wszystkim związki azotowe, cukry oraz regulatory wzrostu. Wykazano, że zainicjowanie podziałów, różnicowanie i regeneracja roślin z mikrospor jęczmienia można regulować przez odżywianie azotowe (14). Znaczący wpływ na regenerację z mikrospor miał stosunek  $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$  oraz stosunek azotu nieorganicznego do organicznego. W pożywce azot w ilości 20-35 mM (całkowita ilość), przy czym stosunek  $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$  wynosił 90:10, a nieorganicznego do organicznego pomiędzy 90:10 a 71:29, wpłynął korzystnie na liczbę zregenerowanych roślin. Uzyskano wzrost liczby zielonych roślin w kulturach pylników przez obniżenie w pożywce stężenia azotanu amonu i użycie glutaminy jako nietoksycznego źródła azotu (87).

Przeprowadzono również badania wpływu węglowodanów na embriogenezę z mikrospor zbóż. Jako źródło węglowodanów stosowano m.in. sacharozę w doświadczeniach z kukurydzą (26,28,30,43). Wzrost poziomu sacharozy w pożywce (8,0-9,5%) spowodował zwiększenie liczby zregenerowanych roślin z mikrospor kukurydzy (52). Z pozytywnym skutkiem zastępowano maltozą glukozę, sacharozę (74) oraz fruktozę (38). Podtrzymała ona rozwój kalusa i zarodków jęczmienia. Za optymalne stężenie maltozy dla mikrospor jęczmienia w pożywce indukującej przyjęto 90 g/l (3). W innych badaniach, gdzie mikrospory jęczmienia hodowane w pożywce zawierającej maltozę w większym stężeniu niż pożywka używana do izolacji, tworzyły większą liczbę kolonii w porównaniu z hodowanymi w pożywce z takim poziomem maltozy co pożywka izolacyjna (76). Maltoza i melobioza korzystnie wpływały na podziały komórkowe i tworzenie się mikrokalusa z mikrospor jęczmienia, a sacharoza, cellobioza i glukoza miały wpływ hamujący (36). Maltoza była też stosowana jako źródło węglowodanów w kulturze mikrospor pszenicy (11,20,49, 88,89) i ryżu (12,13). Wykazano, że liczba mikrospor nieembriogennych może zależeć od koncentracji cukrów w pożywce i od długości okresu inkubacji mikrospor w obecności tych cukrów. Węglowodany, obok korzystnego działania, w niektórych okolicznościach mogą mieć działanie ujemne. Wykazano, że różnicowanie mikrospor jęczmienia może być zakłócone w obecności glukozy i sacharozy (90,91). Mikrospory umieszczone w pożywce, która zawierała wyższe stężenie glukozy, zamierały po dwóch dniach. Natomiast cukier ten dodany do pożywki po drugim dniu kultury nie wywoływał ujemnych skutków. Sacharoza również powodowała zamieranie mikrospor, ale wyeliminowanie jej po sześciu godzinach z pożywki wpłynęło na utrzymanie żywotności tych mikrospor.

Do składników pożywek odgrywających ważną rolę w kulturze *in vitro* należą również regulatory wzrostu takie jak auksyny i cytokininy. Spośród cytokinin używanych w kulturach pylników i mikrospor jęczmienia najczęściej stosowana była 6-benzylamino-puryna (BAP) (14,34,38,81). Częstość regeneracji w kulturach mi-



krospor jęczmienia była podobna przy zastosowaniu auksyny kwasu 2,4-dwuchloro-fenoksyoctowego (2,4-D) jak i BAP. Po wstępnej kulturze w mannitolu najwięcej roślin jęczmienia zregenerowano stosując 2,4-D w stężeniu  $10^{-6}$  mol/L (61). Natomiast bez wstępnej kultury z mannitolem, wyższa koncentracja i dłuższa obecność 2,4-D w pożywce, spowodowała regenerację 1 zielonej rośliny z pylnika. W kulturze mikrospor pszenicy, użyto auksyny w pożywce indukującej (11,42). W kilku pracach stosowano połączenia auksyny i cytokininy (12,33,39,76,77,92). Odpowiednia kombinacja stosowanych auksyn 2,4-D, NAA (kwas  $\alpha$ -naftylooctowy) oraz BAP, w kulturze mikrospor ryżu, wpłynęła na tworzenie się kalusa. Zastosowanie w pożywce regeneracyjnej kombinacji auksyny – IAA (kwas  $\beta$ -indoliloctowy) i cytokininy – kinetyny (6-furfuryloaminy) miało korzystny wpływ na różnicowanie się i rozwój zielonych roślinek (13). Po zastosowaniu kwasu fenyllooctowego (PAA), jako jedynego regulatora wzrostu w pożywce, zregenerowano z mikrospor jęczmienia trzy razy więcej zielonych roślin (58). PAA stosowano również w kulturze mikrospor pszenicy (10,33). W kulturach mikrospor kukurydzy pozytywny efekt dało zastosowanie TIBA (2,3,5-trzyjodobenzoesowy) w stężeniu 0,1mg/l (30), chociaż najczęściej używana w tych kulturach pożywka nie posiadała fitohormonów (26,28,43). Z przytoczonych przykładów wynika, że istnieje duża zależność między zdolnością genotypu do tworzenia kalusa, zarodków i zielonych roślin a składem pożywek indukujących i regeneracyjnych, stąd konieczność indywidualizacji optymalnego składu pożywek indukujących i regeneracyjnych.

Decydującą rolę, w rozwoju mikrospor i pylników *in vitro*, odgrywają rodzaje pożywek – płynne lub stałe. Chociaż kultury mikrospor jęczmienia najczęściej prowadzono w pożywkach płynnych (14,34,37) podjęto próby umieszczenia ich w podłożach stałych. Przetestowano różne substancje zestalające i różną ich koncentrację. Na podłożach zestalonych agarozą częstość zainicjowania podziałów była niska, a rozwój agregatów występował sporadycznie. Na pożywce zestalonej preparatem Gelrite mikrospery dzieliły się i mogły być z nich regenerowane rośliny. Z danych literaturowych wynika, że mikrospery bardziej niż pylniki reagują na skład pożywek (81). W obecności Ficolu, dodanego do pożywek indukujących, w kulturach pylników obserwowano wzrost liczby wytworzonych zarodków i niższą względną częstość występowania albinosów. U jęczmienia dodanie Ficolu wpłynęło indukująco na tworzenie się zarodków z agregatów komórkowych (36) i powodowało 5-8-krotny wzrost tworzących się zarodków w porównaniu z Gelritem (31). Zaobserwowano, że Ficol „utrudniał” opadanie mikrospor, co zapobiegało ich kulturze w środowisku beztlenowym. Wpływ dostępności tlenu na kulturę mikrospor był brany pod uwagę także przez innych autorów (4,93).

Przy opracowywaniu składu pożywki należy uwzględnić wielkość ciśnienia osmotycznego, które uznano za ważny parametr. W kulturze mikrospor jęczmienia, w czasie wstępnego traktowania, podwyższenie ciśnienia osmotycznego do  $440 \text{ mOs} \cdot \text{kg}^{-1}$  spowodowało zwiększenie o 15% liczby embrionalnych struktur (34). Przy wyższym ciśnieniu osmotycznym w kulturze mikrospor kukurydzy obserwowano obniżenie liczby roślin albinotycznych, a wzrost liczby zielonych regenerantów (52).

## 9. Temperatura

Temperatura jest ważnym czynnikiem w kulturze *in vitro* wpływającym na właściwy rozwój struktur zarodkopodobnych z izolowanych mikrospor. Obniżenie temperatury z 28 do 15°C w ciągu pierwszych czterech dni kultury mikrospor kukurydzy, spowodowało dwukrotny wzrost liczby zarodkopodobnych struktur (52). Kultura mikrospor kukurydzy w ciągu 10 dni w wysokiej temperaturze (32°C), w porównaniu z ciągłą ich kulturą w niższej temperaturze (25°C), wpłynęła na tworzenie większej liczby struktur zarodkopodobnych (21).

## 10. Zagęszczenie mikrospor

Poziom regeneracji roślin może być zwiększony przez odpowiednie zagęszczenie mikrospor w pożywce i odpowiednią gęstość uzyskanych z nich kolonii. Zbyt duża gęstość mikrospor w pożywce powoduje powstawanie autotoksyn inhibujących ich rozwój. W kulturze, o optymalnej gęstości izolowanych mikrospor, tworzy się więcej roślin niż w kulturze pylników, gdzie gęstość mikrospor jest niekontrolowana. Zaletą kultury izolowanych mikrospor jest to, że każda z nich ma stały kontakt ze składnikami odżywczymi i regulatorami wzrostu znajdującymi się w pożywce (3). Dobór zagęszczenia mikrospor zależy od jakości donora. Mniejszą liczbę mikrospor w pożywce ( $5 \times 10^3 \div 2 \times 10^4/\text{ml}$ ) zastosowano u jęczmienia, używając roślin dobrej jakości (34). Poza tym gęstość miała wpływ na żywotność i rozwój mikrospor podczas dalszej kultury (31,32,37). Z badań Daviesa i Mortona (3) wynika, że różne gęstości mikrospor jęczmienia w kulturze oraz gęstości powstających kolonii miały wyraźny wpływ na regenerację. Największą liczbę kolonii z mikrospor otrzymano przy gęstości większej niż  $5 \times 10^4/\text{ml}$ , a uzyskane z nich kolonie przy 2,5-25 kolonii/cm<sup>2</sup> dały największą liczbę zielonych roślinek. U pszenicy niezbędną dla utrzymania żywotności mikrospor była gęstość rzędu  $2 \times 10^5$  mikrospor/ml (8). U kukurydzy optymalne zagęszczenie mikrospor w 1 ml pożywki wynosiło  $7-10 \times 10^3/\text{ml}$  (30) i  $6-8 \times 10^4/\text{ml}$  (26). U ryżu kształtowało się to w granicy  $8 \times 10^4$  mikrospor na szalkę (12), a u żyta wynosiło  $1,5 \times 10^5$  mikrospor/ml (J. Kumlehn—doniesienie ustne).

## 11. Wpływ załąźni na kulturę mikrospor

Wszelkiego rodzaju optymalizacja warunków kultury mikrospor zmierza do polepszenia warunków regeneracji roślin tzn. uzyskania jak największej liczby zielonych regenerantów. W celu zwiększenia efektywności podziałów mikrospor i liczby zarodków, a potem roślin stosuje się kultury wspomagające rozwój mikrospor czyli tzw. kultury „niańki” (*nurse culture*). Korzystny efekt działania takich kultur związany jest z dostarczeniem przez „niańkę” czynników indukujących rozwój mikrospor do

środowiska, w którym się one znajdują. W wielu eksperymentach jako kulturę wspomagającą stosowano załąźnię. Załąźnię pszenicy umieszczone obok mikrospor z pszenicy były konieczne do uzyskania z nich zarodkopodobnych struktur. Brak załąźni w kokulturze powodował zahamowanie rozwoju wielokomórkowych struktur po 2 tygodniach, niezależnie od składu pożywek (82). Wykazano, że załąźnię nie są konieczne do zaindukowania procesu androgenezy, ale są niezbędne do jego utrzymania w czasie dalszej kultury. W kulturze mikrospor pszenicy stwierdzono wzrost liczby wytworzonych zarodków i płodnych roślin spowodowany użyciem załąźni jęczmienia lub pszenicy (42). W kokulturze z załąźniami pochodzącymi z tej samej odmiany uzyskano wyższą żywotność mikrospor pszenicy, w porównaniu do kokultury zawierającej mieszaninę załąźni z czterech odmian (40). Natomiast zastosowanie naczyniek z załąźniami nie miało znaczącego wpływu na żywotność mikrospor, ale w porównaniu do agarozowych pierścieni, powodowało wzrost liczby narzmiących mikrospor. Pozytywny efekt działania załąźni na androgenezę obserwowano także w innych eksperymentach z jęczmieniem (39,69), pszenicą (7,9,41,49, 50,65,94), ryżem (12) i żytem (J. Kumlehn – doniesienie ustne). Prowadzono także eksperymenty z zastosowaniem pylników, mających korzystny wpływ na kulturę mikrospor. Umieszczenie 25 pylników w płynnej pożywce (w szalce) obok wyizolowanych mikrospor wpłynęło na poprawę rozwoju mikrospor kukurydzy (26).

## 12. Regeneracja roślin i poziom ploidalności regenerantów

W kulturze *in vitro* mikrospor pszenicy wyróżniono trzy podstawowe fazy podczas androgenezy. Pierwszą fazą jest zainicjowanie podziałów mikrospor, trwa do 10 dni. Drugą jest embriogeneza – trwa od 10 do 30 dni. Trzecią fazą jest regeneracja zielonych roślin z zarodków i trwa powyżej 30 dni (95). Pełny rozwój rośliny począwszy od pojedynczej mikrospory, przez jej kolejne podziały i tworzenie zarodka prześledzono i udokumentowano dla jęczmienia (96). W literaturze spotyka się takie pojęcia jak efektywność regeneracji, której autorzy używają w stosunku do liczby roślin uzyskanych z pylnika (26,52,79), liczby zielonych roślin z pylnika (20,31), liczby zielonych roślin z kłosa (76) lub ogólnej liczby roślin zregenerowanych (23,24). Dla jęczmienia odmiany Igri uzyskano najwyższy wskaźnik regeneracji. W odmianie tej zregenerowano od 4,8 (14) do 50 (34) zielonych roślin z pylnika. Efektywność regeneracji roślin jęczmienia odmiany Igri w kulturach izolowanych mikrospor była 100-200-krotnie wyższa niż w kulturach pylników (3). Również na podstawie wyników innych doświadczeń wskazuje się, że regeneracja roślin jęczmienia z mikrospor była wyższa niż z pylników, gdzie wynosiła średnio od 4,8 (87) do 12,4 (55) zielonych roślin z pylnika.

Jednym z celów kultury mikrospor jest uzyskanie roślin haploidalnych, z których po podwojeniu liczby chromosomów (spontaniczne lub indukowane) powstają podwojone haploidy. Z genetycznie niestabilnej tkanki kalusowej, uzyskanej z mikrospor często otrzymuje się rośliny o zróżnicowanej ploidalności. Stwierdzono, że

szereg czynników, np. stadium rozwojowe eksplantatu, fuzja jąder oraz aktywność metaboliczna jąder pyłkowych (replikacja i endoreduplikacja DNA) ma wpływ na stopień ploidalności zregenerowanych roślin (2). Użycie eksplantatu zawierającego pyłek w późniejszym stadium rozwojowym wpływało na wyższą ploidalność zarodków i roślin. W kulturze *in vitro* wiele mikrospor wykazuje zdolność do spontanicznego podwajania liczby chromosomów. Od 20 do 50% zregenerowanych zielonych roślin w kulturze pylników pszenicy było podwojonymi haploidami (99). Spontanicznie podwojone haploidy jęczmienia stanowiły około 80-87% otrzymanych regenerantów (34,39), a ryżu 72% (23). Wśród roślin pszenicy zregenerowanych z mikrospor stwierdzono 75% roślin ze spontanicznie podwojonymi chromosomami, 1,7% aneuploidów i 16% haploidów (100).

Czasami wśród regenerantów liczba roślin, ze spontanicznie podwojonymi chromosomami jest niska. Częstość występowania haploidów kukurydzy otrzymanych z pylników ze spontanicznie podwojonymi chromosomami była niska i stanowiła 4,5% (97) i 6,3% (98) ogólnej liczby regenerantów. W celu podwojenia liczby chromosomów rośliny traktowane są m.in. kolchicyną. Badano, w kulturze pylników pszenicy, efekty różnych stężeń kolchicyny, dodanej do pożywki indukującej. Kolchicyna zastosowana przed pierwszym podziałem mitotycznym mikrospor, w kulturze *in vitro*, powodowała podwojenie chromosomów z lepszym efektem niż konwencjonalnie stosowane techniki. Stwierdzono też, że na efektywność kolchicynowania miało wpływ stadium rozwojowe regeneranta (101). Stosowanie różnych metod podwajających liczbę chromosomów oszacowano na przykładzie haploidalnych linii embriogennego kalusa kukurydzy. Traktowanie tkanek roztworem kolchicyny było najlepszą metodą uzyskiwania podwojonych haploidów (102).

Do podwojenia liczby chromosomów mogą być też stosowane niektóre herbicydy. Badano wpływ czterech różnych herbicydów na efektywność podwojenia liczby chromosomów w haploidalnym kalusie kukurydzy pochodzącym z pylników. Spośród użytych do tego celu herbicydów tylko Amiprofosmetyl (APM) i Pronamide spowodowały podwojenie liczby chromosomów u regenerantów. Herbicydy te wywoływały podobne efekty jak kolchicyna, mimo stosowania ich w dużo niższej koncentracji (103). Udział płodnych podwojonych haploidów zregenerowanych z mikrospor pszenicy był różny i w zależności od stosowanego preparatu wynosił: spontanicznie podwojone haploidy – 15%, kolchicyna – 53% (41a), Trifluralin – 65%, APM – 74% (41b).

### 13. Albinizm

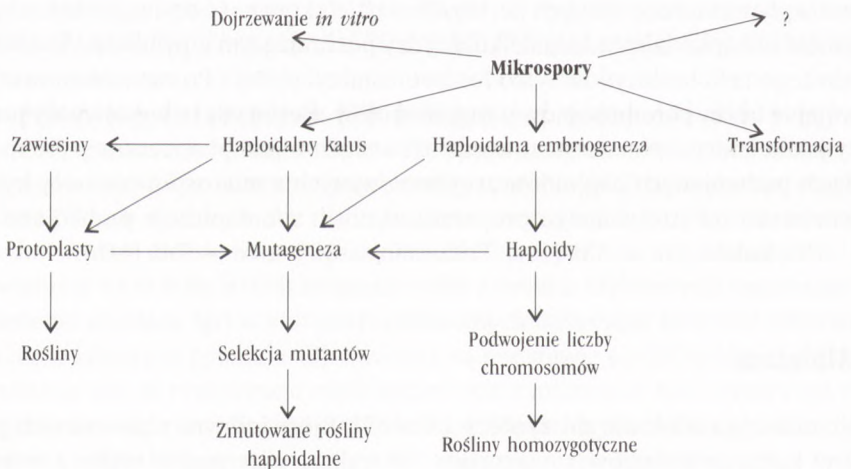
Albinizm (niezdolność do syntezy chlorofilu) jest jednym z poważnych problemów w kulturze pylników i mikrospor. W trakcie regeneracji roślin z mikrospor otrzymuje się zarówno rośliny zielone jak i albinotyczne. Zjawisko albinizmu wśród zregenerowanych roślin występuje w różnym stopniu u wszystkich gatunków zbóż. Do czynników wywołujących występowanie tego zjawiska zalicza się przede wszyst-

kim genotyp, fizjologiczny stan rośliny donorowej (104,105), stadium rozwojowe mikrospor (106), chłodzenie (107) i temperaturę stosowaną w kulturze (108). Wydłużenie czasu prowadzenia kultury w ciemności i zmiana równowagi składników odżywczych w pożywce wpłynęły na wzrost liczby albinosów (31). W kulturze izolowanych mikrospor w porównaniu z kulturą pylników otrzymano mniejszą liczbę roślin albinotycznych. Około 5% roślin albinotycznych uzyskano w kulturze izolowanych mikrospor jęczmienia odmiany Igri, podczas gdy w kulturach pylników obecność albinosów stanowiła 40% (33). Podjęto wiele wysiłków zmierzających do wyjaśnienia przyczyn na poziomie molekularnym tworzenia się roślin albinotycznych z mikrospor. Stwierdzono, że zjawisko albinizmu powoduje delecja genów w genie plastydowym pszenicy, jęczmienia i ryżu (5,109-112). W kulturze pylników pszenicy albinizm był wywołany działaniem genów jądrowych (66).

#### 14. Wykorzystanie mikrospor w kulturach *in vitro*

Kultury izolowanych mikrospor pozwalają na lepsze poznanie procesu androgeny niż kultury pylników. Umożliwiają: 1) uzyskanie haploidów i podwojonych haploidów, 2) łatwiejsze manipulowanie pojedynczymi komórkami w procesach mutacji, transformacji i selekcji; 3) bezpośrednią obserwację rozwoju mikrospor i procesów w nich zachodzących, 4) bardziej precyzyjne określenie potrzeb odżywczych, 5) uniknięcie możliwości regeneracji roślin z somatycznych tkanek pylnika (20).

##### Schemat wykorzystania mikrospor w kulturach *in vitro* i hodowli roślin



Izolowane mikrospory, wielokomórkowe agregaty uzyskane z mikrospor lub kalus powstający z mikrospor mogą posłużyć do wyprowadzenia zawiesin i izolacji

protoplastów zbóż. Zawiesiny komórkowe są źródłem protoplastów, które mogą posłużyć przede wszystkim do otrzymywania mieszańców somatycznych, uzyskiwania roślin o pożądanych cechach na drodze transformacji. Zawiesiny komórkowe zostały wyprowadzone z kultur izolowanych mikrospor jęczmienia (56), a mikrospory kukurydzy były źródłem jednorodnych zawiesin pod względem liczby chromosomów, efektywności embriogenezy i zdolności do regeneracji (113). Wykorzystując materiał otrzymany na drodze androgenyzy wyprowadzono kultury zawiesin jęczmienia (114,115), kukurydzy (28,113) i ryżu (116-118), z których izolowano protoplasty. Z bezpośrednio wyizolowanych mikrospor ryżu przeprowadzono izolację protoplastów (119). U jęczmienia izolowano protoplasty z kalusa uzyskanego z mikrospor (120).

Mikrospory są nie tylko źródłem protoplastów, mogą być stosowane jako „niańka” w kulturze protoplastów. Materiałem do izolacji protoplastów jęczmienia były kilkutygodniowe agregaty komórkowe uzyskane z mikrospor, zregenerowano z nich rośliny, gdy jako kulturę „niańki” zastosowano mikrospory (92). Rozwój protoplastów izolowanych z zapłodnionych komórek jajowych był uwarunkowany użyciem mikrospor. Z wyizolowanych protoplastów powstawały embriogenne struktury po zastosowaniu mikrospor jęczmienia jako kultury „niańki” (121).

Mikrospory ze względu na swoją strukturę, „haploidalą naturę”, ogromną liczebność w pylniku i zdolność do regeneracji drogą embriogenezy są doskonałym narzędziem wykorzystanym w transformacji roślin. Transformując mikrospory lub kalus z nich powstający można, w krótkim czasie, otrzymać rośliny homozygotyczne zawierające nowe geny (122). Transformanty posiadające obce DNA, którego odcinki są zintegrowane w regionach kodujących geny, odpowiedzialne za metabolizm lub rozwój nie podlegają selekcji. Poza tym otrzymywanie podwojonych haploidów wyklucza rośliny z letalnymi mutacjami, a niebezpieczeństwo wystąpienia zmienności somaklonalnej jest niskie ze względu na skrócenie czasu kultury i embriogenezę bezpośrednią. Regeneracja w krótkim czasie roślin z mikrospor zmniejsza ryzyko powstawania dużej liczby roślin albinotycznych stanowiących jeden z wielu problemów w kulturze pylników i mikrospor (123).

W ostatnim okresie, elektroporacja zaczyna odgrywać coraz większą rolę wśród technik stosowanych w transformacji roślin. Dzięki tej technice możliwe jest wprowadzenie obcego DNA do jądra mikrospory, mimo że przeszkodą jest wielowarstwowa sporoderma składająca się z zewnętrznej egzyny i wewnętrznej pektyno-celulozowej intyny. Również użycie glikolu polietylenowego (PEG) umożliwia transformowanie mikrospor. Elektroporacja mikrospor jęczmienia była możliwa przez zastosowanie barwnika – jodku propidyny, a zabieg ten przeżyło 5-17% mikrospor (35). Mikrospory jęczmienia (75) i kukurydzy (44,124) transformowane za pośrednictwem PEG-u i metodą elektroporacji wykazywały przejściową ekspresję (*transient*) wprowadzonych genów. Transformacji za pośrednictwem PEG-u i elektroporacji poddano także protoplasty wyizolowane z zawiesin wyprowadzonych z mikrospor. Tą drogą uzyskano stransformowane rośliny kukurydzy (80), ryżu (125,126) i jęczmienia (77).

Precyzyjne wprowadzenie obcych genów bezpośrednio do jądra komórek i zregenerowanie roślin posiadających nowe cechy możliwe jest do zrealizowania dzięki uzyskaniu wysoce embriogennych kultur mikrospor (123). Opracowanie dla zbóż wydajnego systemu transformacji metodą mikroiniekcji możliwe jest do zrealizowania, po uprzednim opanowaniu, metod regeneracji z mikrospor kulturowanych pojedynczo. W doświadczeniach z mikrosporami jęczmienia zostały określone warunki *in vitro* kultury uwolnionych z pylników mikrospor, ale z ogromnej liczby tych mikrospor zregenerowano tylko kilka roślin. Nakłuwane mikrospory, często ulegały rozerwaniu lub traciły cytoplazmę (32). U kukurydzy przeprowadzono mikroiniekcję struktur wielokomórkowych uzyskanych z mikrospor. Stwierdzono, że 90% struktur po tygodniu kultury odznaczało się żywotnością, a część z nich rozwijała się w zarodki (127).

Najnowsza technika transformacji roślin oparta jest na wykorzystaniu do tego celu „strzelby genowej”. Opracowanie efektywnego systemu regeneracji roślin z mikrospor jęczmienia pozwoliło na zastosowanie metody transformacji przy użyciu strzelby genowej w tych kulturach. Na  $2,8 \times 10^6$  bombardowanych mikrospor uzyskano jedną roślinę transgeniczną (128). Liczba zregenerowanych roślin jęczmienia wynosiła 1 na  $1 \times 10^7$  bombardowanych mikrospor. Stwierdzono, że przenoszone do transformanta geny były dziedziczone we wszystkich otrzymanych roślinach potomnych, co jednoznacznie wskazuje na homozygotyczność regenerantów. Poza tym otrzymane transformanty nie wykazywały fenotypowych odchyłeń (81). Potencjał regeneracyjny mikrospor jęczmienia transformowanych metodą strzelby genowej sprawdzano cytologicznie, opierając się na żywotności oraz aktywności GUS bombardowanych mikrospor (122). Wykazano, że największą ekspresję (typu transient) genu GUS obserwowano w trzecim dniu po bombardowaniu mikrospor, a najlepsze rezultaty uzyskano transformując mikrospory dwa dni po izolacji (33). Transformowano kulturę mikrospor tygodniowych i czterotygodniowych (129), a także kalus uzyskany z mikrospor (130). Obecność genów *uidA* i *bar* w jęczmieniu, uzyskanym z mikrospor potwierdzono metodą PCR i metodą Southerna (131). Transformacji przy użyciu strzelby genowej poddano haploidalne zarodki (132) i izolowane mikrospory pszenicy (50). Najwyższy poziom ekspresji wprowadzonego genu wykazywały uzyskane z mikrospor wielokomórkowe struktury. Transformację mikrospor za pomocą strzelby genowej przeprowadzono także u kukurydzy (133).

## 15. Podsumowanie

Liczne badania nad izolacją i kulturą mikrospor, prowadzone przede wszystkim z jęczmienia, przyniosły postęp w opracowaniu metod stosowanych w kulturach izolowanych mikrospor pszenicy, ryżu, kukurydzy, pszenżyta oraz żyta. Techniki te z powodzeniem były i mogą być wykorzystane do otrzymywania roślin homozygotycznych na dużą skalę, a także roślin transgenicznych o pożądanym cechach. Sto-

sowane metody w kulturze izolowanych mikrospor, począwszy od izolacji aż do uzyskania dojrzałych roślin, w uzyskiwaniu podwojonych haploidów oraz manipulacjach genetycznych mają szereg zalet. Należą do nich: 1) wysoka zdolność mikrospor do embriogenezy, 2) krótki czas prowadzenia kultury (1-3 miesiące), 3) zminimalizowanie zmienności gametoklonalnej, 4) możliwość śledzenia wczesnych stadiów embriogenezy, 5) precyzyjne prowadzenie manipulacji genetycznych, 6) możliwość przeprowadzenia różnorodnych badań, np. biochemicznych na poziomie komórki, 7) łatwe stosowanie czynników selekcyjnych i mutagennych. Ponadto, efektywność regeneracji roślin haploidalnych z izolowanych mikrospor jest często wyższa, w porównaniu do efektywności regeneracji takich roślin z pylników. Metody i techniki stosowane w kulturze izolowanych mikrospor są bardziej skomplikowane i złożone niż w kulturze pylników, zatem wymagają stopniowo przezwyciężenia wielu barier, aby dawały zadowalające efekty. Zastosowanie technik używanych w kulturach izolowanych mikrospor przyczyni się do uzyskania nowych odmian i znacznego skrócenia cyklu hodowlanego.

## Literatura

- Powell W., (1990), *Environmental and genetical aspects of pollen embryogenesis*, in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Haploids in crop improvement*, Ed. by Y.P.S. Bajaj, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 12, 45-65.
- Bednarska E., (1994), *Zarys embriologii roślin okrytonasiennych*, UMK, Toruń.
- Davies P. A., Morton S., (1998), *Plant Cell Rep.*, 17, 206-210.
- Kasha K. J., Cho U-H., Ziauddin A., (1992), *Application of microspore cultures*, in: Munck L. (Ed) *Barley Genetics VI*, 2, 793-806. Munksgaard Internat. Publ., Copenhagen.
- Mouritzen P., Holm P. B., (1994), *J. Plant Physiol.*, 144, 4-5, 585-593.
- Powell W., (1988), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 12, 291-297.
- Datta S. K., Wenzel G., (1987), *Plant Sci.*, 48, 49-54.
- Gustafson V. D., Beanziger P. S., Wright M. S., Stroup W. W., Yen Y., (1995), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 42, 207-213.
- Hu T., Kasha K. J., (1997), *Plant Cell Rep.*, 16, 520-525.
- Hu T. C., Ziauddin A., Simion E., Kasha K. J., (1995), *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 31, 79-83.
- Turesson I. K. D., Öhlund R. C. V., (1993), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 34, 163-167.
- Raina S. K., Irfan S. T., (1998), *Plant Cell Rep.*, 17, 957-962.
- Xie J., Gao M., Cai Q., Cheng X., Shen Y., Liang Z., (1995), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 42, 245-250.
- Mordhorst A. P., Lörz H., (1993), *J. Plant Physiol.*, 142, 485-492.
- Knudsen S., Due I. K., Andersen S. B., (1989), *Plant Breed.*, 103, 241-246.
- Foroughi-Wehr B., Zeller F. J., (1990), *Theor. Appl. Genet.*, 79, 77-80.
- Genovesi A. D., (1990), *Maize (Zea mays L.) in vitro production of haploids*, in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Haploids in Crop Improvement I*, Ed. Y. P. S. Bajaj, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 176-203.
- Simmonds J., (1989), *Plant Sci.*, 65, 225-231.
- Hunter C. P., (1988), *Plant regeneration from microspores of barley (Hordeum vulgare L.)*, Ph.D. Thesis, Wye College, University of London Springer-Verlag, Berlin.
- Kasha K. J., Ziauddin A., Cho U-H, Simion E., Petroski R., Cistue L., (1997), *J. Appl. Genet.*, 38 (4), 373-380.



21. Alfele J. C., Kannenberg L. W., Keats R., Sohota S., Swanson E. B., (1992), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 28, 1, 87-90.
22. Lockett D. J., Davey N. L., (1992), *Aust. J. Bot.*, 40, 807-828.
23. Cho M. S., Zapata F. J., (1988), *Plant Sci.*, 58, 239-244.
24. Cho M. S., Zapata F. J., (1990), *Plant Cell Physiol.*, 31(6), 881-885.
25. Datta S. K., Datta K., Potrykus I., (1990), *Plant Sci.*, 67, 83-88.
26. Gaillard A., Vergane P., Beckert M., (1991), *Plant Cell Rep.*, 10, 55-58.
27. Dupuis I., Pace G. M., (1993), *Plant Cell Rep.*, 12, 564-568.
28. Mitchell J. C., Petolino J. F. (1991), *J. Plant. Physiol.*, 137, 530-536.
29. Xie J. H., Gao M. W., Cai Q. H., Liang Z. Q., Xue Q. Z., (1996), *Cereal Research Comm.*, 24, 133-138.
30. Pretova A., Ruijter N. C. A., van Lammeren A. A. M., Schel J. H. N., (1993), *Euphytica*, 65, 61-69.
31. Cistue L., Ziauddin A., Simion E., Kasha K. J., (1995), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 42, 163-169.
32. Bolik M., Koop H. U., (1991), *Protoplasma*, 162, 61-68.
33. Harwood W. A., Bean S. J., Chen D. F., Mullineaux P. M., Snape J. W., (1995), *Euphytica*, 85, 113-118.
34. Hoekstra S., van Zijderveld M. H., Heidekamp F., van der Mark F., (1993), *Plant Cell Rep.*, 12, 661-665.
35. Joersbo M., Jorgensen R. B., Olsen P., (1990), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 23, 125-129.
36. Kao K. N., (1993), *Plant Cell Rep.*, 12, 7-8, 366-369.
37. Olsen F. L., (1991), *Hereditas*, 115, 255-266.
38. Scott P., Lyne R. L., (1994), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 36, 129-133.
39. Ziauddin A., Simion E., Kasha K. J., (1990), *Plant Cell Rep.*, 9, 69-72.
40. Bruins M. B. M., Rakoczy-Trojanowska M., Sniijders C. H. A., (1996), *Cereal Research Comm.*, 24, 401-408.
41. Hansen N. J. P., Andersen S. B., (1998a), *Euphytica*, 102, 101-108; (1998b), *Plant Breed.*, 117, 401-405.
42. Mejza S. J., Morgant V., DiBona D. E., Wong J. R., (1993), *Plant Cell Rep.*, 12, 149-153.
43. Coumans M. P., Sohota S., Swanson E. B., (1989), *Plant Cell Rep.*, 7, 618-621.
44. Jardinaud M. F., Souvre A., Beckert M., Alibert G., (1995), *Plant Cell Rep.*, 15, 1-2, 55-58.
45. Heberle-Bors E., (1999), *PBI Bulletin-Jan.*
46. Touraev A., Vincente O., Heberle-Bors E., (1997), *Trends in Plant Sci.*, 2, 297-302.
47. Malepszy S., Niemirowicz-Szczyt K., Przybecki Z., (1989), *Biotechnologia w genetyce i hodowli roślin*, PWN, Warszawa.
48. Huang B., Sunderland N., (1982), *Ann Bot*, 49, 77-88.
49. Indrianto A., Heberle-Bors E., Touraev A., (1999), *Plant Sci.*, 143, 71-79.
50. Mantewab A., Letellier V., Marque C. Sarrafi A., (1999), *Cereal Research Comm.*, 27, 1-2, 17-23.
51. Lazar M. D., Beanziger P. S., Schaeffer G. W., (1985), *Plant Sci.*, 102, 99-107.
52. Pescitelli S. M., Johnson C. D., Petolino J. F., (1990), *Plant Cell Rep.*, 8, 628-631.
53. Petolino J. F., Jones A. M., (1986), *Crop Sci.*, 26, 1072-1074.
54. Xie J. H., Gao M. W., Liang Z. Q., Shu Q. Y., Cheng X. Y., Xue Q. Z., (1997), *J. Plant Physiology*, 151, 79-82.
55. Hoekstra S., van Zijderveld M. H., Louwerse J. D., Heidekamp F., van der Mark F., (1992), *Plant Sci.*, 86, 89-96.
56. Lührs R., Nielsen K., (1992), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 31, 169-178.
57. Ryan A. B., Castillo A. M., Valles M. P., Sanz J. M., Cistue L., (1999), *Plant Cell Rep.*, 18, 924-928.
58. Ziauddin A., Marsolais A., Simson D., Kasha K. J., (1992), *Plant Cell Rep.*, 11, 489-498.
59. Roberts-Oehlschlanger S., Dunwell S. M., (1990), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 20, 235-240.
60. Hu T., Kasha K. J., (1999), *Genome*, 42, 432-441.
61. Hoekstra S., Vanbergen S., Vanbrouwershaven I. R., Schilperoort R. A., Heidekamp F., (1996), *J Plant Physiol.*, 148 (6), 696-700.
62. Bedinger P. A., Edgerton M. D., (1990), *Plant Physiol.*, 92, 474-479.
63. Mandaron P., Niogret M. F., Mache R., Moneger F., (1990), *Theor. Appl. Genet.*, 80, 134-138.
64. Ball S. T., Zhou H., Konzak C. F., (1993), *Plant Sci.*, 90, 195-200.

65. Touraev A., Indrianto A., Wratschko I., Vicente O., Heberlebors E., (1996), *Sexual Plant Reprod.*, 9, 209-215.
66. Tuvesson I. K. D., Pedersen S., Andersen S. B., (1989), *Theor. Appl. Genet.*, 78, 879-883.
67. Orshinsky B. R., Sadasivaiah R. S., (1985), *J. Plant Physiol.*, 121, 103-109.
68. Sunderland N., Roberts M., (1977), *Nature*, 270, 236-238.
69. Köhler F., Wenzel G., (1985), *J. Plant Physiol.*, 121, 181-191.
70. Sunderland N., Xu Z.H., (1982), *J. Exp. Bot.*, 33, 1086-1095.
71. Xu Z.H., Huang B., Sunderland N., (1981), *J. Exp. Bot.*, 32, 767-778.
72. Wei Z. M., (1982), *Theor. Appl. Genet.*, 63, 71-73.
73. Chen Y., Wang R., Tian W., Zuo Q., Zheng S., Lu D., Zhang G., (1980), *Keng. Acta Genet. Sinica*, 7, 46-53.
74. Tiwari S., Rahimbaev I., (1992), *Indian J. Exp. Biol.*, 30, 7, 624-627.
75. Kuhlmann U., Foroughi-Wehr B., Graner A., Wenzel G., (1991), *Plant Breed.*, 107, 165-168.
76. Salmenkallio Marttila S., Kurten U., Kauppinen V., (1995), *Plant Cell Tissue Cult.*, 43, 79-81.
77. Salmenkallio-Marttila M., Aspegren K., Akerman S., Kurten U., Mannonen L., Ritala A., Teeri T. H., Kauppinen V., (1995), *Plant Cell Rep.*, 15, 301-304.
78. Wei Z. M., Kyo M., Harada H., (1986), *Theor. Appl. Genet.*, 72, 252-255.
79. Pescitelli S. M., Mitchell J. C., Jones A. M., Pareddy D. R., Petolino J. F., (1989), *Plant Cell Rep.*, 7, 673-676.
80. Sukhapinda K., Kozuch M. E., Rubin-Wilson B., Ainley W. M., Merlo D. J., (1993), *Plant Cell Rep.*, 13, 2, 63-68.
81. Jähne A., Becker D., Brettschneider R., Lörz H., (1994), *Theor. Appl. Genet.*, 89, 525-533.
82. Puolimatka M., Laine S., Pauk J., (1996), *Cereal Research Comm.*, 24, 393-400.
83. Pareddy D. R., Petolino J. F., (1992), *Plant. Cell. Rep.*, 11, 535-539.
84. Monostori T., Puolimatka M., Pauk J., (1998), *Novenytermeles*, 47 (4), 371-382.
85. Xie J. H., Lu J., Zhuang J. Y., Lin H. X., Qian H. R., Gao M. W., Zheng K. L., (1997), *Theor. Appl. Genet.*, 94, 34-38.
86. Widholm J. M., (1972), *Stain Technol.*, 47, 189-194.
87. Olsen F. L., (1987), *Carlsberg Res. Comm.*, 52, 393-404.
88. Kasha K. J., Ziauddin A., Simion E., (1990), *Abstr. 7<sup>th</sup> Int. Congress on Plant Cell Tissue Cult.*, Amsterdam (187).
89. Stephen J. M., Vincent M., DiBona D. E., James R. W., (1993), *Plant Cell. Rep.*, 12, 149-153.
90. Scott P., Lyne R. L., (1995), *J. Exp. Bot.*, 46, 286, Suppl.19.
91. Scott P., Lyne R. L., (1994), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 37, 61-65.
92. Salmenkallo-Martilla M., Kauppinen V., (1995), *Plant Cell Rep.*, 14, 253-256.
93. Kasha K. J., Ziauddin A., Cho U. H., (1990), *Gene Manipulation in Plant Improvement II*, Ed. P. Gustfson, Plenum Press, New York, 213-235.
94. Crambes E., Picard E., (1994), *Abs 8<sup>th</sup> Int. Cong. Plant Tissue Cell Cult.*, Eds. Terzi M., Cella R., Favavigna A., Firenze, Italy, Kluwer Acad. Publ., 203.
95. Hu T. C., (1995), MSc thesis, University of Guelph, Guelph, Ont.
96. Kumlehn J., Lörz H., (1999), *Acta Biologica Cracoviensia (Abstract IX International Conference of Plant Embryologists)*, 4, 1, 21.
97. Nitsch C., Andersen S., Godard M., Neuffer M. G., Sheirdan W. F., (1986), *Production of haploid plants of Zea mays and Pennisetum trought androgenesis*, in: *Crops I (Biotechnology agriculture 2)*, Ed. Y.P.S. Bajaj, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 168-180.
98. Ku M. K., Cheng W. C., Kuo L. C., Kuan Y. L., An H. P., Huang C. H., (1978), in: *Proceedings of symposium on plant tissue culture*, Science Press, Pekin, 35-41.
99. Henry Y., de Buyser J., (1990), *Wheat anther culture: agronomic performance of doubled haploid lines and the release of a new variety "Florin"*, in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Wheat*, Ed. Y. P. S. Bajaj, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 285-352.
100. Hu T., Kasha K. J., (1997), *Canadian J. Plant Sci.*, 77, 549-554.
101. Barnabas B., Pfahler P. L., Kovacs G., (1991), *Theor. Appl. Genet.*, 81, 675-678.
102. Wan Y., Petolino J. F., Widholm J. M., (1989), *Theor. Appl. Genet.*, 77, 889-892.

103. Wan Y., Duncan D. R., Rayburn A. L., Petolino J. F., Widholm J. M., (1991), *Theor. Appl. Genet.*, 81, 205-211.
104. Andersen S. B., Due I. K., Olesen A., (1987), *Plant Breed.*, 99, 181-186.
105. Bullock W. P., Baenziger P. S., Schaeffer G. W., Bottino P. J., (1982), *Theor. Appl. Genet.*, 62, 155-159.
106. Chen C. C., Lin M. H., (1976), *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 17, 18-24.
107. Genovesi A. D., Magill C. W., (1979), *Crop Sci.*, 19, 662-664.
108. Huang H., (1984), *Z. Pflanzenzücht.*, 92, 22-29.
109. Day A., Ellis T. H. N., (1984), *Cell*, 39, 359-368.
110. Day A., Ellis T. H. N., (1985), *Curr. Genet.*, 9, 671-678.
111. Dunford R., Walden R. M., (1991), *Curr. Genet.*, 20, 339-347.
112. Harada T., Sato T., Asaka D., Matsukawa I., (1991), *Theor. Appl. Genet.*, 81, 157-161.
113. Krautwig B., Lörz H., (1995), *Plant. Cell. Rep.*, 14, 477-481.
114. Jähne A., Lazzeri P. A., Jäger-Gussen M., Lörz H., (1991), *Theor. Appl. Genet.*, 82, 74-80.
115. Jähne A., Lazzeri P. A., Lörz H., (1991), *Plant. Cell. Rep.*, 10, 1-6.
116. Bao P. H., Granata S., Castiglione S., Wang G., Giordani C., Cuzzoni E., Damiani G., Bandi C., Datta S. K., (1996), *Transgenic Res.*, 5, 2, 97-103.
117. Cauchy T., Pichot S., Clement G., Chair H., Guiderdoni E., (1997), *Internat. Rice Research Notes*, 22, 1, 17-18, 2 ref.
118. Datta S. K., Datta K., Potrykus I., (1990), *Plant Cell. Rep.*, 9, 253-256.
119. Xie J. H., Gao M. W., Xue Q. Z., Liang Z. Q., (1998), *J. Zhejiang Agricultural University*, 24, 1, 59-62, 7 ref.
120. Zhang Y. H., Huang J. H., Lu R. J., Sun Y. F., Yan C. J., (1995), *Acta Agricult. Shanghai*, 11, 4, 13-17, 12 ref.
121. Holm P. B., Knudsen S., Mouritzen P., Negri D., Olsen F. L., Roue C., (1994), *The Plant Cell*, 6, 531-543.
122. Yao Q. A., Kasha K. J., (1997), *Genome*, 40 (5), 639-643.
123. Jähne A., Lörz H., (1995), *Plant Sci.*, 109, 1-12.
124. Fennell A., Hauptmann R., (1992), *Plant. Cell. Rep.*, 11, 567-570.
125. Chair H., Legavre T., Guiderdoni E., (1996), *Plant Cell Rep.*, 15,10, 766-770.
126. Datta S. K., Peterhans A., Datta K., Potrykus I., (1990), *J. Cell Biochem.*, Suppl. 14E, 279.
127. Gaillard A., Matthys-Rochon E., Dumas C., (1992), *Bot. Acta*, 105, 313-318.
128. Lutticke S., Becker D., Brettschneider R., Jähne A., Lörz H., (1995), in: *Induced mutations and molecular techniques for crop improvement, Proceedings*, Vienna, Austria, 19-23 June, 389-397.
129. Ritala A., Aikasalo R., Aspegren K., Salmenkallio-Marttila M., Akerman S., Mannonen L., Kurten U., Puupponen-Pimiä R., (1995), *Euphytica*, 85, 81-88.
130. Teeri T. H., Ritala A., Aspegren K., Kurten U., Salmenkallio-Marttila M., Mannonen L., (1994), *J Cell. Biochem.*, Suppl.18A, 102.
131. Yao Q. A., Simion E., William M., Krochko J., Kasha K. J., (1997), *Genome*, 40 (4), 570-581.
132. Loeb T. A., Reynolds T. L., (1995), *Plant Sci.*, 104, 81-91.
133. Jardinaud M. F., Sourve A., Alibert G., Beckert M., (1995), *Protoplasma*, 187, 1-4, 138-143.