



Otrzymywanie i wykorzystanie linii podwojonych haploidów zbóż

Maria Wędzony

Zakład Fizjologii Roślin im. F. Górskiego, Polska Akademia Nauk,
Kraków

Production and application of doubled haploids in cereals

Summary

This paper provides an overview of the development of methods of cereals doubled haploid production over the last decade. The influence of genotype and albinism remain the main problem of androgenesis. Localisation of major genes influencing androgenic potential and manipulation with temperature during induction and regeneration offer possibilities of efficiency improvement. Isolated microspore culture in cereals is effective when microspores are co-cultured with sporophytic tissue. Gynogenic methods may be developed for some barley and apomictic wheat forms. Distant crosses that are followed by the elimination of chromosomes of the male parent from hybrid embryos are broadly applied. Maize and its relatives are used as effective pollinators of a wide range of cereal species since prezygotic barriers have not been found so far. Brief description of utilisation of doubled haploid lines in breeding programs, research and genetic transformation of cereals closes the overview.

Key words:

doubled haploids, cereals, androgenesis, gynogenesis, distant crosses.

Adres do korespondencji

Maria Wędzony,
Zakład Fizjologii Roślin,
Polska Akademia Nauk,
ul. Podłużna 3,
30-239 Kraków;
e-mail:
niwedzon@cyf-kr.edu.pl

1. Wstęp

Haploidy to rośliny znajdujące się w sporofitowej fazie rozwoju, ale posiadające gametyczną liczbę chromosomów. Mogą powstać bez udziału zapłodnienia z komórek gametofitu żeńskiego (gynogeneza) lub męskiego (androgeneza), a także po skrzyżowaniu odległych genetycznie gatunków i eliminacji chromatyny jednego z rodziców z mieszańcowych komórek zarodka. Haploidy stanowią interesujący obiekt badań genetycznych oraz

fizjologicznych, ponadto na poziomie haploidalnym skutecznie może być przeprowadzona selekcja dotycząca niektórych cech użytkowych (1-5). Wykorzystanie haploidów w hodowli możliwe jest po przywróceniu somatycznej liczby chromosomów danego gatunku co zapewnia ich prawidłowy rozdział w mejozie i przywraca roślinom płodność. Efekt ten uzyskuje się poddając merystemy wierzchołkowe rośliny haploidalnej działaniu czynników paraliżujących wrzeciono podziałowe (najczęściej kolchicyny) w wyniku czego podwaja się w komórkach liczba chromosomów (6-12). Podwojenie liczby chromosomów u haploida następuje niekiedy spontanicznie w trakcie kultury (13-22). Nasiona uzyskane po podwojeniu liczby chromosomów dają początek całkowicie homozygotycznym liniom, nazywanym liniami podwojonych haploidów lub liniami DH (skrót od *doubled haploid*, tj. podwojony haploid). W linii DH oba komplementy chromosomów siostrzanych są identyczne. Takiego stopnia homozygotyczności nie można uzyskać nawet po wielu latach chowu wsobnego stosowanego w hodowli konwencjonalnej.

W potomstwie roślin DH rozszczepienia cech nie powinny występować, dlatego selekcja przeprowadzona wśród nich jest skuteczniejsza, a ocena fenotypu bardziej jednoznaczna niż w przypadku selekcji dokonywanej w pokoleniach segregujących, gdzie zjawiska dominacji i heterozji mogą maskować działanie genów recesywnych (23-28). Wyselekcjonowane linie DH rozmnażane w izolacji powinny wykazywać całkowite wyrównanie cech, co zapewnia sprostanie wymogom odrębności, wyrównania i trwałości stawianym przy zgłoszeniu materiału do badań oficjalnych poprzedzających rejestrację odmiany. Homozygotyczne potomstwo linii DH może być wykorzystane w hodowli tak jak ustalone genetycznie linie. W hodowli heterozyjnej może zastępować linie wsobne, a w hodowli rekombinacyjnej eliminować segregujące pokolenia, skracając tym samym czas hodowli. „Florin”, pierwsza odmiana pszenicy będąca linią DH, została zarejestrowana we Francji zaledwie 7 lat po wykonaniu krzyżówki wyjściowej (25). Wykorzystanie hodowli opartej na liniach DH zwiększa prawdopodobieństwo uzyskania korzystnych rekombinacji, a linie DH stanowią ponadto bardzo przydatny materiał do badań nad dziedziczeniem cech ilościowych (26-29).

Haploidalne rośliny powstają w naturze spontanicznie, lecz zbyt rzadko by mogło mieć to praktyczne znaczenie. Pierwsze takie rośliny opisano już blisko osiemdziesiąt lat temu (30). Żywe zainteresowanie metodami otrzymywania i wykorzystania w hodowli linii podwojonych haploidów datuje się od lat sześćdziesiątych. Wtedy to w kilku laboratoriach uzyskano linie podwojonych haploidów z wydajnością, która dawała możliwości wykorzystania ich w programie hodowlanym (31-33). W ciągu następnych dziesięcioleci udoskonalano metody i z powodzeniem zastosowano je u wielu gatunków o praktycznym znaczeniu, np. u bawełny, ziemniaków, pomidorów, rzepaku, soi, buraków, tytoniu oraz większości zbóż (19,34-38).

2. Androgeneza

Najbardziej rozpowszechnionymi metodami otrzymywania linii DH są metody androgeniczne, a zatem te, które wykorzystują męską linię gametyczną do wyprawienia haploidalnej rośliny. Do najstarszych technik androgenicznych należą kultury pylników na pożywkach całkowicie lub częściowo zestalonych substancjami żelującymi (1,13,39-55). Później opracowano metody hodowli pylników na pożywkach półpłynnych lub płynnych, w tym tak zwaną „kulturę uwolnionych mikrospor” (*shed microspor culture*), gdzie w trakcie hodowli mikrospory samoistnie uwalniane są do pożywki (56). Ten ostatni rodzaj kultur pylnikowych stanowi ogniwo pośrednie prowadzące do kultur izolowanych mikrospor (15-20,57-60). Wyplukane z rozdrobnionych kłosów spory męskie hoduje się w zawieszynie lub na krążkach bibuły umieszczonych na zestalonej pożywce i nawilżonych pożywką płynną. Okazało się, że izolacja mikrospor zbóż i indukcja androgenicznego rozwoju w zawieszynie dokładnie oczyszczonej z fragmentów tkanki sporofitu macierzystego jest stosunkowo trudna. Znaczny wzrost wydajności osiągnięto poprzez hodowlę mikrospor z izolowanymi młodymi załącznikami (17,61-63). Skuteczna okazała się również kokultura z fragmentami młodych tkanek lub proliferującą zawiesziną komórek. Przypuszcza się, że tkanki te są źródłem czynnika wspomagającego indukcję, który dyfunduje za pośrednictwem pożywki do mikrospor. Obecnie trwają badania zmierzające do jego identyfikacji.

U większości gatunków roślin, w tym u zbóż, najbardziej podatne na indukcję są mikrospory w stadium jednojądrowym lub mikrospory dwujądrowe bezpośrednio po podziale. Aktywnym czynnikiem pożywki powodującym zmianę kierunku różnicowania mikrospory z drogi gametofitowej na sporofitową są auksyny lub ich analogi. Pod ich wpływem mikrospora zamiast wytworzyć zdolne do zapylenia ziarno pyłku i zdolne do zapłodnienia komórki plemnikowe, rozwija się najpierw w kalus lub strukturę podobną do zarodka zygocycznego nazywaną zarodkiem androgenicznym, a w starszym piśmiennictwie embrioidem. W odpowiednich warunkach zarodki androgeniczne mogą kiełkować bezpośrednio, często jednak na ich powierzchni powstają wtórnie zarodki somatyczne, z których następnie regenerowane są rośliny. Somatyczna embriogeneza obserwowana jest często u zbóż również na powierzchni kalusa, znacznie rzadziej regeneracja roślin odbywa się na drodze organogenezy. W tej samej kulturze wszystkie drogi regeneracji roślin z zaindukowanych mikrospor mogą ze sobą współistnieć w różnych proporcjach w zależności od genotypu, rodzaju pożywki, fizycznych warunków prowadzenia kultury oraz czasu jej trwania (44,62-73).

Ważnym czynnikiem wspomagającym indukcję okazał się stres abiotyczny w okresie poprzedzającym założenie kultury (3,18,22). Do najczęściej stosowanych czynników stresowych należy niska temperatura (2-6°C przez okres od kilku dni do trzech tygodni). W temperaturze 2-6°C przetrzymywane są, w zależności od metody, rośliny donorowe, ucięte pędy wraz z kłosami, kłosa wyizolowane z pochw liś-

ciowych i sterylnie umieszczone na szalkach w warunkach wysokiej wilgotności, izolowane pylniki lub mikrospory w początkowym okresie kultury. Stosowano również traktowanie materiału wysokimi temperaturami, inkubację kłosów lub pylników w mannitolu, oraz kombinację dwóch lub wszystkich trzech wymienionych czynników stresowych (16,21,48,74). Wykazano, że pod wpływem stresu w mikrosporach pojawiają się specyficzne grupy białek (*stress-induced proteins*), zmienia się aktywność enzymów komórkowych, przebudowany zostaje jej cytoszkielet oraz następuje zużycie zapasów energetycznych połączone z degradacją części organelli. Wszystkim tym procesom towarzyszy wydzielanie etylenu, ważnego czynnika o charakterze hormonalnym (Edwin Heberle-Bors, informacja własna). Interpretacja tych zjawisk napotyka na pewne trudności. Nie ma pewności, które z wymienionych zjawisk mają charakter pierwotny, a które wtórny, oraz w jaki sposób wpływają one na proces indukcji androgenicznej. Pomimo wykazania skuteczności działania czynników stresowych w podniesieniu wydajności kultur androgenicznych nie udało się przełamać barier genetycznych stanowiących podstawową przeszkodę utrudniającą powszechne zastosowanie metod androgenicznych w hodowli.

Proces androgenyzy jest wieloetapowy i regulowany przez szereg genów rozmieszczonych w różnych chromosomach. Działanie niektórych genów ma charakter addytywny, inne wykazują dominację (23,29,46-48,50,71,74-79). Wykazano także, że czynnik cytoplazmatyczny odgrywa istotną rolę modyfikując działanie genów jądrowych (24,80). Geny kontrolujące somatyczną embriogenezę z kalusa uzyskanego z tkanek somatycznych są także aktywne w przypadku kultur androgenicznych (81-88). Zdolność do indukcji androgenicznej i regeneracji roślin z zaindukowanych struktur jest determinowana poligenicznie, a dziedziczenie tych cech jest niezależne (89).

Linie i odmiany podatne na androgenezę występują z różną częstością w zależności od gatunku. Stosunkowo dużo podatnych materiałów zidentyfikowano wśród pszenic heksaploidalnych, heksaploidalnego pszenżyta i u jęczmienia. Za gatunki odporne uważa się żyto (12,46,74,92,93), pszenice tetraploidalne (47,75,94-96), owies (50,73,97,98), kukurydzę (6,20), sorgo i ryż (14,61,99,100). Każdy z gatunków, a często także odmiany w obrębie gatunku, mają swoje specyficzne wymagania dotyczące składników pożywek, poziomu i rodzaju stosowanych substancji hormonalnych oraz warunków hodowli, toteż praca z nowymi materiałami wymaga zazwyczaj modyfikacji i dostosowywania metod.

Obok genów regulujących poziom indukcji i regeneracji istotną rolę odgrywają geny, zarówno jądrowe jak i cytoplazmatyczne, determinujące częstość pojawiania się regenerantów pozbawionych chlorofilu, tj. albinosów (81,101-103). Okazuje się, że utrata chlorofilu powodowana może być nieodwracalnymi uszkodzeniami DNA chloroplastów kodującego funkcje niektórych enzymów związanych z syntezą tego barwnika bądź ze szlakiem enzymatycznym syntezy białek i kwasów nukleinowych w chloroplastach. Albinizm uwidacznia się w okresie regeneracji roślin, ale nie znany jest okres powstawania uszkodzeń. Stwierdzono, że podniesienie temperatury in-

kubacji do 32°C w okresie przedindukcyjnym zwiększa częstotliwość występowania albinosów, zaś obniżenie temperatury poniżej 12°C w początkowym okresie regeneracji działa hamująco na ich powstawanie.

3. Gynogenez

Gynogenez, czyli pobudzenie do rozwoju w roślinie haploidalnych komórek gametofitu żeńskiego (woreczka zalążkowego) bez udziału zapłodnienia, jak dotąd, jest wykorzystywana rzadziej, jednakże w ostatnich latach metoda ta nabiera znaczenia u niektórych gatunków. Jednym ze sposobów zaindukowania gynogenez jest hodowla niezapylnych zalążków *in vitro* na pożywkach zawierających auksyny lub ich analogi. Spośród zbóż gynogenezę w warunkach *in vitro* uzyskano u pszenicy (104,105) i ryżu (106). W przypadku niektórych genotypów pszenicy (107,108) oraz jęczmienia (109,110) partenogeniczny rozwój zarodków wywołano traktując *in planta* kwiaty roztworami auksyn. Zdolność do rozwoju gynogenicznego jest prawdopodobnie powiązana z naturalną zdolnością do apomiksji. Możliwość wyprowadzania haploidów przez stosunkowo prosty zabieg traktowania substancjami chemicznymi jest bardzo interesująca z praktycznego punktu widzenia, jak dotąd ograniczona jednak do nielicznych genotypów.

4. Krzyżowania oddalone

Najczęściej do zaindukowania rozwoju komórki jajowej w zarodek potrzebne jest zapylenie. Jeżeli sama obecność łagiewek w słupku lub zalążni, albo też rozwój bielma prowokuje komórkę jajową do podziałów, pomimo że nie dochodzi do jej zapłodnienia mówimy o partenogenezie indukowanej. Osobne miejsce zajmuje zjawisko eliminacji chromosomów jednego z rodziców z jąder mieszańcowego zarodka rozwijającego się w następstwie krzyżowań międzygatunkowych lub międzyrodzajowych w obrębie *Poaceae* (29,36,39). Zarodki takie w naturze zamierają z powodu zaburzeń w rozwoju bielma (111-114). W warunkach laboratoryjnych można je hodować *in vitro* jednak dla uzyskania zarodków wystarczająco rozwiniętych do hodowli z reguły niezbędne jest traktowanie zapylnych kwiatów auksynami lub ich analogami. Na bazie kultur *in vitro* opracowano szereg metod podtrzymania dalszego rozwoju zarodka, aż do wytworzenia haploidalnych roślin (29,115-121).

Metodą krzyżowań oddalonych najwcześniej, bo już ponad 30 lat temu na szeroką skalę otrzymywano haploidy uprawnych form jęczmienia, zapyłając je dzikim gatunkiem, *Hordeum bulbosum* (8,33,122-128). Dla zwiększenia skuteczności krzyżowania zapylane kłosa traktuje się roztworem gibereliny oraz IAA przed lub po zapyleniu. Metoda *bulbosum* odgrywa do dziś duże znaczenie w hodowli jęczmienia i ponad 55 odmian jęczmienia zarejestrowanych w różnych krajach to podwojone

haploidy uzyskane tą drogą (Ken Kasha, informacja własna). Metoda ta może być stosowana również w niektórych form pszenicy i pszenżyta (8,3,126). Jednak bariery krzyżowalności pomiędzy wieloma formami pszenicy i pszenżyta a *H. bulbosum* znacznie ograniczają jej zastosowanie (129-134).

Stosunkowo niedawno stwierdzono, że krzyżowanie pszenicy z kukurydzą (*Zea mays*) i niektórymi pokrewnymi gatunkami takimi jak kukurydza meksykańska – teosinte (*Zea mays* spp. *mexicana*) (135), sorgo (*Sorghum bicolor*) (136,137), i proso amerykańskie (*Pennisetum glaucum* synonim *Pennisetum americana*) (36,136,138,139) prowadzi do formowania haploidalnych zarodków roślin formy matecznej, tj. pszenicy. Pierwsze doniesienia (111) o obecności zarodków w zalążkach pszenicy zapyłonej kukurydzą wzbudziły duże zainteresowanie hodowców. W dalszych badaniach (112,115,140) ujawniono, że chromatyna kukurydzy jest eliminowana z jąder komórek zarodków już w trakcie pierwszych podziałów. Pszenice łatwo krzyżują się z kukurydzą bez względu na obecność dominujących alleli *Kr*, hamujących wzrost łagiewek *H. bulbosum* w słupkach pszenicy (29,76,118,156). Mechanizm eliminacji chromosomów kukurydzy oraz brak barier krzyżowalności, jak się okazało, był powszechny dla *Triticeae* dzięki czemu tą drogą otrzymano również haploidalne zarodki jęczmienia (117), owsa (25,142-144), żyta (92,93,145) i pszenżyta (120,121,146). Tylko w przypadku owsa do osiągnięcia sukcesu nie jest potrzebne traktowanie zapyłonych kwiatostanów auksynami. Ponadto u tego gatunku eliminacja chromosomów kukurydzy nie zawsze jest zupełna o czym świadczy uzyskanie częściowych mieszańców owsa z kukurydzą (142,144,147,148). Należy podkreślić, że zjawisko niepełnej eliminacji chromosomów kukurydzy o potencjalnie niezwykle interesujących konsekwencjach hodowlanych nie zostało, jak dotąd, zaobserwowane u innych gatunków roślin zbożowych.

Dla różnych genotypów pszenicy uzyskiwano od 10 do 30 haploidalnych zarodków na 100 zapyłonych kwiatów (29,36,39). Dla wielu genotypów pszenicy, które nie poddają się indukcji androgenicznej krzyżowania oddalone, jak się wydaje, są jedyną szansą na otrzymanie linii podwojonych haploidów (29,36,39,74,136,139,149,150). Większa niż w przypadku androgenyzy podatność genotypów zbóż na tę metodę oraz brak albinotycznych roślin wśród regenerantów stanowią duże walory krzyżowań oddalonych w porównaniu z metodami androgenicznymi.

5. Wykorzystanie linii podwojonych haploidów w hodowli zbóż

Wykorzystanie linii DH w hodowli oszczędza wiele lat potrzebnych dla homozygotyzacji i wyrównania materiałów i z tego właśnie względu zwróciły one uwagę hodowców. Faktyczna liczba zaoszczędzonych lat pracy zależy od tego w jakim pokoleniu (F_1 , F_2 ...) wyprowadzono linie oraz w którym pokoleniu kieruje się zazwyczaj do doświadczeń linie otrzymane w tradycyjnym programie hodowlanym. Kryteria oceny odmian stosowane w Europie wymagają bardzo wysokiego stopnia wyrówna-

nia cech często trudnego do osiągnięcia w tradycyjnej hodowli, zatem wyprowadzenie linii DH nawet w późniejszych pokoleniach może okazać się korzystne.

Aby linie DH mogły być skutecznie wykorzystane w hodowli populacja linii DH otrzymanych z jednego mieszańca F1 musi być odpowiednio duża. Na przykład jeżeli rodzice różnią się pięcioma niezależnie segregującymi genami, należy dysponować przynajmniej 95 liniami DH wyprowadzonymi z jednego mieszańca F1 aby z prawdopodobieństwem 0,01 otrzymać linię, która gromadzi wszystkie pożądane allele (151,152). Przy większej liczbie segregujących loci minimalna liczba potrzebnych do selekcji linii DH gwałtownie rośnie. Z danych tych wynika, że hodowla na bazie linii DH może być skuteczna tylko w przypadku starannego doboru materiałów wyjściowych do krzyżowań oraz wydajności metody zapewniającej otrzymanie przynajmniej 100 linii DH z jednego mieszańca F1. Rozważania te są prawdziwe tylko przy założeniu, że każda cecha dziedziczy się z jednakowym prawdopodobieństwem. Tymczasem na podstawie analizy dziedziczenia molekularnych markerów genetycznych w liniach DH otrzymanych na drodze androgenozy u jęczmienia (151-153) oraz u ryżu (154) stwierdzono, że stosunki rozszczepień badanych cech monogenicznych w populacji linii DH odbiegają od oczekiwanego 1 : 1. Podobne odchylenia wystąpiły w liniach DH tytoniu (155), pszenicy (156) i jęczmienia (157). Jest możliwe, że cechy segregujące w nieprawidłowy sposób były sprzężone ze zdolnością do indukcji lub regeneracji w procesie androgenozy. Wśród androgenicznie otrzymanych linii DH zidentyfikowano również geny nie występujące u żadnego z rodziców (158-162). Przypuszcza się, że przyczyną tych zjawisk może być zmienność gametoklonalna powstająca w okresie kalusowania mikrospory lub mutacje spowodowane zastosowaniem kolchicyny do podwojenia liczby chromosomów, w związku z tym dąży się do skrócenia etapu kalusowania i zwiększenia liczby spontanicznych podwojeń (17,48,64,67).

Badania linii DH jęczmienia otrzymanych metodą krzyżowań oddalonych nie wykazały odchylenia od oczekiwanej proporcji badanych cech (26,162-168). Porównując populację linii DH jęczmienia otrzymanych metodą *bulbosum* z populacją linii wyprowadzonych z tego samego krzyżowania metodą rodowodową i metodą pojedynczych nasion oraz ramszu wykazano, że linie DH reprezentowały większe zróżnicowanie genetyczne oraz średnio plonowały gorzej. Jednak najlepsze linie wyprowadzone za pomocą wszystkich metod były do siebie bardzo podobne (166-169). Podsumowując można stwierdzić, że mniejsza zależność od genotypu matki oraz prawidłowa segregacja cech rodziców w liniach DH otrzymanych z krzyżowań oddalonych stanowi duży walor tych metod w hodowli roślin zbożowych.

Do najnowszych zastosowań haploidów należy wykorzystanie ich jako obiektów do transformacji genetycznej (170,171). Transformowanie tkanki haploidalnej jest korzystne, gdyż komórki zawierają pojedynczą kopię każdego chromosomu dzięki czemu wprowadzone geny powinny wykazywać pełną ekspresję ułatwiając tym samym właściwą selekcję. Po podwojeniu kompletu chromosomów i uzyskaniu linii DH transgen znajduje się od razu w stanie homozygotyczności, co ułatwia selekcję

i właściwą ocenę przydatności transformowanego materiału. Wyprowadzanie linii DH stosuje się także powszechnie do szybkiego wyrównania z materiałów transformowanych w diploidalnej fazie rozwoju.

6. Zakończenie

Z uwagi na wymienione możliwości wykorzystania linii podwojonych haploidów nie słabnie zainteresowanie nimi zarówno naukowców jak i praktyków. Aktualnie badania zmierzają w kierunku pokonania barier genetycznych, zmniejszenia czasochłonności i pracochłonności metod oraz wyeliminowania drogich i toksycznych substancji z procesu (np. kolchicyny). Duże firmy hodowlane dysponują własnymi laboratoriami *in vitro*, powstają też liczne niewielkie laboratoria świadczące usługi polegające na wyprowadzaniu linii DH z materiałów powierzonych przez hodowców. Wydaje się, że w Polsce wciąż jeszcze metoda ta nie cieszy się zainteresowaniem praktyków w stopniu adekwatnym do potencjalnych korzyści płynących z jej stosowania w programach hodowlanych.

Literatura

1. Bullock W. P., Beanziger P. S., Schaeffer G. W., Bottino P. J., (1982), *Theor. Appl. Genet.*, 62, 155-159.
2. Medrano H., Primo-Millo E., (1985), *Plant Physiol.*, 79, 505-508.
3. Ye J. M., Kao K. N., Harvey B. L., Rossnagel B. G., (1987), *Theor. Appl. Genet.*, 74, 426-429.
4. Wernsman E. A., (1992), in: *Plant Breeding in the 1990 CAB International*, Eds. H. T. Stalker, J. P. Murphy, Wallingford, Oxon, 461-486.
5. Bozorgipour R., Snape J. W., (1992), *Theor. Appl. Genet.*, 62, 155-159.
6. Barnabas B., Obert B., Kovacs G., (1999), *Plant Cell Rep.*, 18, 858-862.
7. Barnabas B., Pfahler P. L., Kovacs G., (1991), *Theor. Appl. Genet.*, 81, 675-678.
8. Inagaki M., (1985), *Jap. J. Breed.*, 35, 193-195.
9. Mentewab A., Sarrafi A., (1997), *Cer. Res. Com.*, 25(4), 897-903
10. Redha A., Attia T., Buter B., Saisintong S., Stamp P., Schmid J. E., (1998), *Plant Cell Rep.*, 17, 974-979.
11. Szakacs E., Barnabas B., (1995), *Euphytica*, 83(3), 209-213.
12. Wenzel G., Hoffmann F., Tomas E., (1977), *Theor. Appl. Genet.*, 51, 81-86.
13. Gonzales M., Hernandez I., Jouve N., (1997), *Plant Breed.*, 116, 302-304.
14. Guiderdoni E., (1991), *Theor. Appl. Genet.*, 81, 406-412.
15. Gustafson V. D., Baenziger P. S., Wright M. S., Stroup W. W., Yang Yen., (1995), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 42, 207-213.
16. Hoekstra S., van Bergen S., van Brouwershaven R., Schilperoord R. A., Heidekamp F., (1996), *J. Plant Physiol.*, 148, 696-700.
17. Hu T., Kasha K. J., (1997), *Plant Cell Rep.*, 16, 520-525.
18. Immonen S., Robinson J., (2000), *Plant Sci.*, 150, 77-84.
19. Jahne A., Lorz H., (1995), *Plant Science*, 109, 1-12.
20. Naegeli M., (1998), *Isolated microspore culture of maize (Zea Mays L.)*, Dissertation theses Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, 106.
21. Touraev A., Indrianto A., Wratschko I., Vicente O., Heberle-Bors E., (1996), *Sex. Plant Rep.*, 12, 149-154.

22. Touraev A., Vicente O., Heberle-Bors E., (1997), *Trends in Plant Sci.*, 2, 297-302.
23. Charmet G., Bernard S., (1984), *Theor. Appl. Genet.*, 69, 55-61.
24. Charmet G., Vedel F., Bernard M., Bernard S., Mathieu C., (1985), *Agronomie*, 5(8), 709-717.
25. de Buyser J., Henry Y., Lonnet P., Hertzog R., Hespel A., (1987), *Plant Breeding*, 98, 53-56.
26. Adamski T., (1993), *Wykorzystanie linii podwojonych haploidów w analizie statystyczno-genetycznej*, Ser. Rozprawy i Monografie (2), Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań, 61.
27. Bozorgipour R., Snape J. W., (1992), *Theor. Appl. Genet.*, 62, 155-159.
28. Snape J. W., (1989), in: *Review of advances in plant biotechnology*, Eds. A. Mujeeb-Kazi, L. A. Sitch, Springer-Verlag, Berlin, New York, 19-30.
29. Suenaga K., (1994), *Bull. Nat. Inst. Agr. Resour.*, 9, 83-139.
30. Blakeslee A. F., Belling M. E., Farnham M. E., Bergner A. D., (1922), *Science*, 55, 646-647.
31. Guha S., Maheshwari S. C., (1964), *Nature*, 204, 497.
32. Nitsch J. P., Nitsch C., (1969), *Science*, 163, 85-87.
33. Kasha K. J., Kao K. N., (1970), *Nature*, 225, 874-876.
34. Ouyang J., (1986), in: *Haploids of higher plants in vitro*, Eds. Han H., Hongyuan Y., China Academic Publ. Beijing, Springer Verlag, Berlin, New York, Tokyo, 26-41.
35. Laurie D. A., O'Donoghue S., Bennett M. D., (1990), in: *Gene Manipulation in Plant Improvement*, II, Ed. Gustafson J. P., Plenum Press, New York, 95-126.
36. Schumann G., (1990), in: *Biotechnology in agriculture and forestry*, Ed. Bajaj Y. P. S., vol. 13, Wheat, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 383-402.
37. Wenzel G., Foroughi-Wehr B., (1984), in: *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, Ed. Vasil I. K., Academic Press Inc., 311-327.
38. Mujeeb-Kazi A., Riera-Lizarazu O., (1997), in: *In vitro haploid production in higher plants*, Eds. Mohan-Jain S., Spory S. K., Veilleux R. E., Kluwer Academic Press, Dordrecht, 276-295.
39. Ball S. T., Zhou H., Konzak C. F., (1992), *Crop Sci.*, 32(1), 149-154.
40. Barnabas B., Szakacs E., Kovacs G., (1989), *Sveriges Letsadesforenings Tideskrift*, 98, 125-129.
41. Bernard S., (1980), *Z. Pflanzenzcht.*, 85, 308-321.
42. Chu C. C., Hill R. D., (1988), *Plant Sci.*, 55, 175-181.
43. Chu C. C., Hill R. D., Brule-Babel A. L., (1990), *Plant Sci.*, 66, 255-262.
44. Chuang C. C., Ouyang J., Chia H., Chou S. M., Ching C. K., (1978), *Proc. China-Australia Plant Tissue Culture Symposium*, Peking, 51-66.
45. El-Maksoud M. M. A., Bedö Z., (1993), *Cer. Res. Comm.*, 21(1), 17-24.
46. Fleihinghaus T., Deimling S., Geiger H. H., (1991), *Plant Cell Rep.*, 10, 397-400.
47. Ghaemi M., Sarrafi A., Alibert G., (1995), *Cer. Res. Comm.*, 23(3), 215-222.
48. Karsai Z., Bedö Z., (1997), *Cer. Res. Comm.*, 25(2), 109-116.
49. Karsai Z., Bedö Z., Hayes P. M., (1994), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 39, 49-53.
50. Kiviharju E., Puolimatka M., (1998), *Agr. Food Sci. Finland.*, 7, 409-422.
51. Marciniak K., Banaszak Z., Wędzony M., (1998), *Cer. Res. Comm.*, 26(2), 145-151.
52. Navarro-Alvarez W., Baenziger P. S., Eskridge K. M., Shelton D. R., Gustafson V. D., Hugo M., (1994), *Plant Breed.*, 112, 53-62.
53. Orshinsky B. R., McGregor L. J., Johnson G. I. E., Huel P., Kartha K. K., (1990), *Plant Cell Rep.*, 9, 365-369.
54. Ponitka A., Ślusarkiewicz-Jarzina A., (1996), *J. Appl. Genet.*, 37(3), 253-260.
55. Ponitka A., Ślusarkiewicz-Jarzina A., Wędzony M., Marcińska I., Woźna J., (1999), *J. Appl. Genet.*, 40(3), 165-170.
56. Sunderland N., Xu Z. H., (1982), *J. Exp. Bot.*, 33, 1086-1095.
57. Mejza S. J., Morgant V., DiBona D. E., Wong J. R., (1993), *Plant Cell Rep.*, 12, 149-153.
58. Scott P., Lyne R. L., Rees T., (1995), *Planta*, 197, 435-441.
59. Sulmenkallio-Marttila M., Kurten U., Kauppinen V., (1995), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 43, 79-81.
60. Tuveson I. K., Ohlund R. C. V., (1993), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 34, 163-167.
61. Xie J. H., Gao M. W., Cai Q. H., Liang Z. Q., Xue Q. Z., (1996), *Cer. Res. Comm.*, 24(2), 133-138.
62. Bruins M. B. M., Rakoczy-Trojanowska M., Snijders C. H. A., (1996), *Cer. Res. Comm.*, 24(4) 401-407.

63. Poulimatka M., Laine S., Pauk J., (1996), *Cer. Res. Comm.*, 24(4), 393-400.
64. Hassawi D. S., Liang G. H., (1990), *Plant Breed.*, 105, 332-336.
65. Orshinsky B. R., Sadasivaiah R. S., (1994), *Plant Sci.*, 102, 99-107.
66. Otani M., Shimada T., (1993), *Cer. Res. Comm.*, 21(1), 11-15.
67. Rogalska S. M., Mikulski W., (1995), *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, 195/196, 21-31.
68. Rybczyński J. J., Simonson R. L., Baenziger P. S., (1991), *Cell. Dev. Biol.*, 27, 168-174.
69. Schumann G., Hoffman B., (1989), *Arch. Zuchtungenforsch.*, Berlin, 19(4), 21-27.
70. Szuka E., Szozda A., Wędzony M., Gielwanowska I., Bednara J., (1999), *Acta Biol. Crak. ser. Bot.*, 41, 169-175.
71. Sozinov A., Lukjanjuk S., Ignatova S., (1981), *Z. Pflanzenzcht.*, 86, 272-285.
72. Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A., (1997), *J. Appl. Genet.*, 38(3), 253-258.
73. Wędzony M., Marcińska I., Golemic E., Zur. I., (2000), *Plant Cell Rep.*, in press.
74. Kiviharju E., Pehu E., (1998), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 54, 97-104.
75. Amrani N., Sarrafi A., Alibert G., (1993), *Plant Breed.*, 110, 123-128.
76. Deimling S., Geiger H. H., (1996), *Votr. Pflanzenzuchtg.*, 35, 225-235.
77. Lazar M. D., Shaeffer G. W., Baenziger P. S., (1990), *Plant Cell Rep.*, 8, 525-529.
78. Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A., Adamski T., Surma M., (1996), *J. Appl. Genet.*, 37A, 208-212.
79. Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A., Wędzony M., Marcińska I., Woźna J., (1997), *Zeszyty Naukowe Akademia Rolnicza, Kraków*, 50, 313-315.
80. Wang P., Chen Y., (1983), *Acta Agron. Sin.*, (9), 283-284.
81. Day A., Ellis T. H. N., (1984), *Cell*, 39, 359-368.
82. Mathias R. J., Fukui K., (1986), *Theor. Appl. Genet.*, 72, 70-75.
83. Higgins P., Mathias R. J., (1987), *Theor. Appl. Genet.*, 74, 439-444.
84. Mathias R. J., Atkinson E., (1988), *Theor. Appl. Genet.*, 75, 474-479.
85. Felsenburg T., Feldman M., Galuv E., (1987), *Theor. Appl. Genet.*, 74, 802-810.
86. Galiba G., Kovacs G., Sutka J., (1986), *Plant Breed.*, 97, 261-263.
87. Kaleikau E. K., Sears R. G., Gill B. S., (1989a), *Theor. Appl. Genet.*, 78, 625-632.
88. Kaleikau E. K., Sears R. G., Gill B. S., (1989b), *Theor. Appl. Genet.*, 78, 783-787.
89. de Buyser J., Marcotte J-L., Henry Y., (1992), *Euphytica*, 63, 265-270.
90. Henry Y., Marcotte J-L., de Buyser J., (1994), *Theor. Appl. Genet.*, 89, 344-350.
91. Szakacs E., Kovacs G., Pauk J., Barnabas B., (1988), *Plant Cell Rep.*, 7, 127-129.
92. Deimling S., Flehinghaus-Roux T., Rober F., Schechert A., Roux S. R., Geiger H. H., (1994), 8th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Florencja, (June 12-17), 95.
93. Deimling S., Flehinghaus-Roux T., (1996), in: *In vitro haploid production in higher plants*, Eds. Mohan-Jain S., Spory S. K., Veilleux R. E., 181-204, Kluwer Academic Press, Dordrecht.
94. Immonen S., Anttila H., (1996), *Votr. Pflanzenzuchtg.*, 35, 237-244.
95. Immonen S., Anttila H., (1998), *Plant Science*, 139, 213-222.
96. Otani M., Shimada T., (1994), *J. Genet. Breed.*, 48, 103-106.
97. Kiviharju E. M., (1999), *Development of anther culture for oat*, Academic Dissertation. Vammalan Kirjapaino Oy, University of Helsinki, 104.
98. Kiviharju E. M., Tauriainen A. A., (1999), *L. Plant Cell Rep.*, 18, 582-588.
99. Alemanno L., Guiderdoni E., (1994), *Plant Cell Rep.*, 13, 432-436.
100. Lentini Z., Reyes P., Martinez C. P., Roca W. M., (1995), *Plant Sci.*, 110, 127-138.
101. Mouritzen P., Holm P. B., (1994), in: 8th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Florencja, (June 12-17), 86.
102. Caredda S., Doncoeur C., Devaux P., Sangwan R., Clement C., (1999), in: *Gametic Embryogenesis in Monocots*, COST-824 Workshop, (June 10-13), Jokioinen Finland, 30-33.
103. Rode A., Hartmann C., Dron M., Picard E., Quetier F., (1985), *Theor. Appl. Genet.*, 71, 320-328.
104. Zhu Z. C., Wu H. S., An Q. K., Liu Z. Y., (1981), *Acta Genet. Sin.*, 8, 386-389.
105. Comeau A., Nadeau A., Plourde, Simard R., Maes S., Kelly S., Harper L., Lettre J., Landry B., St.Pierre C. A., (1992), *Plant Sci.*, 81, 117-125.
106. Zhou C., Yang H. Y., (1981), *Plant Sci. Lett.*, 20, 231-237.

107. Matzk F., (1991), *Sex. Plant Repr.*, 4, 88-90.
108. Matzk F., Meyer H.-M., Bäumlein H., Balzer H.-J., (1995), *Sex Plant Rep.*, 8, 266-272.
109. Gaj M., (1998), *J. Appl. Gen.*, 39A, 96-98.
110. Gaj M., Gaj M. D., (1996), *J. Appl. Genetics (Genet. Pol.)*, 37A, 187-190.
111. Zenkteler M., Nitzsche W., (1984), *Theor. Appl. Genet.*, 68, 311-315.
112. Laurie D. A., Bennett M. D., (1986), *Can. J. Genet. Cytol.*, 28, 313-316.
113. Laurie D. A., Bennett M. D., (1989), *Genome*, 32, 953-961.
114. Wędzony M., van Lammeren A. A. M., (1996), *Annals of Botany*, 77, 639-649.
115. Laurie D. A., Bennett M. D., (1988), *Theor. Appl. Genet.*, 76, 393-397.
116. Chen F. Q., Hayes P. M., Rivin C. J., (1991), *Genome*, 34, 603-605.
117. Furusho M., Suenaga K., Nakajima K., (1991), *Jap. J. Breed.*, 41, 175-179.
118. Matzk F., Mahn A., (1994), *Plant Breed.*, 113, 125-129.
119. Riera-Lizarazu O., Dewney W., Carman J. G., (1992), *Crop Sci.*, 32, 108-114.
120. Wędzony M., Marcińska I., Ponitka A., Ślusarkiewicz-Jarzina A., Woźna J., (1998a), *Plant Breed.*, 117, 211-215.
121. Wędzony M., Marcińska I., Ponitka A., Ślusarkiewicz-Jarzina A., Woźna J., (1998b), *Ed. Juskiw P., Proceedings of 4th International Triticale Symposium, Vol. 1. Lectures. Red Deer, Canada (July 26-30), 45-52.*
122. Ho K. M., Kasha K. J., (1975), *Genetics*, 81, 263-275.
123. Pickering R. A., (1984), *Plant Science Letters*, 34, 153-164.
124. Pickering R. A., Rennie W. F., (1990), *Euphytica*, 45, 251-255.
125. Pickering R. A., Wallace A. R., (1994), *Plant Breed.*, 113, 174-176.
126. Sitch L. A., Snape J. W., (1986), *Euphytica*, 35(3), 1045-1051.
127. Thomas H. M., Pickering R. A., (1983), *Theor. Appl. Genet.*, 66, 135-140.
128. Barclay I. R., Shepherd K. W., Sparrow D. H. B., (1972), *Bienn. Rep.*, (1970-1971), *Chromosome elimination in *Hordeum vulgare* x *Hordeum bulbosum* hybrid*, Weite Agric. Res. Inst, University Adelaide, Australia, 39-40.
129. Lange W., (1971a), *Euphytica*, 20, 14-29.
130. Lange W., (1971b), *Euphytica*, 20, 181-194.
131. Lange W., Wojciechowska B., (1976), *Euphytica*, 25, 609-620.
132. Wojciechowska B., (1985), *L. Genet. Pol.*, 26, 457-462.
133. Wojciechowska B., Lange W., (1977), *Euphytica*, 26, 287-297.
134. Wojciechowska B., Pudelska H., (1993), *Genet. Pol.*, 34(1), 1-13.
135. Ushiyama T., Shimizu T., Kuwabara T., (1991), *Japan. J. Breed.*, 41, 353-357.
136. Inagaki M. N., Tahir M., (1992), *Hereditas*, 116, 117-120.
137. Riera-Lizarazu O., Mujeeb-Kazi A., William M. D. H. M., (1992), *J. Genet. Breed.*, 46, 335-346.
138. Inagaki M., Mujeeb-Kazi A., (1995), *Breed. Sci.*, 45, 157-161.
139. Ohkawa Y., Suenaga K., Ogawa K., (1992), *Japan. J. Breed.*, 42, 891-894.
140. Ahmad F., Comeau A., (1990), *Euphytica*, 50, 181-190.
141. Inagaki M., Bohorova N., (1995), *Breed. Sci.*, 45, 21-24.
142. Riera-Lizarazu O., Rines H. W., Phillips R. L., (1992), *Amer. Soc. Agron. Abstr.*, 112.
143. Rines H. W., Dahleen L. S., (1990), *Crop Sci.*, 30, 1073-1078.
144. Rines H. W., Riera-Lizarazu O., Phillips R. L., (1995), in: *Modification of gene expression and non-mendelian inheritance*, Eds. Oono K., Takaiwa F., 235-251, *Natl. Inst. Agrobiol. Resources*, Tsukuba, Japan.
145. Bolesta E., Wędzony M., Rakoczy-Trojanowska M., (1997), *Zeszyty Naukowe, Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja, Kraków*, 318 (50), 297-300.
146. Rogalska S. M., Mikulski W., (1996), in: *Triticale, today and tomorrow*, Eds. Guedes-Pinto H., Darvey N., Carriole V. P., *Kluwer Academic Publ.*, Dordrecht, 379-382.
147. Riera-Lizarazu O., Rines H. W., Phillips R. L., (1996), *Theor. Appl. Genet.*, 92, 345-352.
148. Rines H. W., Riera-Lizarazu O., Maquieira S. B., Phillips R. L., (1996), in: *Proceedings of International Oat Conference and International Barley Genetic Symposium*, Invited papers, Eds. G. Scoles, B. Rossnagel, 207-212.

149. Suenaga N., Nakajima K., (1989), *Plant Cell Rep.*, 8, 163-266.
150. Kisana N. S., Nkongolo K. K., Quick J. S., Johnson D. L., (1993), *Plant Breed.*, 110, 96-102.
151. Thompson D. M., Chalmers K., Waugh R., Forster B. P., Thomas W. T. B., Caligari P. D. S., Powell W., (1991), *Theor. Appl. Genet.*, 81, 487-492.
152. Huen M., Kennedy A. E., Anderson J. A., Lapitan N. L. V., Sorrels M. E., Tanksley S. D., (1991), *Genome*, 34, 437-447.
153. Zivy M., Devaux P., Blaisonneau J., Jean R., Thiellement H., (1992), *Theor. Appl. Genet.*, 83, 919-924.
154. Guiderdoni E., (1991), *Theor. Appl. Genet.*, 81, 406-412.
155. Burk L. G., Gerstel D. U., Wernsman E. A., (1979), *Science*, 206, 585-589.
156. Laurie D. A., (1989), *Plant Breed.*, 103, 133-140.
157. Bullock W. P., Beanziger P. S., Schaeffer G. W., Bottino P. J., (1982), *Theor. Appl. Genet.*, 62, 155-159.
158. Powell W., Borrino E. M., Allison M. J., Griffith D. W., Asher J. C., Dunwell M. D., (1986), *Theor. Appl. Genet.*, 72, 619-626.
159. Picard E., Rode A., Benslimane A., Parisi L., (1986), in: *Somaclonal variations and crop improvement*, Ed. Semal J., (Sept 3-6), 1985, Martinus Nijhoff, 136-147.
160. Marburger J. E., Jauhar P. P., (1989), *Plant Breed.*, 103, 73-80.
161. Witherspoon W. D., Wernsman E. A., Gooding G. V., Rufty R. C., (1991), *Theor. Appl. Genet.*, 81, 1-5.
162. Schon C., Sanchez T., Blake T., Hayes P. M., (1990), *Hereditas*, 13, 69-72.
163. Powell W., Asher M. J. C., Wood W., Hayter A. M., (1984), *Z. Pflanzenzuchtg.*, 93, 43-48.
164. Powell W., Ellis R. P., Macauley M., McNichol J., Forester B. P., (1990), *Heredity*, 65, 115-122.
165. Doll H., Haahr V., Sogaard B., (1989), *Euphytica*, 42, 209-213.
166. Kjaer B., Jensen H. P., Jensen J., Jorgensen J. H., (1990), *Euphytica*, 46, 185-193.
167. Choo T. M., Reinbergs E., Park S. J., (1982), *Theor. Appl. Genet.*, 61, 215-218.
168. Park S. J., Walsh E. J., Reinbergs E., Song L. P. S., Kasha K. J., (1976), *Can. J. Plant Sci.*, 56, 467-474.
169. Song L. P. S., Park S. J., Reinbergs E., Choo T. M., Kasha K. J., (1978), *Z. Pflanzenzuchtg.*, 81, 271-280.
170. Guo G., Maiwald F., Lorenzen P., Steinbiss H.-H., (1998), *Cer. Res. Comm.*, 26(1), 15-23.
171. Mentewab A., Letellier V., Marque C., Sarrafi A., (1999), *Cer. Res. Comm.*, 27(1-2), 17-24.