

1. Wstęp

Metoda hodowli *in vitro* polega na izolacji, a następnie na prowadzeniu aseptycznych kultur części organizmu roślinnego o różnym stopniu złożoności: tkanki, metystemy, zarodki, pylniki, izolowane ziarna pyłku, komórki, protoplasty. Rozwój eksplantatów przebiega na sztucznym podłożu, aż do odtworzenia (regeneracji) całej rośliny.

Zastosowanie metod hodowli kultur tkankowych umożliwia rozmnażanie cennych genotypów w skali masowej, otrzymywanie mieszańców międzygatunkowych i międzyrodzajowych (1), a także form wykazujących obniżoną podatność na czynniki patogeniczne (2). Ponadto techniki hodowli *in vitro* w wielu przypadkach umożliwiają wykonanie zadań, które nie mogłyby być osiągnięte dotychczasowymi metodami hodowlanymi, np. bezpośredni transfer genów (3,4,5). W porównaniu z tradycyjną selekcją metody hodowli *in vitro* podwyższają efektywność klasycznych programów hodowlanych, a także umożliwiają wydatne skrócenie cyklu hodowlanego przy obniżonych kosztach (6).

Postęp w zakresie technik komórkowych i tkankowych u *Gramineae* jest znacznie wolniejszy niż u wielu gatunków dwuliściennych (zwłaszcza z rodziny *Solanaceae*).

Ekonomiczne znaczenie rodziny *Gramineae* w zaspokajaniu potrzeb żywieniowych jest dobrze znane. Hodowcy gatunków zbożowych i traw od dawna są zainteresowani zastosowaniem kultur pylnikowych lub pyłkowych w celu uzyskania form haploidalnych, które po podwojeniu liczby chromosomów mogą odgrywać ważną rolę w ulepszaniu i hodowli nowych odmian (7,8). Uzyskiwanie linii homozygotycznych w hodowli zbóż, wymaga prowadzenia wieloletniego chowu wsobnego, a w przypadku roślin obcopolnych, utrzymywania ścisłej izolacji przestrzennej. Hodowla pylników w warunkach *in vitro* umożliwia zmianę procesów gametogenezy. Efektem może być uzyskanie tkanki kalusowej, a następnie androgenicznych zarodków charakteryzujących się haploidalną liczbą chromosomów. W dalszych etapach, podwajając liczbę chromosomów (metoda kolchicynowania), można otrzymać rośliny homozygotyczne dla każdego *locus* genu. Zastosowanie kultur pylnikowych daje możliwość znacznego skrócenia czasu koniecznego dla uzyskania „czystych linii” do prac hodowlanych. Tym sposobem udało się zaoszczędzić co najmniej cztery lata pracy przy tworzeniu nowej odmiany pszenicy „Florin”, uzyskanej metodą podwojonych haploidów (9).

2. Stan badań i perspektywy

Metoda androgenozy *in vitro* jest teoretycznie jedną z najbardziej obiecujących technik umożliwiających utrzymywanie podwojonych haploidów (w konsekwencji linii homozygotycznych) w ilościach przydatnych dla praktycznej hodowli (9,10,11). Produkcja haploidalnych roślin metodą kultury mikrospor/pylników jest szybkim sposobem uzyskiwania homozygotyczności i natychmiastowej ekspresji genów recesywnych. Dla efektywnego zastosowania haploidów w hodowli zbóż konieczne jest opracowanie relatywnie prostego systemu hodowli *in vitro* umożliwiającego inicjację haploidalnego kalusa i regenerację roślin zielonych. U wielu gatunków *Gra-*

mineae opisano metody uzyskiwania kalusa/zarodków i regeneracji haploidalnych roślin pochodzących z kultury pylników (przeł. 12). Pomimo występujących trudności związanych z niską frekwencją regeneracji i wysoką częstotliwością albinizmu, dokonany został pewien postęp w zakresie gatunków jednoliściennych. Wśród metod kultury pylników roślin zbożowych najbardziej zaawansowana jest metoda opracowana dla pszenicy (*Triticum aestivum*). Stosując podwojone haploidy otrzymane metodą androgenezy uzyskano co najmniej dwie ulepszone odmiany pszenicy (9,10,13).

Postęp w zakresie kultury pylników traw pastewnych był wolniejszy w porównaniu z ważniejszymi gatunkami roślin zbożowych. Przyczyną tego jest mniejsze ekonomiczne znaczenie traw. Zainteresowanie badawcze tymi gatunkami było ograniczone, jakkolwiek, hodowcy traw są zainteresowani metodami pozwalającymi na uzyskiwanie dużej liczby haploidów w sposób relatywnie mało skomplikowany. Czas wymagany dla wyhodowania nowych odmian traw wieloletnich metodami konwencjonalnymi i wprowadzenie ich do produkcji może wynosić 15–20 lat. Zastosowanie haploidów uzyskanych z kultur pylnikowych jest alternatywnym podejściem w porównaniu z hodowlą tradycyjną. Otrzymywane w ten sposób haploidy dają możliwość tworzenia homozygotycznych linii hodowlanych. Obecnie uzyskiwanie takiego materiału genetycznego metodami konwencjonalnej hodowli jest niezwykle trudne, a w niektórych przypadkach niemożliwe z powodu wysokiej samonieźgodności i naturalnego obcozapylenia, występującego u traw pastewnych. Krzyżowanie linii homozygotycznych prowadzi do uzyskania wysokiego stopnia heterozygotyczności. Bingham (14) podaje przykład unikatowego sposobu zwiększenia heterozygotyczności u lucerny, gatunku samonieźgodnego, obcopylnego, autotetraploidalnego i wieloletniego. Metoda ta obejmuje: i) obniżenie poziomu ploidalności naturalnej formy tetraploidalnej do diploidalnej poprzez haploidyzację, ii) produkcję diploidalnych mieszańców, iii) podwojenie liczby chromosomów diploidalnych mieszańców poprzez traktowanie kolchicyną, w celu uzyskania określonych autotetraploidalnych genotypów w formie dupleks. Ocena przydatności hodowlanej otrzymanych roślin może być realizowana w różnicowanych warunkach środowiska i agrotechniki. Haploidy tetraploidalnych gatunków posiadają diploidalną liczbę chromosomów. Ten fakt pozwala na przeprowadzenie zamierzeń hodowlanych na poziomie diploidalnym, np. krzyżowań z naturalnymi diploidami opisanymi u lucerny (*Medicago* sp.) (15). Może także mieć miejsce bezpośredni transfer genów z innych gatunków diploidalnych. Ploidalność uzyskanych roślin winna być następnie podwyższona do poziomu wyjściowego. Podobieństwa w zakresie poziomu ploidalności jak i sposobu rozmnażania sprawiają, że teoretyczny model opracowany dla zwiększenia heterozygotyczności lucerny powinien być możliwy do zastosowania u kupkówki (16,17,18). Uzyskany w ostatnich latach postęp dotyczący produkcji haploidów z kultury pylników *Dactylis glomerata* pozwala optymistycznie i realnie oceniać szansę otrzymania haploidów tego gatunku (19).

Podwojone haploidy mogą być także stosowane w celu przeprowadzenia analizy genetycznej cech odpornościowych. Podobna metoda była ostatnio zastosowana w badaniach cechy odporności *Lolium* na wirusa żółtej karłowatości jęczmienia (*barley yellow dwarf virus resistance*) (20).

Uzyskiwano regenerację haploidalnych roślin z mechanicznie izolowanych mikrospor (21) i zawiesiny mikrospor *Zea mays* (22) oraz kultury pyłku (23) i kultury kłosów *Oryza sativa* (23). W ciągu ostatnich kilku lat opublikowano wiele doniesień dokumentujących relatywnie wysoką efektywność regeneracji roślin z kultur pylnikowych pszenicy (25,26), kukurydzy (22,27) i pszenżyta (28,29,30,31,32,33,34,35,36). Wang i Hu (37) otrzymali 11,5 % zielonych roślin pszenżyta na 100 pylników stosując pożywkę „Chinese Potato II” (38), ale liczba chromosomów uzyskanych regenerantów nie była cytologicznie potwierdzona.

Prowadząc kulturę kwiatków lub kwiatostanów można także uzyskać inicjację kalusa i regenerację roślin u jęczmienia (39), *Festuca arundinacea* (40,41) i *Dactylis glomerata* (42). Istnieją systemy regeneracji *Dactylis glomerata*, obejmujące pełny rozwój somatycznych zarodków

pochodzących z: pojedynczych komórek zawieszony w płynnej pożywce (43), komórek eksplantatu, np. blaszki liściowej, uzyskanych drogą bezpośredniej embriogenezy somatycznej (44), a także z pylników oraz słupek (19). Zregenerowano kilkadziesiąt roślin pochodzących z pylników i słupek kupkówki. Wszystkie rośliny były zielone (45). Większość regenerantów posiadała somatyczną liczbę chromosomów ($n=28$). W wyjątkowych przypadkach rośliny były miksploidami, których komórki zawierały od 14 do ponad 100 chromosomów. Obecność komórek z 14 chromosomami pozwoliła na wysunięcie przypuszczenia, że zregenerowane rośliny początkowo mogły być haploidami i komórki posiadające wyższą liczbę chromosomów powstały w wyniku endoreduplikacji. Nie ustalono czy rośliny z 28 chromosomami pochodziły z tkanki somatycznej, czy też były dihaploidami powstałymi w wczesnego, spontanicznego zwiększenia liczby chromosomów. Dokonane obserwacje wskazywały na pochodzenie zarodków zarówno ze ściany pylnika (19), jak i z jego wnętrza (45). W takim przypadku konieczne jest przeprowadzenie analizy izozymów w celu stwierdzenia, czy zregenerowane rośliny są podwojonymi haploidami, czy też tetraploidami pochodzącymi z komórek somatycznych.

Należy także podkreślić atrakcyjność eksperymentalnego systemu kultury izolowanych ziaren pyłku dla podstawowych badań genetycznych i hodowli roślin (46). Opracowane techniki umożliwiają wstrzykiwanie i inkorporację „obcego” DNA bezpośrednio do ziaren pyłkowych (47). Teoretycznie metoda ta może być efektywniejsza w porównaniu z zastosowaniem diploidalnych komórek somatycznych z uwagi na brak segregacji cech w następnych pokoleniach.

Jednakże dotychczas głównym czynnikiem limitującym zastosowanie kultury pylników na szeroką skalę pozostaje nadal ograniczona liczebnie produkcja haploidów. Fakt ten może być powodowany niskim współczynnikiem wyrażającym liczbę powstających zarodków na jeden pylnik, jak i niską częstotliwością regeneracji. Przyczyn należy upatrywać w niedoskonałości metod hodowli *in vitro* i braku optymalnej recepty składu chemicznego pożywek, oraz co może być ważniejsze, w zmienności genetycznej w zakresie reakcji androgenicznej, występującej zarówno pomiędzy gatunkami jak i w obrębie gatunku. Tak zatem pomimo niewątpliwego postępu w tym zakresie nie zdołano opracować relatywnie prostej, efektywnej i powtarzalnej metody użytkowania roślin o gametycznej liczbie chromosomów w rodzinie *Gramineae*.

Omówiono możliwości zastosowania podwojonych haploidów w celu zredukowania czasu potrzebnego dla uzyskania odmiany, a także otrzymania homozygotycznych linii hodowlanych do krzyżowań. W wielu przypadkach podwojone haploidy roślin zbożowych i innych gatunków nie przewyższają wysokością plonu linii homozygotycznych otrzymanych metodami konwencjonalnymi. Nie stwierdzono istotnych różnic w plonowaniu pomiędzy liniami pszenżyta uzyskanymi z podwojonych haploidów a liniami pochodzącymi z rozmnażania generatywnego, pomimo widocznego zróżnicowania w zakresie innych cech (48). Jednakże w końcowych wnioskach autorzy wyrażają opinię, że kultura pylników może być efektywną metodą dla produkcji wysoko plonujących linii homozygotycznych, uzyskanych z mieszańców pokolenia F_1 pszenżyta, w skróconym czasie.

Haploidy mogą być także użyteczne w celu introgresji chromosomów D genomu dawcy do heksaploidalnego genomu AABBRR. Na przykład genom D pszenicy uprawnej zawiera pewną ilość genów kodujących jakość ziarna, odporność na choroby i zimotrwałość (49). Autorzy opisują także różne schematy substytucji chromosomów D innymi chromosomami. Na przykład genom AABBRR ze specyficznym chromosomem D może wytwarzać gamety ABR i ADR. Teoretycznie, z kultury pylników można otrzymać haploidy o wspomnianym składzie chromosomowym, a efektem ich podwojenia mogą być rośliny charakteryzujące się obecnością chromosomowej pary DD zamiast pary BB. Oprócz substytucji chromosomowej, efektem translokacji uzyskiwanych w różnych kombinacjach krzyżowań może być przeniesienie tylko części chromosomu D. Według wspomnianych autorów (49) w liniach hodowlanych heksaploidalnego pszenżyta nie zidentyfikowano żadnych translokacji zawierających segmenty chromosomu D genomu dawcy, ale należy podkreślić, że możliwość taka istnieje.

3. Czynniki warunkujące inicjację androgenезы

Szczegółowego opracowania wymagają co najmniej cztery aspekty ewentualnego zastosowania androgenезы *in vitro* w praktycznej hodowli ulepszonych odmian roślin zbożowych. Pierwszym z nich jest określenie wpływu genotypu na efektywność regeneracji roślin zielonych. Konieczne jest testowanie materiałów o jak najszerszym spektrum genetycznym w celu identyfikacji form o wysokiej zdolności do androgenезы i dokonania oceny możliwości uniknięcia lub zminimalizowania zjawiska albinizmu regenerantów. Drugim czynnikiem wymagającym opracowania jest ściśle określenie warunków fizycznych prekultury, wstępnego traktowania roślin-dawców pylników, warunków prowadzenia hodowli *in vitro* oraz oszacowanie wszelkich innych czynników mogących wpływać na produkcję haploidów (50). Trzecim aspektem jest ustalenie optymalnych warunków chemicznych prowadzenia kultury umożliwiających uzyskanie wysokiej efektywności androgenезы (26,37). Czwartym czynnikiem wpływającym na końcową efektywność tej metody są warunki przeprowadzania fazy podwojenia liczby chromosomów. Należy podkreślić, że każdy ze wspomnianych czynników jest prawdopodobnie specyficzny i wymaga empirycznej optymalizacji dla poszczególnych gatunków roślin.

a. Wpływ genotypu

Genetyczne warunkowanie i genotypowe zróżnicowanie efektywności kultur *in vitro*, włączając także regenerację metodą somatycznej embriogenezy, jest obecnie szeroko akceptowane i potwierdzone wieloma doniesieniami (51,52,53,54). Wykazano, że cecha zdolności do embriogenezy jest przekazywana zarówno przez żeńskie jak i męskie gamety oraz może wykazywać ekspresję w pokoleniu F_1 , uzyskanym z krzyżowania embriogenicznych i nieembriogenicznych genotypów (55). Ostatnie badania dotyczące kultury pylników 21 odmian pszenicy jarej, 4 odmian pszenicy twardej (*durum*) i 50 odmian pszenicy ozimej wykazały szerokie zróżnicowanie efektywności androgenезы (56). Najlepsze rezultaty osiągnięto u odmiany *Florida* pszenicy ozimej, charakteryzującej się obecnością pszeniczno-żytniej translokacji typu 1B/1R. Prawdopodobnie także inne uwarunkowania genetyczne wpływają na efektywność androgenезы. Jednakże wspomniany czynnik – jak się wydaje – ma doniosłe znaczenie dla efektywności kultur pylnikowych roślin zbożowych.

b. Wpływ czynników fizycznych

Najważniejszym z czynników fizycznych wpływających na zwiększenie efektywności androgenезы u zbóż jest oddziaływanie obniżonej temperatury na pędy lub pylniki stosowane bezpośrednio przed wyszczepianiem eksplantatów na pożywki (57). Zazwyczaj całe kwiatostany (kłosy) są poddawane stresowi, który trwa od kilku dni do kilku tygodni (4–8°C). Poszczególne pędy wraz z kwiatostanami mogą być przechowywane w wodzie, lub też oddzielone kłosy umieszcza się w szalkach Petriego. Wspomniane traktowanie zastosowano z powodzeniem w przypadku jęczmienia (58). W przeprowadzonych ostatnio badaniach z pszenicą kłosy były umieszczane w kolbach z wodą i przetrzymywane przez 48 godzin w temp. 3–5°C (59) lub przez 5–12 dni w 5°C (56).

Niezwykle ważną rolę odgrywają warunki środowiska w których przebiega wzrost i rozwój roślin-dawców pylników (50). Ogólnie rzecz biorąc, rośliny dla kultury pylników winny być prowadzone w jednakowych warunkach szklarniowych lub fitotronowych. Ważne jest utrzymanie optymalnych warunków dla zdrowotności roślin i odpowiedniego ich wigoru.

Stadium rozwojowe pyłku uważane jest za jeden z ważniejszych czynników wpływających na efektywność androgenезы (57). Najprościej można je określić na podstawie wybarwienia ziaren pyłku acetokarminem. Do wykładania na pożywki należy pobierać pylniki zawierające większość pyłku w średnim/późnym jednojądrowym stadium rozwoju.

Początkowy etap kultury należy przeprowadzać w ciemności (temp. 26°C). Wspomniane warunki są podobne dla kultury pylników zbóż i traw (57) i były z sukcesem zastosowane w doświadczeniach z pszenicą (56,59). Badania czynników fizycznych wpływających na androgenezę zostały przeprowadzone przez Bernard (28). W warunkach braku oddziaływania światła uzyskano 2,25 razy wyższą efektywność inicjacji zarodków w porównaniu z zastosowaniem doświetlania (3000 lux). Bernard (28) donosi, że z zarodków, których kulturę prowadzono w temp. 5°C uzyskano wyższą liczbę zielonych roślin w porównaniu z zarodkami prowadzonymi w temp. 27°C.

Innym badanym czynnikiem był sposób ułożenia pylników pszenżyta na pożywce. Rezultaty dwóch prac z jęczmieniem (60,61) świadczą, że pylniki ułożone „na boku”, w sposób umożliwiający kontakt z pożywką tylko jednym workiem pyłkowym, dawały lepsze rezultaty w porównaniu z ułożeniem „na wznak”, gdy możliwy był kontakt z pożywką obu worków pyłkowych.

c. Wpływ czynników chemicznych

Badania nad wpływem czynników chemicznych na kultury komórkowe lub tkankowe polegają w zasadzie na manipulowaniu składnikami pożywki. Duża liczba związków chemicznych wchodzących w skład pożywki, zróżnicowane połączenia i stężenia, które mogą być stosowane powodują, że ilość hipotetycznych kombinacji staje się nieograniczona. Dlatego sprawą o podstawowym znaczeniu jest identyfikacja genotypu charakteryzującego się pozytywną reakcją androgeniczną.

Zadowalające efekty w kulturach pylników roślin zbożowych osiągnięto stosując pożywkę N₆ (62,63) i różne modyfikacje pożywki typu *Potato* proponowanej przez badaczy chińskich (37,38). Zastosowanie pożywki *Potato* przyniosło sukces w wyhodowaniu francuskiej odmiany pszenicy (9).

W doświadczeniach z kulturami komórkowymi i tkankowymi kupkówki z powodzeniem stosowano pożywkę Shenka i Hidebrandta (64) uzupełnioną syntetyczną auksyną Dicamba (3,6-dichloro – 0-anisic acid) (19,43,44) w różnych modyfikacjach (45).

W kulturach pylnikowych używane były zarówno pożywki zestalone jak i płynne. Francuzi, w pracach z pszenicą, jako czynnik zestalający pożywkę stosowali agarozę (65). W doświadczeniach z niemieckimi ozimymi i jarymi odmianami pszenic zwyczajnych i twardych, jako czynnik żelujący używano skrobi pszenicy w ilości 90 g/l (56). Skrobia kukurydziana stosowana do stabilizacji pożywek dla kultur komórkowych tytoniu i marchwi była bardziej efektywna w porównaniu z agarem (66).

W wyniku zastosowania pożywek płynnych osiągnięto wzrost indukcji tkanki kalusowej pszenicy z 5,1% do 98,3%. (59). Kalus uzyskany na pożywkach płynnych wykazywał mniejszą zdolność do regeneracji roślin, ale z kolei można ją podwyższyć uzupełniając płynną pożywkę Ficollem 400 (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO.). Po raz pierwszy pozytywny wpływ Ficolu zauważono w kulturze pylników jęczmienia (67).

Do pożywek dodaje się również różne cukry będące źródłem węgla. W pożywkach do kultury pylników zazwyczaj jest stosowana wyższa ich koncentracja w porównaniu z warunkami kultury innych tkanek (68). Najczęściej stosowanym cukrem jest sacharoza. Foroughi-Wehr i Zeller (56) w kulturze pylników pszenicy z powodzeniem używali sacharozy w ilości 90 g/l.

d. Podwajanie liczby chromosomów roślin haploidalnych

W celu uzyskania form podwójnych haploidów i w końcowym wyniku – linii homozygotycznych konieczne jest podwojenie liczby chromosomów. Proces ten w znacznym zakresie może wystąpić spontanicznie (2), lub też może być indukowany. Francuzi traktowali haploidalne rośliny pszenicy 0,25% kolchicyną w 2% roztworze DMSO (dwumetylosulfotlenek) przez 4 godziny (9). Na tym etapie mogą wynikać określone trudności. Na przykład haploidalne rośliny kostrzewy trzcinowej (*Festuca arundinacea* Schreb.) uzyskane metodą kultury pylników/wiech

(40) nie mogły być podwojone z zastosowaniem kolchicyny (41). Stosowane techniki kultur tkankowych często opierały się na możliwości spontanicznego podwojenia liczby chromosomów, co ma miejsce w kulturach kalusa (przeł. 69). Kasperbauer i Eizenga (41) uzyskali kalus z eksplantatów łodyg haploidalnych roślin kostrzewy trzcinowej. Poprzez subkultury i utrzymywanie przez długi okres tkanki kalusowej autorzy byli w stanie uzyskać podwojone haploidy. Potencjalnym problemem wynikającym z zastosowania tej techniki może być możliwość powstawania aneuploidów, a także roślin euploidalnych (69). Cytologiczna analiza mejozy została zastosowana przy ocenie zregenerowanych roślin kostrzewy trzcinowej (70).

Cytologiczne potwierdzenie liczby chromosomów, zarówno roślin zregenerowanych z kultury pylników jak i po przeprowadzeniu podwojenia chromosomów, jest sprawą niezwykle ważną, zwłaszcza u pszenżyta ze względu na występowanie u tego gatunku zjawiska aneuploidalności regenerantów (71). Z uwagi na fakt, że niestabilność chromosomowa – jak się wydaje – jest podwyższona u mieszańców pokolenia F_1 , może zaistnieć konieczność uzyskiwania androgenetycznych roślin z mejotycznie ustabilizowanych, bardziej zaawansowanych generacji (71).

Podsumowanie

Umiejętność uzyskiwania regeneracji całego organizmu roślinnego z pojedynczych komórek posiadających pożądane cechy genetyczne jest koniecznym warunkiem stosowania technik *in vitro* w praktycznej hodowli. Jedną z teoretycznie najbardziej obiecujących technik umożliwiających uzyskiwanie form haploidalnych, a następnie linii homozygotycznych jest metoda androgenyzy *in vitro*. Dla wielu gatunków, ważnych z rolniczego punktu widzenia, metoda ta pozwala na uzyskiwanie zadowalających rezultatów. Jednakże pomimo pewnego postępu dokonanego w zakresie optymalizacji prowadzenia kultur pylnikowych roślin jednoliściennych, szerokie zastosowanie androgenyzy *in vitro* jest limitowane poważnymi trudnościami metodycznymi występującymi u wielu gatunków z rodziny *Gramineae*. Pomimo osiągnięcia niezaprzeczalnych sukcesów w hodowli (uzyskanie nowych odmian roślin zbożowych), technika ta jeszcze nie przekształciła się w rutynową procedurę. W celu zwiększenia efektywności i powtarzalności otrzymywanych wyników, w większości przypadków (szczególnie dla roślin jednoliściennych) nadal winny być modyfikowane i optymalizowane metody regeneracji roślin z kultur pylnikowych.

Literatura

1. Vasil J. K., (1982), in: Plant improvement and somatic cell genetics. Ed. Vasil I. K., Scowcroft W. R., Frey K. J., New York, Academic Press, 179–203.
2. Foroughi-Wehr B., Friedt W., (1984), Theor. Appl. Genet., 67, 121–124.
3. Brisson N., Paszkowski J., Penswick J. R., Gronenborn B., Potrykus J., Hohn T., (1984), Nature, 310, 511–514.
4. Krens F. A., Molendijk L., Wullems G. J., Schilperoort R. A., (1982), Nature, 296, 72–74.
5. Paszkowski J., Shillito W. R., Saul M., Mandak V., Hohn T., Hohn B., Potrykus J., (1984), EMBO-Journal, 3, 2717–2722.
6. Morrison R. A., Evans D. A., (1988), Bio/Technology, 6, 684–690.
7. Hu H., Hsi T. Y., Tseng C. C., Ouyang T. W., Ching C. K., (1978), in: Frontiers of Plant Tissue Culture. Ed. T. A. Thorpe, University Press, Calgary, 123–130.
8. Wenzel G., Foroughi-Wehr B., Friedt W., Kohler F., (1984), in: Biotechnology in International Agricultural Research. Proc. Inter-Center Seminar Intern. Agric. Res. Centers and Biotechnology, 65–73.
9. DeBuyser J., Henry Y., Lonnet P., Hertzog R., (1987), Plant Breeding, 98, 53–56.
10. Hu D. F., Yuan Z. D., Tang Y. L., Liu J. P., (1985), Sci. Sinica, 28, 7, 733–745.
11. Ouyang J. W., (1986), in: Haploids of higher plants in vitro, China Academic Publishers, Beijing, 26–41.

12. Vasil I. K., Vasil V., (1986), in: Cell Culture and Somatic, Cell Genetics of Plants, Ed. I. K. Vasil, 3, Academic Press, Orlando, 121–150.
13. Hu D., Y. Tang, Z. Yuan., J. Want., (1983), *Sci. Agric. Sinica*, 1, 29–35.
14. Bingham E. T., (1979), in: Polyploidy—biological relevance, Ed. W. H. Lewis, Plenum Press, New York, 471–487.
15. Bingham E. T., Mc Coy T. J., (1979), *Crop Sci.*, 19, 97–100.
16. Lentz E. M., Crane C. F., Slepser D. A., Loegering W. Q., (1983), *Can. J. Genet. Cytol.*, 25, 222–232.
17. Lumaret R., (1988), *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 7, 55–91.
18. Lundqvist A., (1969), *Hereditas*, 61, 353–36.
19. Songstad D. D., Conger B. V., (1986), *Am. J. Bot.*, 73, 989–992.
20. Boppenmeier J., Zuchner S., Foroughi–Wehr B., (1989), *Plant Breeding*, 103, 216–220.
21. Coumans M. P., Sohota S., Swanson E. B., (1989), *Plant Cell Rep.*, 7, 618–621.
22. Pescitelli S. M., Mitchell J. C., Jones A. M., Paredy D. R., Petolino J. F., (1989), *Plant Cell Reports.*, 7, 673–676.
23. Cho M. S., Zapata F. J., (1988), *Plant Science*, 58, 239–244.
24. Moon Za Kim., Raghavan V., (1988), *Plant Cell Reports*, 7, 560–563.
25. Liang G. H., Xu A., Hoang–Tang., (1987), *Crop Sci.*, 27, 336–339.
26. Huaping Zhou., Konzak C. F., (1989), *Crop Sci.*, 29, 817–821.
27. Pace G. M., Reed J. N., Ho L. C., Fahey J. W., (1987), *Theor. Appl. Genet.*, 73, 863–869.
28. Bernard S., (1980), *Z. Pflanzenzuchtg.*, 85, 4, 308–321.
29. Charmet G., (1985), *Agronomie*, 5, 8, 709–717.
30. Luk'janjuk S. F., Ignatova S. A., Sozinov A. A., (1983), *Tagungsbericht –Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR*, 207, 41–48.
31. Luk'janjuk S. F., Sulima Yu. G., Ignatova S. A., (1979), *Dokl. Vsesoyuznoj Akad. Sel'skokhoz. Nauk*, 1, 7–10.
32. Ignatova S. A., Luk'janjuk S. F., (1980), *Tsitol. Genet.*, 14, 60–63.
33. Ono H., Larter E. N., (1976), *Crop Sci.*, 16, 1, 120–122.
34. Schumann G., (1986), *Archiv Zuechtungsforschung.*, 16, 3, 153–159.
35. Sozinov A. A., Luk'janjuk S. F., Ignatova S. A., (1981), *Z. Pflanzenzucht.*, 86, 4, 272–285.
36. Vnuchkova V. A., (1979), *Soviet Agric. Sci.*, 10, 10–13.
37. Wang X., H. Hu., (1984), *Plant Sci. Lett.*, 36, 237–239.
38. Chuang C. C., Ouyang T. W., Chia H., Chou S. M., Ching C. K., (1978), in: *Proc. China–Australia Plant Tissue Cult. Symp.*, Peking, Science Press, Peking, 51–56.
39. Datta S. K., (1987), *Theor. Appl. Genet.*, 74, 121–124.
40. Kasperbauer M. J., Buckner R. C., Springer W. D., (1980), *Crop Sci.*, 20, 103–106.
41. Kasperbauer M. J., Eizenga G. C., (1985), *Crop Sci.*, 25, 1091–1095.
42. Conger B. V., McDonnell R. E., (1983), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2, 191–197.
43. Gray D. J., Conger B. V., Hanning G. E., (1984), *Protoplasma*, 122, 196–202.
44. Conger B. V., Hanning G. E., Gray D. J., McDaniel J. K., (1983), *Science*, 221, 850–851.
45. Songstad D. D., Conger B. V., (1988), *Crop Sci.*, 28, 1006–1009.
46. Dunwell J. M., (1985a), in: *Biotechnology in Plant Science*, Academic Press, New York, 49–76.
47. Gunn R. E., Day P. R., (1986), in: *Plant Tissue Culture and Its Agricultural Applications*, Ed. Withers and Anderson, Butterworths, London, 313–336.
48. Charmet G., Branlard G., (1985), *Theor. Appl. Genet.*, 71, 193–200.
49. Lukaszewski A. J., Gustafson J. P., (1987), in: *Plant Breeding Reviews*, Ed. J. Janick, 5, 41–92, Van Nostrand Reinhold Co., New York.
50. Ouyang J. W., He D. G., Feng G. H., Jia S. E., (1987), *Plant Science*, 49, 145–148.
51. Kaleikau E. K., Sears R. G., Gill B. S., (1989a), *Theor. Appl. Genet.*, 78, 625–632.
52. Kaleikau E. K., Sears R. G., Gill B. S., (1989b), *Theor. Appl. Genet.*, 78, 783–787.
53. Ray I. M., Bingham E. T., (1989), *Crop Sci.*, 29, 1545–1548.
54. Willman M. R., Schroll S. M., Hodges T. K., (1989), *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 25, 95–100.
55. Gavin A. L., Conger B. V., Trigiano R. N., (1989), *Plant Breeding*, 103, 251–254.
56. Foroughi–Wehr B., Zeller F. J., (1990), *Theor. Appl. Genet.*, 79, 77–80.
57. Dunwell J. M., (1985b), in: *Cereal Tissue and Cell Culture*, Ed. S. W. J. Bright i M. G. K. Jones. Martinus Nijhoff Dr.W.Junk publ., Dordrecht, 1–44.

58. Huang B., Sunderland N., (1982), *Ann. Bot.*, 49, 77–88.
59. Zhou H., Konzak C. F., (1989), *Crop Sci.*, 29, 817–821.
60. Hunter C. P., (1985), *Plant Cell Rep.*, 4, 267–268.
61. Shannon P. R. M., Nicholson A. E., Dunwell J. M., Davies D. R., (1985), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 4, 271–280.
62. Chu Ch. Ch., (1978), *Proc. Symp. Plant Tissue Cult.*, Science Press, Peking, 43–50.
63. Chu C. C., Wang C. C., Sun C. S., Hsu C., Yin K. C., Chu C. Y., Bi F. Y., (1975), *Sci. Sinica*, 28, 659–668.
64. Schenk R. U., Hildebrandt A. C., (1972), *Can. J. Bot.*, 50, 199–204.
65. Henry Y., DeBuyser J., Guenegou T., Ory C., (1984), *Theor. Appl. Genet.*, 67, 439–442.
66. Henderson W. E., Kinnersley A. M., (1988), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 15, 17–22.
67. Kao K. N., (1981), *Z. Pflanzenzuchtg.*, 103, 437–443.
68. Wenzel G., Foroughi-Wehr B., (1984), in: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, 1, Academic Press Inc., 311–327.
69. D'Amato F., (1985), *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 3, 73–112.
70. Reed J. N., Conger B. V., (1985), *Environ. Exp. Bot.*, 25, 277–284.
71. Charmet G., Bernard S., Bernard M., (1986), *Can. J. Genet. Cytol.*, 28, 444–452.

The Anther Culture of *Gramineae* – current status and perspectives

Summary

It has been realized that haploid production through *in vitro* anther culture could lead to rapid development of homozygous structures which might have application in the development of new and improved cultivars. Diploid pure lines obtained by androgenesis method can be used in conventional breeding programs. This will shorten the time for cultivar development.

Some aspects relating to *Gramineae* anther culture have been covered in this paper. The current status of the methodology of pollen embryogenesis and the many factors affecting this process have been reviewed.

Adres dla korespondencji:

Zygmunt Tomaszewski, Jr., Zakład Kultur Tkankowych, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie, 05–870 Blonie.