



Ocena zmienności somaklonalnej liliowców rozmnożonych *in vitro* na podstawie obserwacji fenotypowych oraz przy użyciu RAPD i ISSR

Małgorzata Podwyszyńska¹, Eleonora Gabryszewska¹,
Małgorzata Korbin¹, Artur Jasiński²

¹Institut Sadownictwa i Kwiaciarstwa im. Szczepana Pieniązka,
Skierniewice

²Gospodarstwo Ogrodnicze, Piastów

Somaclonal variation in micropropagated *Hermerocallis* sp. plants determined by phenotype and molecular markers, RAPD and ISSR

Summary

The genetic fidelity of the micropropagated daylily plants was evaluated by a phenotypic observation and with the molecular markers, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR) techniques. The plants of nine daylily cultivars propagated *in vitro* for the period of one to five years and grown outdoors in the years 2002 to 2007 were used in the study. The somaclonal variants occurred within the micropropagated plants of the five genotypes. The somaclones differed from the true-to-type plants in terms of colour and shape of the flowers. Depending on the genotype, the frequency of somaclonal variation (SV) ranged from 1.4% to 100%. The RAPD and ISSR analyses of the selected somaclones confirmed the polymorphism between true-to-type plants and somaclones on the level of DNA.

Key words:

daylily plants, molecular markers, ISSR technique, micropropagation.

Adres do korespondencji

Małgorzata Podwyszyńska,
Instytut Sadownictwa
i Kwiaciarstwa
im. Szczepana Pieniązka,
ul. Pomologiczna 18,
96-100 Skierniewice.

biotechnologia

2 (89) 114–124 2010

1. Wstęp

Metodę rozmnażania liliowca *in vitro* opracowano dla potrzeb hodowli twórczej i zachowawczej (1,2). Jednak, by wprowadzić nową technologię do praktyki ogrodniczej konieczna była jej weryfikacja pod względem jakości wyprodukowanych *in vitro* roś-

lin. Powszechnie wiadomo, że mikrorozmnażaniu może towarzyszyć zjawisko zmienności somaklonalnej, w wyniku którego pojawiają się rośliny o odmiennym fenotypie w stosunku do odmiany macierzystej (3-5). Stopień zmienności zależy od trzech zasadniczych czynników: systemu regeneracji, warunków kultury *in vitro* oraz genotypu. Przyczyną zmienności są najczęściej mutacje genetyczne, ale zdarzają się też zmiany przejściowe – epigenetyczne, niedziedziczne. Pierwszym krokiem, zmierzającym do weryfikacji nowo opracowanej metody pod względem stabilności genetycznej uzyskanych w jej procesie roślin, jest ocena zgodności fenotypowej z odmianą macierzystą w fazie kwitnienia, za pomocą markerów morfologicznych. Należy zaznaczyć, że zmiany genetyczne są szczególnie niebezpieczne, gdy pojawiają się we wczesnych fazach mikrorozmnażania. Może to spowodować rozmnożenie dużej liczby zmienionych roślin i narazić producentów na trudne do oszacowania straty. Dlatego przedmiotem wielu badań jest poszukiwanie metod wczesnego wykrywania mutacji w rozmnażanym *in vitro* materiale roślinnym. W ostatniej dekadzie, w licznych pracach udokumentowano przydatność markerów molekularnych do oceny stabilności genetycznej mikrorozmnażanych roślin (6,7). Metody te są oparte na amplifikacji DNA w cyklicznej reakcji polimerazy (PCR). Pośród opisanych metod, najczęściej dotyczyło markerów losowo amplifikowanego polimorficznego DNA (RAPD), polimorfizmu odcinków DNA występujących pomiędzy mikrosaltelitami (ISSR) i polimorfizmu długości amplifikowanego fragmentu (AFLP). W licznych badaniach wykazano, że technika RAPD nie jest wystarczająco czuła by wykryć minimalne zmiany DNA, będące często przyczyną zmienności. Postuluje się zatem, by do wykrywania zmienności somaklonalnej używać więcej niż jednej techniki molekularnej (6-8). Umożliwia to identyfikacje zmian różnego typu, w różnych regionach DNA. W związku z tym, w prezentowanej pracy wykorzystano dwa typy markerów, RAPD oraz ISSR.

Liliowiec jest uważany za roślinę bardzo stabilną w kulturach tkankowych i podczas mnożenia rzadko dochodzi do powstania trwałych zmian fenotypowych (9-11). Bardziej podatne na zmiany są poliploidy. Należy zaznaczyć, że obecnie wśród odmian liliowców zasadniczą pozycję zajmują poliploidy, głównie tetraploidy (12). W Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, posługując się wcześniej opracowaną metodą, rozmnażano kilkadziesiąt genotypów (głównie tetraploidy). Spośród kilku tysięcy roślin rozmnożonych *in vitro* wyselekcjonowano w latach 2005-2007 r. wiele somaklonów, które różniły się od roślin matecznych kształtem lub kolorem kwiatów czy morfologią liści lub korzeni. Konieczne stało się wyjaśnienie, czy obserwowane zmiany są trwałe czy przejściowe.

2. Materiał i metodyka badań

2.1. Materiał roślinny

Do badań użyto tetraploidalnych odmian liliowca rozmnażanych *in vitro* przez 1-5 lat i posadzonych do gruntu w latach: 2002, 2004, 2005 i 2006. Liliowce rozmnożono *in vitro* według wcześniej opracowanej metody (1,2). Pochodziły one z kultur pędów przybyszowych zainicjowanych z fragmentów pędów i pąków kwiatowych inkubowanych na pożywce zawierającej łącznie po 2 mg l⁻¹ BAP, kinetyny i 2iP oraz 0,03 mg l⁻¹ TDZ i 40 g l⁻¹ sacharozy. Pożywkę taką stosowano także do cyklicznego namnażania pędów, które po ukorzeniu *in vitro* w obecności 1 mg l⁻¹ IBA aklimatyzowano, a następnie uprawiano w szklarni przez 6 miesięcy i sadzono w gruncie.

2.2. Obserwacje fenotypowe

Rośliny oceniano w fazie kwitnienia, na przełomie czerwca i lipca 2006 i 2007 r. Analiza obejmowała około 1600 roślin i dotyczyła liczby i jakości roślin kwitnących. Barwę, wielkość i kształt kwiatów odnoszono do opisów odmian wg American Hemerocallis Society (AHS) (13). Ocenie fenotypowej poddano 9 odmian, których nazwy podano w tabeli 1.

Tabela 1

Zmienność somaklonalna roślin liliowca pochodzących z mikrorozmnażania, oceniana podczas kwitnienia latem w 2006 i 2007 r.

Odmiana	Czas rozmnażania <i>in vitro</i> (lata)	Rok sadzenia	Liczba obserwowanych roślin	Procent roślin kwitnących (%)		Zmienność (%)		Fenotyp somaklonów
				2006	2007	2006	2007	
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Moonlit Masquerade	3	W. 2004	25	84,0	–	4,0	–	węższe płatki, mniejsze brązowe oko
	4	J. 2005	20	30,0	72,7	16,7	62,5	
White Dragon	4	W. 2005	104	53,0	100,0	1,0	1,4	1 roślina o kwiatach 8-płatkowych
	5	J. 2005	156	42,0	89,1	0,1	0,1	
	6	W. 2006	20	0,0	33,0	0,0	0,0	
Ruby Moon	2	W. 2004	65	69,2	100,0	100,0	25,0	jaśniejszy kolor oka
Circles Stripes	3,5	J. 2004	169	46,7	100,0	0,0	0,0	–
Amethyst Jewel	3,5	W. 2004	59	62,5	83,0	100,0	0,0	barwa wyblakła, szarawa barwa typowa u wszystkich roślin

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pink Debutante	4	W. 2004	46	19,6	69,7	11,1	26,1	1 roślina ze staśmionym płatkem 6 roślin z mniej lub bardziej zdeformowanym dodatkowym płatkem
	6	W. 2006	71	0,0	5,0	–	0,0	
Ultraviolet Mood	2	W. 2004	20	89,7	–	100,0	–	u wszystkich roślin w kwiatostanie jednocześnie kwiaty prawidłowe i zdeformowane: silnie zdeformowane: kwiaty miały 4 płatki, część kwiatów z niewielkimi deformacjami (tzw. „sowie uszy”)
Broadway Gal	2	W. 2005	383	2,3,0	60,6	0,0	0,0	–
Little Red Dragon	1	W.2 006	36	0,0	86,0	–	9,7	3 rośliny o kwiatach jaśniejszej – kremowej barwy

2.3. Analiza genomowego DNA

W celu potwierdzenia genetycznego charakteru obserwowanej zmienności przeprowadzono analizę genomowego DNA wybranych somaklonów stosując techniki losowo amplifikowanego polimorficznego DNA (RAPD) oraz polimorfizmu sekwencji międzysatelitarnych (ISSR). Analizowano rośliny jedenastu odmian, których nazwy podano w tabeli 2. Pierwszy etap analizy DNA przeprowadzono z udziałem roślin wymienionych odmian, rozmnażanych tradycyjnie, użytych jako wzorce. Do analizy użyto 28 starterów RAPD z czterech zestawów A, B, G i Q (Operon Technologies Inc., USA) i cztery ISSR (University of British Columbia, Canada). Do drugiego etapu badań wytypowano trzy startery RAPD i trzy ISSR, generujące największą liczbę polimorficznych fragmentów DNA. W tej części badań analizowano rośliny rozmnożone tradycyjnie oraz rozmnożone *in vitro* – o typowych dla danej odmiany cechach fenotypowych i somaklony wyselekcjonowane podczas obserwacji prowadzonych w latach 2005 i 2006 (tab. 2).

Tabela 2

Rośliny liliowców wyselekcjonowane w 2005 i 2006 r. i użyte do badań nad wykrywaniem zmienności przy użyciu markerów molekularnych RAPD i ISSR

Genotyp, metoda rozmnażania	Kariotyp	Oznaczenie próby DNA	Charakterystyka
1	2	3	4
Beyond New Millenium wzorzec somaklon 1 somaklon 2	4x	1	kwiat pojedynczy, jasnopomarańczowy
		2	kwiat silnie zdeformowany
		3	kwiat nieznacznie zdeformowany
White Dragon wzorzec typowa 1 typowa 2	4x	4	kwiat 6-płatkowy
		5	kwiaty 8- i 6-płatkowe na tej samej roślinie
		6	jw.

1	2	3	4
Ed Brown	4x		
wzorzec		7	kwiat złotłososiowy, brzegi płatków karbowane
somaklon 1		8	kwiat zdeformowany –1 płatek dłuższy
Classic Edge	4x		
wzorzec		9	kwiat różowy
typowa		10	roślina juwenilna „wysoka”
somaklon 1		11	roślina juwenilna „niska”
Stella d’Oro	2x		
wzorzec-diploid	2x	12	kwiaty żółte
typowa	2x	13	rozmnażany <i>in vitro</i> 2 lata, uprawiany 8 lat
<i>z in vitro</i>	4x	14	nadal rozmnażany <i>in vitro</i>
wzorzec-tetraploid		15	tetraploid (kolchiczna)
H. fulva ‘Kwanzo’, chimera	3x		
wzorzec 1		16	chimera peryklinalna typu <i>variegata</i> , cały liść
wzorzec 2		17	zielona część liścia
wzorzec 3		18	biała część liścia
<i>z in vitro</i>		19	roślina biała
<i>z in vitro</i>		20	roślina zielona
<i>z In vitro</i>		21	roślina o liściach białozielonych
<i>z In vitro</i>		22	roślina o liściach białozielonych
Amethyst Jewel	4x		
wzorzec		23	kwiat jasnoametystowy
somaklon 1		24	kwiat jasnoszarometystowy
Night Embers	4x		
wzorzec		25	kwiat purpurowy pełny
typowa		26	kwiat purpurowy pełny
somaklon 1		27	kwiat purpurowy pojedynczy
somaklon 2		28	kwiat purpurowy pojedynczy
Aliens Eye	4x		
wzorzec		29	kwiat pomarańczowy z fioletowym dnem
somaklon 1		30	jasne paski na liściach
White Perfection	4x		
wzorzec		31	normalne korzenie
somaklon 1		32	grube korzenie
Black Ambrosia	4x		
wzorzec		33	normalne korzenie
somaklon 1		34	bulwki na wierzchołkach korzeni

Izolację DNA przeprowadzono według zmodyfikowanej metody Doyle i Doyle (14). Wszystkie reakcje amplifikacji przeprowadzono w cienkościennych probówkach 0,2 ml w termocyklerze PTC-200 (MJ Research). Amplifikacje przeprowadzono w objętości 13 μ l. Mieszanina reakcyjna RAPD zawierała: 10 ng matrycy DNA, 0,3 U Taq polimerazy (Invitrogen), 1,25 mM dNTP, 10 x bufor PCR z 2,5 mM MgCl₂ i 0,5 μ M startera; warunki termiczne reakcji: 94°C/120 s; 45 cykli 95°C/15 s, 36°C/30 s, 72°C/90 s oraz 72°C/5 min. Skład mieszaniny reakcyjnej ISSR był nastę-

pujący: 10 ng matrycy DNA, 0,325 U Taq polimerazy, 1 mM dNTP, 10 x bufor PCR z 2,5 mM MgCl₂ i 0,35 μM startera; warunki termiczne reakcji: 94°C/120 s, 43: cykle 94°C/30 s, 55°C/30 s, 72°C/90 s oraz 72°C/2 min.

Produkty reakcji RAPD i ISSR rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym, barwiono w roztworze bromku etydyny i wizualizowano w świetle UV.

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Ocena fenotypu

Pojedyncze rośliny z każdej odmiany liliowców rozmnożonych *in vitro* zakwitły już w pierwszym sezonie uprawowym (tab. 1). W drugim sezonie najwięcej roślin kwitnących (84%) stwierdzono u 'Moonlit Masquerade', a najmniej (19,6%) u 'Pink Debutante'. W trzecim sezonie zakwitło w ponad 70% roślin wszystkich odmian. Prawie wszystkie odmiany w pierwszym i drugim roku uprawy, wytwarzały po jednym pędzie kwiatostanowym. W kolejnym sezonie część roślin wytwarzała już po 2-3 kwiatostany. Długość pędów kwiatowych już w pierwszym roku kwitnienia była zbliżona do długości podawanej w opisie odmian wg AHS (13).

W następstwie rozmnażania *in vitro* nie zaobserwowano zmian morfologicznych u 'Circles Stripes' i 'Broadway Gal' (tab. 1). U 'White Dragon' wśród ponad 250 roślin znaleziono tylko 1 roślinę, której kwiaty były 8-płatkowe (tab. 1, rys. 1). Pojedyncze rośliny o podobnych przekształceniach pojawiają się także podczas tradycyjnego rozmnażania. U pozostałych odmian pojawiły się somaklony o zdeformowanych kwiatach lub zmienionej barwie płatków, a zmienność wynosiła od 1,4 do 100% (tab. 1, rys. 1). W 2006 r. jedna z roślin odmiany 'Moonlit Masquerade' wytwarzała zmienione kwiaty o wąskich tzw. łyżeczkowatych płatkach i miała mniejszą plamę brązowego oka (rys. 1). W następnym roku cecha ta ujawniła się u 62,6% obserwowanych roślin. Podobnie u 'Pink Debutante', w pierwszym roku kwitnienia znaleziono tylko jedną roślinę o zdeformowanym kwiecie, w drugim roku takich roślin było już 11,1%. Natomiast u odmiany 'Ruby Moon', o ile w 2006 r. o u wszystkich roślin obserwowano zmianę wybarwienia oka z intensywnie rubinowego na jaśniejsze i rozmyte, to w 2007 r. zmiana ta dotyczyła już tylko 25% roślin. Prawdopodobnie zmienność jaka wystąpiła u tej odmiany ma charakter przejściowy – epigenetyczny. Taka zmienność wywoływana warunkami kultury *in vitro*, pojawia się na skutek represji lub ekspresji pewnych genów. Wiąże się ze stopniem ich metylacji pod wpływem cytokininy i auksyny (15). Najbardziej znanym przypadkiem zmienności epigenetycznej spowodowanej demetylacją DNA sięgającą nawet 20% jest deformacja kwiatów palmy olejowej (16). Zmienność obserwowana początkowo u 50% roślin, w ciągu 9 lat uprawy w polu stopniowo całkowicie ustąpiła. Z kolei u odmiany 'Amethyst Jewel' obserwacje prowadzone w latach: 2004, 2005 i 2006 wykazały



Rys. 1. Zmienność somaklonalna wśród mikrozmnożonych roślin liliowca: a-b) 'Beyond New Millennium' (roślina typowa i zmieniona); c-d) 'Ed Brown' (roślina typowa i zmieniona); e-f) 'Night Embers' (roślina typowa i zmieniona); g-h) 'White Dragon' (roślina typowa i zmieniona); i-j) 'Moonlit Masquerade' (roślina typowa i zmieniona); k-l) 'Ultraviolet Mood' (roślina typowa i zmieniona); m) 'Classic Edge' (roślina typowa – wysoka i zmieniona – niska); n) 'White Perfection' (roślina zmieniona o grubych korzeniach); o) 'Black Ambrosia' (roślina zmieniona z bulwkami na zakończeniach korzeni).

zmianę barwy kwiatów. Zamiast jasnoametystowej z seledynową gardzielią, typowej dla tej odmiany, kwiaty miały barwę jasnoróżowoszarą z żółtym środkiem. Jednak w 2007 r. u wszystkich roślin tej odmiany obserwowano już barwę zbliżoną do typowej. Należy przypuszczać, że zmiana ta mogła być wywołana wysoką temperaturą, jaka panowała w sezonach 2004-2006 w okresie kwitnienia liliowców. Bardzo wyso-

kim temperaturom w ciągu dnia towarzyszyły wtedy ciepłe noce, co prawdopodobnie wpłynęło na wybarwienie kwiatów. Największe deformacje kwiatów i zmianę ich barwy stwierdzono u odmiany 'Ultraviolet Mood', u której 100% roślin wykazywało zmiany. Prawie wszystkie kwiaty tej odmiany były koloru brudnofioletowego z żółtym środkiem, a nie ciemnofioletowego z białym środkiem, jak u roślin typowych. Deformacje dotyczyły płatków (płatki łyżeczkowate lub podwójnie łyżeczkowate, o brzegach pofałdowanych, tzw. uszy sowy). Deformacje obejmowały pojedyncze płatki lub cały kwiat.

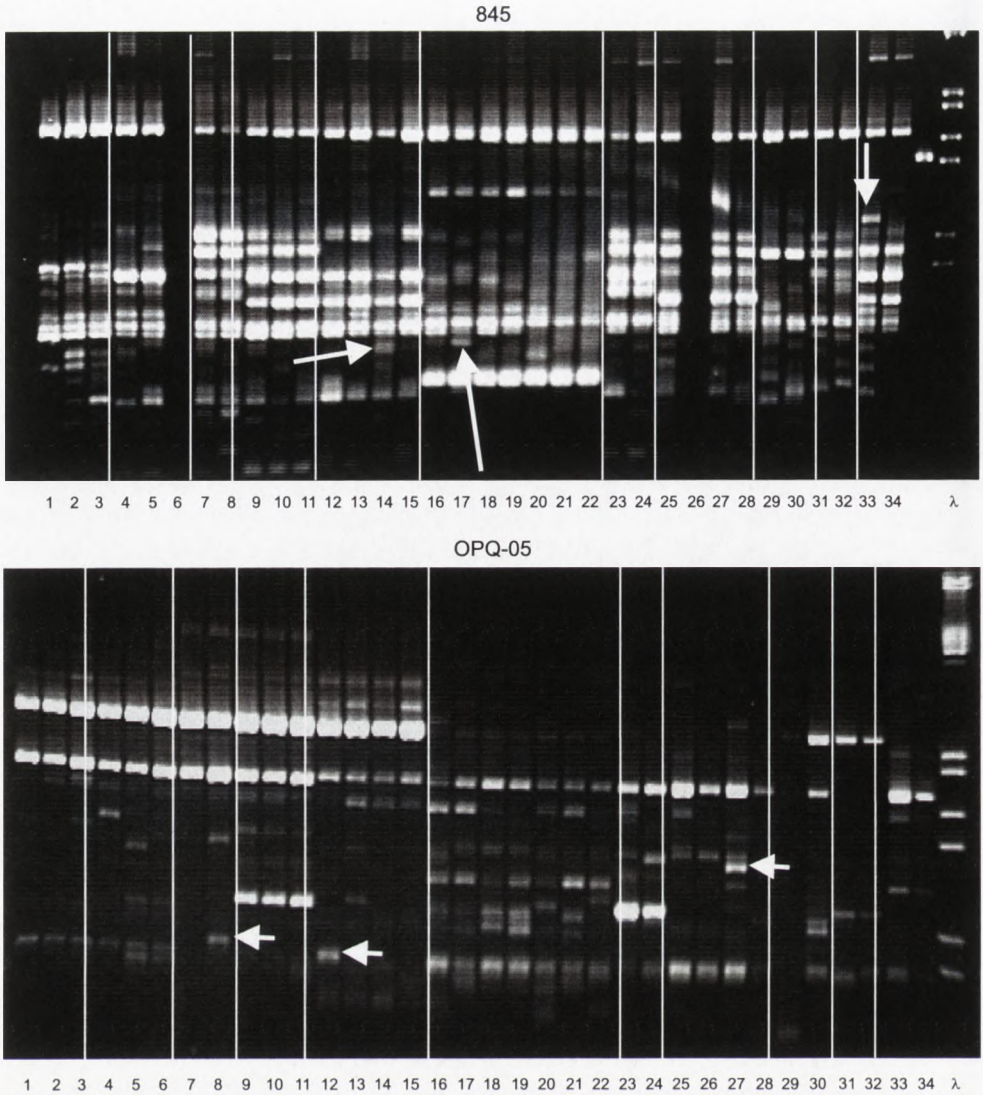
Na podstawie uzyskanych wyników wskazuje się, że wiarygodnej oceny zmienności liliowca można dokonać dopiero w 2. lub 3. roku uprawy, gdy zakwitnie ponad 70% roślin. Przy ocenie zmienności należy uwzględnić warunki klimatyczne danego sezonu, np. temperatury, opadów i nasłonecznienia, które mogą oddziaływać na wybarwienie się kwiatów czy długość lodygi.

W literaturze jest wiele doniesień na temat zmienności występującej wśród roślin rozmnożonych *in vitro*. U rabarbaru znaleziono somaklony nadmiernie się rozkrzewiające (17), a u tulipana stwierdzono zmiany koloru i kształtu kwiatów oraz liczne deformacje organów kwiatowych i liści (18). Częstotliwość występowania zmienności somaklonalnej zależy od wielu czynników – czasu rozmnażania, systemu regeneracji, używanych regulatorów wzrostu oraz genotypu (3-5). Zmienione rośliny pojawiają się znacznie częściej w kulturach protoplastów, komórek oraz zarodków i pędów przybyszowych niż w kulturach pędów kątowych (3-5,19). Przyczyn stosunkowo wysokiej zmienności obserwowanej wśród części odmian liliowca można zatem upatrywać przede wszystkim w systemie regeneracyjnym i genotypie. Zastosowana tu metoda rozmnażania *in vitro* polegała bowiem na cyklicznej regeneracji pędów przybyszowych, których rozwój był indukowany przez kombinację czterech cytokinin w tym tidiazuronu o najsilniejszej aktywności. Ponadto znakomitą większość badanych odmian stanowiły tetraploidy, uważane za mniej stabilne genetycznie od diploidów.

3.2. Analiza zmienności przy użyciu markerów DNA

W pierwszym etapie badań, mającym na celu różnicowanie badanych jedenaście odmian, spośród przetestowanych starterów produkty polimorficzne na matrycy genomowego DNA analizowanych roślin uzyskano w reakcji z czternastoma starterami RAPD (seria OPA: 4, 5, 12, 18, 19; seria OPB: 4, 10, 11; seria OPG: 5, 6, 18; seria OPQ: 1, 5, 6) i wszystkimi testowanymi starterami ISSR (844, 845, 857, 881). Łącznie w reakcjach PCR otrzymano 1090 fragmentów DNA. Produktów polimorficznych nie uzyskano w reakcjach z następującymi starterami – seria OPA: 7, 8, 9, 11, 16, 17; OPB: 9; OPG: 8, 15 i OPQ: 3, 7, 11, 14, 17.

Wyniki tej części badań pozwoliły na wytypowanie trzech starterów RAPD (OPQ-01, OPQ-05 i OPG-18) i trzech starterów ISSR (844, 845 i 857), które w reak-



Rys. 2. Elektroforegram produktów uzyskanych w łańcuchowej reakcji polimerazy z wybranymi starterami: ISSR – 845 i RAPD – OPQ-05, dla roślin 11 odmian liliowa – roślin wzorcowych oraz roślin rozmnożonych *in vitro* typowych i somaklonów (opis prób DNA w tab. 2): 1-3 'Beyond New Millenium', 4-6 'White Dragon', 7-8 'Ed Brown', 9-11 'Classic Edge', 12-15 'Stella d'Oro', 16-22 *H. fulva* 'Kwanzo' – chimera typu *variegata*, 23-24 'Amethyst Jewel', 25-28 'Night Embers', 29-30 'Aliens Eye', 31-32 'White Perfection', 33-34 'Black Ambrosia'. Strzałkami zaznaczono fragmenty DNA różnicujące rośliny z *in vitro* i rośliny wzorcowe poszczególnych odmian.

cjach generowały najwięcej produktów polimorficznych. Startery te posłużyły do porównań między roślinami wzorcowymi analizowanych odmian i roślinami somaklonalnymi. W reakcjach tych otrzymano łącznie 1230 produktów amplifikacji. Nie obserwowano fragmentów odróżniających roślinę wzorcową 'White Perfection' i jej somaklon o zmienionych grubych korzeniach. U wszystkich pozostałych odmian w reakcjach ze wszystkimi starterami zidentyfikowano fragmenty DNA odróżniające somaklony od rośliny wzorcowej tej samej odmiany (rys. 2). Fragmenty różnicujące znaleziono dla somaklonów o następujących fenotypach: o kwiatach 8-płatkowych u 'White Dragon' (kwiaty typowych roślin są 6-płatkowe); kwiatach zdeformowanych u 'Ed Brown'; zmienionym kolorze kwiatów z jasnoametystowego na jasnoszarometystowy u 'Amethyst Jewel'; kwiatach pojedynczych zamiast pełnych u 'Night Embers'; liściach z jasnymi smugami u 'Aliens Eye', innej morfologii korzeni u 'Black Ambrosia', wyraźnie niższych somaklonach od roślin macierzystych u 'Classic Edge'. U odmiany *Hemerocallis fulva* 'Kwanzo' (chimera typu *variegata* o liściach białozielonych) wykryto polimorfizm DNA dla fenotypu białego (bezechlorofilowego) i zielonego.

Na podstawie uzyskanych wyników potwierdzono istnienie zmian na poziomie DNA w roślinach somaklonalnych i mogą one świadczyć o tym, że zmienność obserwowana na poziomie fenotypu miała prawdopodobnie charakter mutacji. Wykazano również, że możliwe jest wykorzystanie markerów molekularnych ISSR i RAPD do wykrywania zmienności somaklonalnej liliowca. Przydatność tych technik do wymienionych celów potwierdzono w licznych pracach (8,20-23). W przypadku liliowca markery molekularne były dotychczas używane jedynie do identyfikacji i oceny pokrewieństwa odmian (24).

Przeprowadzona ocena zmienności somaklonalnej wykonana na poziomie fenotypu oraz DNA wskazuje, że nowa metoda mikrorozmnażania liliowca jest obarczona ryzykiem mutacji. W badaniach tych wykazano, że częstotliwość występowania zmienności zależy od genotypu. Część genotypów okazała się wysoce niestabilna genetycznie, jednak monitorując namnażane klony przy użyciu technik markerów molekularnych można obniżyć ryzyko produkcji zmutowanych roślin.

Badania dofinansowane przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji, projekt nr PBZ-MIN-007/P04/2003.

Literatura

1. Lemańska U., Gabryszewska E., Jasiński A., (2001), Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 473, 127-134.
2. Gabryszewska E., Wojtania A., (2006), Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 504, 575-583.
3. Borkowska B., (1995), Wiadomości Botaniczne, 39, 53-57.
4. Karp A., (1995), Euphytica, 85, 295-302.
5. Stefaniak B., (2004), *Komórki in vitro*, w: *Komórki roślinne w warunkach stresu*, red. A. Woźny, K. Przybył, II, Wyd. Nauk. UAM, Poznań, 114-116.
6. Bednarek P. T., Chwedorzewska K., (2001), Biotechnologia, 1(52), 9-34.
7. Aravanopoulos F. A., (2003), Acta Hort., 616, 25-47.
8. Devarumath R. M., Nandy S., Rani V., Marimuthu S., Muraleedharan N., Raina S. N., (2002), Plant Cell Rep., 21, 166-173.

9. Chen C. H., Holden D. J., (1972), *Proc. S. D. Acad. Sci.*, 51, 146-149.
10. Krikorian A. D., Staicu S. A., Kann R. P., (1981), *Ann. Bot.*, 47, 121-131.
11. Griesbach R. J., (1989), *HortScience*, 24, 1027-1028.
12. Gatlin F. L., Brennan J. R., (2002), *The New Daylily Handbook for 2002*, American Hemerocallis Society Inc, USA, 251-264.
13. Anonim, (2009), [WWW.daylilies.org /DaylilyDB/](http://WWW.daylilies.org/DaylilyDB/).
14. Doyle J. F., Doyle J. L., (1990), *Focus*, 12, 13-15.
15. Jain M. S., (2001), *Euphytica*, 118, 153-166.
16. Rival A., Jagilot E., Beule T., Verdeil J.-L., Tregear J., (2000), *Acta Hort.*, 530, 447-454.
17. Zhao Y., Grout B. W. W., Crisp P., (2005), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 82, 357-361.
18. Podwyszyńska M., (2005), *J. Fruit Ornament. Plant Res.*, 13, 109-122.
19. Płader W., Maleszy S., Burza W., Rusinowski Z., (1998), *Euphytica*, 103, 9-15.
20. Al-Zahim, M. A., Ford-Lloyd, B. V., Newbury H. J., (1999), *Plant Cell Rep.*, 18, 473-477.
21. Saker M. M., Adawy S. S., Mohamed A. A., El-Itriby H. A., (2006), *Biol. Plant*, 50, 2004-2006.
22. Podwyszyńska M., Niedoba K., Korbin M., Marasek A., (2006), *Acta Hort.*, 714, 211-219.
23. Lakshmanan V., Venkataramareddy S. R., Neelwarne B., (2007), *Electronic J. Biotech.*, 10, 1007-1013.
24. Tomkins J. P., Wood T. C., Barnes L. S., Westman A., (2001), *Theor. Appl. Genet.*, 102, 489-496.