

MACIEJ ZENKTELER

*Instytut Biologii Uniwersytetu A. Mickiewicza, Poznań*

## HODOWLA *IN VITRO* PYLNIKÓW NOWĄ METODĄ UZYSKIWANIA ROŚLIN HAPLOIDALNYCH

Prace doświadczalne dotyczące hodowli *in vitro* ziaren pyłkowych i pylników znane są już od dość dawna (8, 22, 23, 24, 25). Początkowo zajmowano się badaniem zdolności regeneracyjnych pyłków niektórych roślin nagonasiennych. Jak dotąd nie znaleziono jeszcze metody, która pozwalałaby na uzyskiwanie z gametofitu męskiego rośliny nagonasiennej haploidalnego zarodka. W sztucznych kulturach hodowano także pylniki niektórych roślin okrytonasiennych, głównie z grupy jednoliściennych, i za cel badań stawiano prześledzenie procesu mikrosporogenezy w całkowicie kontrolowanych warunkach hodowli. Wyszczepiano pylniki w różnych stadiach rozwojowych, począwszy od komórek macierzystych przed mejozą, a skończywszy na stadium tetrad. Na podstawie tych doświadczeń uzyskano informacje, w jakich stadiach rozwojowych należy wyszczepiać pylniki i w jakich hodować je warunkach, ażeby proces mikrosporogenezy mógł przebiegać normalnie do końca. Ostatnio także próbuje się hodować wyciśnięte z pylników komórki macierzyste pyłków, a więc uwalnia się je od wpływu komórek somatycznych pylnika, przede wszystkim tapetum — tkanki niezbędnej dla wykształcenia się funkcjonalnego gametofitu męskiego. Jeśli prace tego rodzaju powiodą się, wtedy będzie można bezpośrednio oddziaływać na proces mikrosporogenezy poprzez kontrolowane warunki hodowli.

Wymienione powyżej zagadnienia dotyczą problemów związanych z rozwojem gametofitu męskiego w warunkach hodowli *in vitro*. Zagadnienia te mają raczej, charakter poznawczy i pozbawione są, jak na razie, wartości praktycznej.

Zmarły przed kilku laty, zasłużony botanik indyjski, profesor Maheshwari był gorącym propagatorem nowoczesnej doświadczalnej embriologii roślin. Uważał on, że właśnie ta specjalizacja botaniki powinna oddawać jak największe usługi hodowcom roślin i stanowić jakby platformę, na której stykałyby się fizjologia, cytologia i genetyka roślin uprawnych. Nie może więc być dla nas zaskoczeniem fakt, że właśnie w pracowni prof. Maheshwari w Delhi, w latach 1964—1966 wykonano pierwsze udane doświadczenia nad uzyskaniem zarodków haploidalnych z ziaren pyłko-

wych w oparciu o metodę hodowli *in vitro* (5). Ta pionierska praca dotyczyła tylko jednego gatunku *Datura innoxia*. Wystarczyła jednak, ażeby pobudzić szereg pracowni w różnych krajach do podejmowania podobnych doświadczeń. Ostatnio zaczyna ukazywać się coraz więcej publikacji na temat hodowli pylników różnych gatunków roślin okrytonasiennych. W niektórych krajach prowadzi się obecnie na szeroką skalę prace genetyczne nad pewnymi gatunkami i odmianami tytoniu i ryżu otrzymanymi już z ziaren pyłkowych. Ponadto w różnych placówkach naukowych bada się pylniki wielu gatunków roślin uprawnych pod kątem widzenia tego samego problemu tj. indukowania gametofitu męskiego w kierunku wytworzenia haploidalnego zarodka.

Ponieważ zagadnieniami związanymi z otrzymywaniem roślin z pyłków zainteresowało się szereg instytucji rolniczych i pracowni biologicznych, Europejska Organizacja Biologii Molekularnej zorganizowała w Rzymie pod koniec listopada 1971 roku konferencję poświęconą temu kierunkowi badań. W niniejszym artykule zostaną omówione najważniejsze dotychczasowe prace dotyczące uzyskiwania roślin haploidalnych z pyłków w oparciu o metodę hodowli *in vitro*. Wiadomości poniższe będą oparte na opublikowanych już pracach, na referatach jeszcze nie opublikowanych a wygłoszonych w Rzymie, na danych uzyskanych z ustnych i listownych informacji oraz na wynikach własnych doświadczeń. Przede wszystkim zostanie omówiona strona techniczna prac z uwzględnieniem materiału doświadczalnego w tym celu, ażeby dostarczyć praktycznych informacji zainteresowanym osobom, które już zajmują się tymi zagadnieniami, względnie zamierzają je wprowadzić do programu swych badań w najbliższych latach.

### *Materiał doświadczalny*

Na razie najpełniejsze informacje na temat hodowli pylników oraz procesów biochemicznych zachodzących w pyłkach w okresie przekształcania się ich w zarodki dotyczą kilku gatunków i odmian *Nicotiana*. Materiał ten opracowuje się także od strony ultrastruktury. Dalsze informacje, choć już nie na tyle szczegółowe jak w przypadku *Nicotiana*, dotyczą: *Datura metel*, *Atropa belladonna* i kilkunastu odmian *Oryza sativa*. Ponadto istnieje szereg innych gatunków roślin, których pylniki w hodowli *in vitro* wytwarzają zarodki, pochodzą one jednak z tkanki kalusowej powstałej z ziaren pyłkowych względnie z kalusa, którego pochodzenie nie jest jeszcze dokładnie wyjaśnione. Załączona tabela obejmuje wszystkie gatunki roślin, których pylniki wytwarzają zarodki. W rubryce „uwagi” podana jest informacja odnośnie pochodzenia zarodka, tzn. czy bezpośrednio z pyłku (b), czy z kalusa (k). Dane w tabeli przedstawiają

mniej więcej stan aktualny, w związku jednak z szybko postępującym tempem prac, stan ten mógł już ulec pewnym zmianom. Ponadto, jeśli obecnie ktoś z autorów podaje, że otrzymał zarodki haploidalne tylko z tkanki kalusowej, to tym samym nie wyklucza możliwości uzyskania w przyszłości zarodków bezpośrednio z pyłków (np. poprzez zmienione warunki hodowli). Zdarza się też, że w obrębie tego samego pylnika pewne pyłki od razu wchodzą w stadium embriogenezy, inne natomiast najpierw wytwarzają kalus, z którego dopiero później powstają zarodki.

Jak wynika z załączonej tabeli, przedstawiciele rodziny *Solanaceae* stanowią najczęstszy obiekt doświadczalny. Pyłki tych właśnie gatunków najłatwiej podlegają procesowi embriogenezy i bezpośrednio przekształcają się w haploidalne zarodki. Na razie brak jest bliższych danych, które tłumaczyłyby dlaczego pyłek roślin z rodziny *Solanaceae* charakteryzuje się tak dużą potencją embriogenetyczną.

Drugą grupą najliczniej reprezentowaną są rośliny jednoliścienne, głównie przedstawiciele *Gramineae*. Pylniki tych roślin stanowią przedmiot wielu badań, mało jednak przeprowadzono udanych doświadczeń. Do wyjątków należy *Oryza sativa* reprezentowany przez kilkanaście odmian oraz w bardzo skromnym zakresie *Lolium multiflorum* i *Hordeum vulgare* (uzyskano tylko po kilka egzemplarzy siewek). Najskromniejsze wyniki otrzymano w przypadku *Lilium longiflorum* i *Asparagus officinalis*, u obu gatunków zarodki powstawały z tkanki kalusowej pylników (z tkanki kalusowej pylnika lili wyrosła tylko jedna haploidalna siewka).

Z rodziny *Cruciferae* znany jest gatunek *Brassica oleracea*, z którego pylników poprzez kalus uzyskano haploidalne zarodki i rośliny. Bliższe dane odnośnie hodowli pylników *Lycopersicon esculentum* i *Coffea* są bardzo skromne, a wyniki fragmentaryczne i niepewne. Doświadczenia nad niektórymi uprawnymi odmianami *Solanum tuberosum*, kilkoma gatunkami *Brassica* oraz *Beta vulgaris* zainicjowano w niektórych ośrodkach, jak dotychczas nie otrzymano jednak pomyślnych wyników.

### Stadia rozwojowe pylników

W dawniejszych pracach wyszczepiano pylniki w stadiach komórek macierzystych pyłków przed mejozą, w czasie podziału redukcyjnego, w stadium tetrad, mikrospor i dwukomórkowych ziaren pyłkowych. Obecnie wiadomo, że najkorzystniej jest wyszczepiać pylniki w stadium mikrospor. Nie otrzymano zarodków z pylników w których proces mejozy nie został jeszcze ukończony. Podobnie pylniki w stadium tetrad wytwarzają zarodki w niewielkiej ilości.

W wyniku podziału mikrospory powstaje ziarno pyłku złożone z komórki wegetatywnej i generatywnej. W normalnych warunkach, w ko-

Tabela

Zestaw gatunków wytwarzających haploidalne zarodki z pylników \*

Gatunek	Autor i źródło informacji	Uwagi
<i>Nicotiana sp.</i>	Nakata i Tanaka (12) Nitsch i Nitsch (17) Nitsch (18) Sunderland i Wicks (20, 21) Melchers i Labib (11) Bernard (1) Devreux i współp. (4) Wilberg (+) Harn (+)	(Dla <i>Nicotiana</i> wymienione są tylko ważniejsze pozycje literaturowe). Zarodki <sup>b, k</sup> , rośliny haploidalne, diploidalne i triploidalne
<i>Oryza sativa</i>	Niizeki i Oono (14) Niizeki (15) Nishi i Mitsuoka (16) Guha i współp. (6) Harn (+)	Zarodki <sup>b, k</sup> , rośliny haploidalne
<i>Datura innoxia</i>	Guha i Maheshwari (5)	Zarodki <sup>b</sup>
<i>Datura metel</i>	Narayanaswamy i Chandy (13)	Zarodki <sup>b</sup> , rośliny haploidalne, diploidalne i triploidalne
<i>Atropa belladonna</i>	Zenkteler (27)	Zarodki <sup>b, k</sup> , rośliny haploidalne, diploidalne, triploidalne, tetraploidalne i pentaploidalne.
<i>Lycium halimifolium</i>	Zenkteler (+)	Zarodki <sup>b</sup>
<i>Lolium multiflorum</i>	Clapham (3)	Zarodki <sup>k</sup> , kilka albinotycznych roślin haploidalnych
<i>Hordeum vulgare</i>	Clapham (3)	Zarodki <sup>k</sup> , kilka roślin haploidalnych
<i>Petunia sp.</i>	Raquin i Pelletier (+)	Zarodki <sup>b</sup>
<i>Asparagus officinalis</i>	Raquin i Pelletier (+)	Zarodki <sup>k</sup>
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Sharp (+)	Zarodki <sup>k</sup>
<i>Lilium longiflorum</i>	Sharp (+)	Zarodki <sup>k</sup> , jedna roślina haploidalna

c.d. tabeli

Gatunek	Autor i źródło informacji	Uwagi
<i>Coffea sp.</i>	Sharp (+)	Zarodki <sup>k</sup>
<i>Brassica oleracea</i>	Kameya i Hinata (9)	Zarodki <sup>k</sup> , rośliny haploidalne
<i>Solanum nigrum</i>	Harn (+)	Zarodki <sup>k</sup> , rośliny haploidalne, diploidalne i triploidalne
<i>Hyoscyamus niger</i>	Melchers (+)	Zarodki <sup>b</sup>
<i>Triticum aegilopoides</i> i <i>T. dicoccoides</i>	Fuji (informacja pochodzi z pracy Sunderland; 21)	Zarodki?

Objaśnienia: b – zarodki powstają bezpośrednio z pyłku,  
 k – zarodki powstają z kalusa,  
 (+) – informacja przekazana podczas konferencji w Rzymie 1971 r.  
 Informacja w „uwagach” na temat roślin, dotyczy tych przypadków,  
 gdy z zarodków uzyskano w pełni rozwinięte rośliny.

\* W 1972 r. tj. w okresie gdy artykuł znajdował się już w Redakcji ukazały się nowe doniesienia na temat uzyskania zarodków haploidalnych z pylników następujących roślin: *Arabidopsis thaliana*, *Setaria italica*, *Solanum verrucosum* i *Solanum dulcamare*.

mórcze wegetatywnej odbywa się intensywne synteza białka i RNA. Jądro powiększa się, pomimo że zawartość DNA się nie zmienia i pozostaje na poziomie 1C. Komórka generatywna zawiera niewiele cytoplazmy, w jądrze wczesnie odbywa się replikacja DNA i wkrótce wchodzi ono w stadium profazy, przygotowując się do drugiego podziału mitotycznego. W hodowli *in vitro* rozwój przebiega w odmienny sposób. Na ogół komórka generatywna nie dzieli się dalej, czasem dzieli się jeden lub najwyżej dwa razy i w takich przypadkach powstałe jądra zwykle degenerują. Stwierdzono, że komórka generatywna nie bierze udziału w procesie embriogenezy u *Nicotiana tabacum* Biała Burley, u *Lolium multiflorum* i *Hordeum vulgare*. Prawdopodobnie komórka generatywna pyłku *Atropa belladonna* także nie uczestniczy w rozwoju zarodka. Posiadamy jeszcze zbyt mało danych odnośnie innych gatunków, by sądzić, że komórki generatywne pyłków nigdy nie współuczestniczą w procesie embriogenezy.

Na podstawie dotychczasowych prac można stwierdzić, że zarodek powstaje tylko z komórki wegetatywnej pyłku. W tych przypadkach, kiedy wyszczepiano pylniki w stadium dwukomórkowych ziaren pyłkowych,

zarodki także powstawały z komórki wegetatywnej. W pracach na temat hodowli pylników *Brassica oleracea* i wolnych pyłków *Lycopersicon esculentum* wykazano, że haploidalna tkanka kalusowa powstała z dojrzałych pyłków, tzn. u *Brassica* z pyłków trzykomórkowych, a u *Lycopersicon* z dwukomórkowych. Z wyjątkiem pylników *Brassica*, nieznane są przypadki, które wskazywałyby, że pyłek trzykomórkowy zdolny jest do wytworzenia zarodka lub tkanki kalusowej. Na temat zdolności regeneracyjnych gamet męskich w warunkach sztucznych kultur brak jest na razie jakichkolwiek informacji.

### *Technika pracy, warunki hodowli i dobór pożywki*

Mikrospory i ziarna pyłku są bardzo czułe na działanie roztworu sterylizującego. Nie można więc sterylizować pylników, najlepiej zamknięte pąki kwiatowe, względnie, jak w przypadku traw, całe kwiatostany. Przed włożeniem pąków do roztworu sterylizującego, trzeba je umieścić w 70% etanolu 1 do 2 min. Jako antyseptyków używa się często podchlorynu wapnia lub podchlorynu sodu o stężeniu od 0,5 do 7%. Czas działania może być różny i zależy od stężenia roztworu oraz od materiału, np. pąki tytoniu sterylizuje się przez 20 min. przy stężeniu 0,6%. Skutecznym, a zarazem delikatnym środkiem sterylizującym jest także woda chlorowa. Po zlaniu roztworu sterylizującego należy pąki kilka razy przepłukać wodą sterylną. Następnie w kabinie do przeszczepień izoluje się pylniki i przenosi do pożywek. Nie jest wskazane, ażeby pąki przez dłuższy czas (4—6 godzin) były zanurzone w wodzie. Jeżeli izolacja pylników jest bardzo czasochłonna (w przypadku małych pylników izoluje się je pod binokulem), materiał do pracy należy przygotowywać w niewielkich ilościach. Na ogół izoluje się pylniki przy pomocy metalowych igiełek lub delikatnych skalpeli. Niektórzy autorzy używają wyłącznie narzędzi szklanych, ażeby zapobiec niekorzystnemu działaniu metalu na ranę powstałą w miejscu odcięcia pylnika od nitki pręcika. Miejsce cięcia często brunatnieje już po kilkunastu minutach po przeniesieniu na pożywkę, później cały pylnik ciemnieje i to jest na ogół symptomem zamierania tkanek pylnika. Po umieszczeniu pylników na pożywkę należy je nieco zanurzyć, jednak nie za głęboko, pylnik powinien trochę wystawać ponad powierzchnię pożywki. Gdy proces powstawania zarodków trwa dłużej niż 8 tygodni, korzystnie jest przenieść pylniki do świeżo przygotowanych pożywek po mniej więcej sześciu tygodniach.

Na pożywkę przenosi się zwykle całe pylniki, czasem pozostawia się odcinek nitki pręcika. W przypadku gdy nitka pręcika wytwarza kalus, lepiej jest wyszczepiać same tylko pylniki. Próby hodowli izolowanych pojedynczych pyłków lub grup pyłków nie udają się. Do wyjątków należy

doniesienie Sharpa (referat w Rzymie) dotyczące hodowli pyłków *Lycopersicon* i *Coffea*. W doświadczeniach posługiwano się „metodą niańki” (nurse technic). Polegała ona na tym, że na pylniku leżącym na pożywce umieszczano kawałek papieru filtracyjnego, na który przenoszono pojedyncze ziarna pyłków. Po kilku dniach pyłki zaczynały się dzielić i powstawały następnie grupy komórek o charakterze kalusa. W ciągu kilku tygodni hodowli autor uzyskał silnie rozwiniętą haploidalną tkankę kalusową. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w przypadku opisanego powyżej doświadczenia, uzyskano grupy tkanek kalusowych, z których każda pochodziła z jednego tylko ziarna pyłku.

Wydaje się, iż nie jest sprawą obojętną czy hodowane w sterylnych warunkach pylniki pochodzą z materiału wiosennego, tzn. z okresu kiedy na roślinie rozwijają się pierwsze pąki kwiatowe, czy z okresu jesienno, gdy wykształcają się już owoce. Uwaga ta dotyczy tych roślin, które kwit-



Fot. Haploidalna roślina *Atropa belladonna* uzyskana z ziarna pyłkowego

ną w naszym klimacie przez szereg tygodni, nie dotyczy np. zbóż, u których rozwój kwiatostanów dokonuje się stosunkowo szybko. Zdolności regeneracyjne tkanek i organów roślinnych są zwykle znacznie większe, kiedy roślina jest w pełni rozwoju, maleją w okresie przygotowywania się do spoczynku zimowego. Prawdopodobnie w ten sam sposób reagują pylniki, co stwierdzono wyraźnie w przypadku *Atropa belladonna* i *Lycium halimifolium*. Pylniki tych gatunków wyszczepiane pod koniec maja wytwarzały bardzo dużo zarodków, natomiast pod koniec sierpnia i we wrześniu nie wytwarzały ich w ogóle, lub tylko w znikomej ilości.

Na uwagę zasługuje także materiał szklarniowy. Prawdopodobnie niekorzystnie jest stosować w doświadczeniach pylniki z roślin, które normalnie wegetują w polu, ze względu jednak na długi okres zimowy są sztucznie hodowane w szklarniach. Nie ma jeszcze wystarczających dowodów, które potwierdzałyby powyższe przypuszczenie, jakkolwiek niektórzy autorzy zwracają już na to uwagę.

Na podstawie szczegółowych badań nad *Nicotiana* stwierdzono, że rozwój zarodków jest w dużym stopniu uzależniony od temperatury i światła. Najwięcej zarodków powstawało, gdy pylniki hodowano w temperaturze 25°C i w ciągu doby oświetlano przez 12 godzin światłem o sile 2500 luxów, a przez pozostałe 12 godzin pozostawiano w ciemności (21).

Dobór właściwej pożywki wydaje się odgrywać kluczową rolę w procesie inicjacji oraz rozwoju haploidalnych zarodków. Informacje, które posiadamy w tej dziedzinie są niestety wyjątkowo skąpe. Różni autorzy stosują rozmaite pożywki, często zmieniają skład i koncentrację poszczególnych związków. Nie istnieje w tej chwili uniwersalna pożywka, którą można by z powodzeniem stosować w hodowli pylników różnych gatunków roślin. Często ta sama pożywka odpowiednia dla jednego gatunku, okazuje się zupełnie bezużyteczna dla innego, mimo iż gatunek ten należy do tego samego rodzaju. Pożywki, które stosuje się dla hodowli pylników *Nicotiana* nie mogą stanowić wzoru do naśladowania. W przypadku np. *Nicotiana tabacum* „Wisconsin 38” prazarodki kuliste rozwijały się nawet w pylnikach, które wyszczepiano na pożywkę złożonej tylko z 2% sacharozy i 0,8% agaru. Co prawda w tych przypadkach prazarodki nie osiągały stadium dojrzałości, jednak po przeniesieniu pylników na bogatszą pożywkę rozwój ich dalej postępował. Pylniki *Nicotiana tabacum* hodowane w różnych pożywkach wytwarzają wyjątkowo wiele zarodków. Zdolności embriogenetyczne mikrospor i pyłków *Nicotiana* są tak duże, że dotychczas nie znaleziono jeszcze podobnego gatunku, nawet w obrębie rodziny *Solanaceae*, który wykazywałby podobne właściwości.

W oparciu o dane z literatury wynika, że najczęściej stosuje się pożywkę opracowaną przez Linsmaier i Skooga (10). Zwykle pozostawia się niezmienny skład makro- i mikroelementów, witaminy i źródło żelaza, na-



tomiast modyfikuje się, głównie zwiększa, stężenie sacharozy, kinetyny (do 4 mg/l) oraz kwasu  $\beta$ -indoliloctowego (do 2 mg/l). Dla pylników roślin jednoliściennych stosuje się także pożywkę opracowaną przez Blaydesa (2). Do pożywki tej dodaje się substancje wzrostowe, kinetynę, ekstrakt drożdżowy, hydrolizat kazeiny i mleczko kokosowe w różnych stężeniach i kombinacjach. W niektórych pracowniach stosuje się też pożywkę opracowaną przez Nitscha (17) — w publikacji tej zakradł się błąd i zamiast jak mylnie podano 0.557 g  $\text{FeSO}_4$ , powinno być 5,57 g. Pożywkę tę wzbogaca się dodając kinetynę, kwas  $\beta$ -indoliloctowy, 2,4-D, witaminy, aminokwasy, gibereliny i kwas abscysynowy w różnych stężeniach i kombinacjach. Rzadziej używa się pożywkę White'a zmodyfikowaną przez Rangaswamy (19). Stosuje się także pożywki łączone, np. makroelementy według White'a (26) + mikroelementy według Hellera (7) + witaminy i substancje wzrostowe w różnych stężeniach. Każda z wymienionych pożywek nie może być używana bezkrytycznie, dobór poszczególnych składników, głównie substancji wzrostowych i kinetyny wymaga oddzielnego opracowania, zwłaszcza gdy przystępuje się do pracy nad materiałem nowym.

#### Uwagi końcowe

Dotychczasowe doświadczenia wykazały, że w odpowiednich warunkach hodowli *in vitro* można uzyskać z gametofitu męskiego roślinę haploidalną. Istnieje więc duże prawdopodobieństwo, że przy umiejętnym zastosowaniu tej metody będzie można indukować proces przekształcania się pyłków w zarodki jakiegokolwiek rośliny. W chwili obecnej, w skali masowej, uprawia się rośliny haploidalne otrzymane z pylników niektórych przedstawicieli rodziny *Solanaceae* i rodzaju *Oryza*. Fakt ten nie wyklucza możliwości uzyskiwania haploidów na skalę produkcyjną w obrębie innych grup roślin, na co wskazują ostatnie doświadczenia nad nowymi gatunkami. Rezultaty tych prac są jeszcze skromne, jednak już bardzo zachęcają do ich kontynuowania. Trzeba podkreślić, że nie można przystępować do pracy bez należytej znajomości materiału. Pylniki nie mogą znajdować się w zbyt wczesnym lub w zbyt późnym stadium rozwojowym, albo pochodzić z rośliny o dużym stopniu męskiej sterylności. Powinno się wyszczepiać tysiące pylników, zwłaszcza gdy przystępuje się do pracy nad nie zbadanym dotąd gatunkiem.

Nie wszystkie rośliny uzyskane z pyłków są haploidalne. Większość z nich to haploidy, jednak pojawiają się też homozygotyczne diploidy, triploidy, tetraploidy i pentaploidy. W obrębie rodzaju *Nicotiana* i *Datura* uzyskiwano obok haploidów diploidy i triploidy, natomiast u *Atropa belladonna* znajdowano dodatkowo tetraploidy i pentaploidy. Na razie nie-

znane są czynniki odpowiedzialne za rozwój homozygotycznych poliploidów. Istnieją w tej sprawie pewne sugestie, należy mieć nadzieję, że zostaną one w niedługim czasie wyjaśnione. Będzie można wtedy działać na proces androgenezy i uzyskiwać rośliny o pożądanej homozygotycznej poliploidalności. Z jednego pylnika otrzymuje się w warunkach hodowli *in vitro* dziesiątki roślin homozygotycznych haploidalnych i poliploidalnych. Szanse powodzenia prac są tu duże, nakłady finansowe na urządzenia i aparaturę minimalne, najważniejsze to zainteresowanie i wytrwałość w pracy osób, które podejmą się tego rodzaju badań.

## LITERATURA

1. Bernard S.: Rev. Cytol. et Biol. veg. 34, 165—188, 1971
2. Blaydes D.F.: Physiol. Plant. 19, 748—753, 1966
3. Clapham D.: Z. Pflanzenzucht. 65, 285—292, 1971
4. Devreux M., Saccardo F., Brunori A.: Caryologia 24, 141—148, 1971
5. Guha S., Maheshwari S.C.: Nature 212, 97—98, 1966
6. Guha S., Iyer R.D., Gupta N., Swaminathan M.S.: Curr. Sci. 39, 174—176, 1970
7. Heller R.: Ann. Sci. nat. Bot. Biol. veg. 14, 1—223, 1953
8. Ito M., Stern H.: Developm. Biol. 16, 36—53, 1967
9. Kameya T., Hinata K.: Jap. J. Breed. 20, 82—87, 1970
10. Linsmaier E.M., Skoog F.: Physiol. Plantarum 18, 100—127, 1965
11. Melchers G., Labib G.: Ber. Dtsch. Bot. Ges. 83, 129—150, 1970
12. Nakata K., Tanaka M.: Japan. J. Genet. 43, 65—71, 1968
13. Narayanaswamy S., Chandry L.P.: Annals of Bot. 35, 535—542, 1971
14. Niizeki H., Oono K.: Proc. Japan. Acad. 44, 554—557, 1968
15. Niizeki H.: Japan Agric. Res. Quart. 3, 41—45, 1968
16. Nishi T., Mitsuoka S.: Jap. J. Genet. 44, 341—346, 1969
17. Nitsch P., Nitsch C.: Science 163, 85—87, 1969
18. Nitsch P.: Phytomorphology 19, 389—404, 1969
19. Rangaswamy N.S.: Phytomorphology 11, 109—127, 1961
20. Sunderland N., Wicks F.M.: J. Exp. Botany 22, 213—226, 1971
21. Sunderland N.: Sci. Prog. Oxf. 59, 527—549, 1971
22. Taylor J.H.: Amer. J. Botany 37, 137—143, 1950
23. Tulecke W.: Am. J. Botany 44, 602—608, 1957
24. Tulecke W.: Bull. Torrey Botan. Club 86, 283—289, 1959
25. Vasil I.K.: Biol. Rev. 42, 327—373, 1967
26. White P.R.: A hand-book of plant tissue culture. J. Cattrel, Lancaster, Pa. 1943
27. Zenkteler M.: Experientia 27, 1087, 1971