

PYLNIKI I PYŁEK W HODOWLI *IN VITRO*

Anthers and pollen *in vitro* culture

Renata ŚNIEŻKO

Summary. The paper is a general review on anther and pollen culture *in vitro*. It is addressed to the reader, who does not work in this field. Some aspects of application of the methods *in vitro* culture for plant breeding is pointed out.

In vitro microspores, inside the anther loculus are stimulated to development into haploid callus or embryos. The embryos could be regenerated to fully grown plants. By the androgenesis *in vitro* it is possible to obtain haploid, autodiploid and poliploid plants. These plants can be used in breeding to improve the horticultural varieties. Already some new varieties of tobacco, wheat, corn and rice are under crop, mainly in Southern Asia.

There was found that plants and their pollen tubes show similar growth rate and resistance to stresses. The test of pollen grains germinating *in vitro* in media with some stressing substances e.g. bacterial toxins or herbicides, can help to appoint the plant which is most suitable as pollinator in breeding programme.

Key words: anther, microspore, pollen, androgenesis, culture *in vitro*

Dr hab. Renata Śnieżko, Instytut Biologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20–033 Lublin

WSTĘP

Wiele doświadczeń nad hodowlą komórek i tkanek roślinnych *in vitro* ma na celu poznanie procesów wzrostu i rozwoju oraz pozyskanie materiału wyjściowego do hodowli nowych odmian roślin uprawnych. Kultury pylników i zawiesiny pyłku na pożywkach okazały się szczególnie przydatne dla potrzeb hodowli rolniczej.

W pylnikach rozwijających się na roślinie powstają sporadycznie wielokomórkowe struktury zbudowane z haploidalnych komórek, co świadczy o ich pochodzeniu z mikrospor lub ziaren pyłku. Niekiedy taka haploidalna struktura jest zarodkiem somatycznym. W warunkach *in vitro* proces taki zachodzi częściej niż w przyrodzie. Proces rozwoju mikrospory lub ziarna pyłku w tkankę i zarodek somatyczny jest nazywany przez badaczy zajmujących się kulturami

in vitro androgenezą. W embriologii roślin termin androgeniza ma szersze znaczenie i dotyczy rozwoju zarodka z genomem wprowadzonym przez plemnik.

Rozwój metodyki hodowli tkanek roślinnych *in vitro* umożliwił wyhodowanie haploidalnej rośliny z mikrospory. Pierwszy opis rozwoju mikrospory *Datura innoxia* w embriogenny kalus opublikowali Guha i Maheshwari w 1964 roku, a w roku 1966 donieśli o pełnej regeneracji haploidalnej rośliny [31]. Udowodniono w tym doświadczeniu totipotencję haploidalnej komórki – mikrospory, której genom może determinować rozwój dwukomórkowego gametofitu, jakim jest ziarno pyłku, lub sporofitu z całym złożonym systemem organów i tkanek. Częściej udaje się uzyskać początkowe stadia androgenezy niż zregenerować całą haploidalną roślinę. Jeśli jednak regeneracja się powiedzie, to haploidalna

roślina ma prawidłowo wykształcone organy i może zakwitać. Rośliny haploidalne są jednak sterility ze względu na upośledzony proces mejozy (pojedynczy garnitur chromosomowy).

Dla hodowców mają znaczenie rośliny otrzymane z haploidalnych roślin po podwojeniu ich genomu. Można to uzyskać działając kolchicyną na stożek wzrostu. Po podwojeniu genomu otrzymuje się tzw. autodiploidy, rośliny całkowicie homozygotyczne. Jako takie są one cennymi roślinami rodzicielskimi w krzyżowaniach mających na celu wyprowadzenie nowej odmiany uprawnej.

W hodowlach pylników *in vitro* oprócz haploidów można otrzymać poliploidy oraz aneuploidy o garniturze chromosomowej nie spotykanym w przyrodzie, ani nie powstające na drodze krzyżowania. Takie rośliny o odmienym genomie mogą być przydatne do wyhodowania nowych odmian.

Inne metody *in vitro*, które pomagają przyspieszyć efekty hodowli nowych odmian roślin uprawnych, polegają na selekcji genotypów w fazie haploidalnej i wybiórczym zapłodnieniu. Selekcję genotypów prowadzi się na podstawie testów żywotności i odporności pyłku kielkującego w kropli pożywki. Testy te coraz bardziej rozpowszechniają się w instytutach hodowlanych, ponieważ są szybkie, łatwe, tanie i znacznie przyspieszają uzyskanie pożądanego rezultatu po krzyżowaniu.

Najnowsze doświadczenia zmierzają do przeprowadzenia wybiórczego zapłodnienia wyizolowanych woreczków zalążkowych wybranym pyłkiem lub wyizolowanymi z niego gametami męskimi. Na razie próby te nie dały rezultatu.

ANDROGENEZA

Pobudzenie mikrospory lub ziarna pyłku do rozwoju w kalus albo bezpośrednio w zarodek somatyczny, jest obecnie najbardziej wydajną metodą pozyskiwania haploidalnych roślin. W ciągu dwudziestu kilku lat opracowano metody

pobudzania do androgenezy mikrospory i ziaren pyłku więcej niż 150 gatunków i odmian roślin [82]. Najłatwiej wywołać androgenezę w pylnikach gatunków z rodziny *Solanaceae*, ale obecnie największe znaczenie mają doświadczenia nad androgenezą u zbóż, głównie pszenicy, ryżu i kukurydzy [6, 13, 24, 28, 31, 56, 61, 84].

O powodzeniu androgenezy decyduje wiele różnych czynników, niekiedy trudnych do wytłumaczenia. Najważniejszym czynnikiem jest genotyp mikrospory lub ziarna pyłku, z którego ma się rozwinąć haploidalna roślina. Wśród dotychczas zbadanych najbardziej podatne na androgenezę okazały się mikrospory gatunków z rodzaju *Nicotiana*, *Datura*, *Hyoscyamus* i *Solanum* [63]. Nie zawsze wywołanie podziałów mikrospory, namnożenie haploidalnych komórek kalusa, a nawet powstanie zarodka somatycznego kończy się pełną regeneracją rośliny. Wydajność metody jest bardzo różna, np. można uzyskać haploidalny kalus i embrioidy w 40–80% założonych hodowli z pylnikami *Nicotiana* lub *Datura*, ale tylko w 1% hodowli pylników *Brassica napus* [62, 82]. Podobnie niską wydajność uzyskuje się w hodowlach pylników *Helleborus foetidus*, *Agropyron repens*, *Bromus inermis* [83] i *Festuca pratensis* oraz mieszańca *Festuca lolium* [55]. Wydajność androgenezy zbóż jest niska w porównaniu z gatunkami *Solanaceae*, należy jednak pamiętać, że w pylniku tytoniu powstaje około 40 tys. ziaren pyłku, podczas gdy u pszenicy tylko około 4 tys. [21]. Za sukces uważa się uzyskanie haploidalnego kalusa w kilku procentach założonych hodowli [1, 6, 21, 70, 71].

Haploidalny kalus nie zawsze jest zdolny do wytworzenia zarodków somatycznych, a te także nie zawsze rozwijają się w rośliny. Liczba zregenerowanych roślin haploidalnych jest bardzo mała przy dużym nakładzie pracy, lecz mimo to korzyści płynące z pozyskania jednej takiej rośliny o pożądanym cechach uzasadniają włożony wysiłek. Obok haploidalnych roślin mogą rozwijać się także rośliny o innym genotypie również przydatne w hodowli nowych odmian. Tak na przykład, dzięki androgenzie wy-

hodowano rośliny, które posłużyły do wyprowadzenia 6 nowych odmian tytoniu [40].

Zależnie od gatunku, a nawet odmiany, pylniki wymagają zachowania specyficznych warunków podczas różnych etapów hodowli *in vitro*. O powodzeniu androgenezy decydują takie czynniki jak: stadium rozwoju, w którym wykłada się pylnik na pożywkę, skład pożywki, czas i warunki inkubacji oraz, bardzo często, wstępne zabiegi obejmujące całą roślinę lub pylnik przed rozpoczęciem hodowli. Aby wywołać androgenezę, na pożywkę wykłada się najczęściej całe pylniki w stadium rozwojowym poprzedzającym mitozę haploidalnego jądra w mikrosporze. W nielicznych wypadkach wyszczepia się mikrospory lub ziarna pyłku w formie zawiesiny komórek. Często taka zawiesina lepiej adaptuje się do warunków *in vitro*, kiedy w pożywce jest zanurzony kawałek pylnika. Pylniki niektórych gatunków są bardzo małe w stadium odpowiednim do rozpoczęcia hodowli i trudno je wyciąć z pąka. Wtedy wyszczepia się na pożywki całe pąki kwiatowe, a niekiedy kwiatostany, np. kłosy jęczmienia [49].

Stadium pylnika, od którego należy rozpocząć hodowlę *in vitro* zależy przede wszystkim od gatunku rośliny, a więc genotypu. Najczęściej wyszczepia się pylniki w stadium tetrad mikrospor, rzadziej w stadium dwujądrowego pyłku już po mitozie. Stadium mikrospory trwa stosunkowo długo. W tym czasie mikrospory rosną, wakuolizują, budują ścianę – sporodermę, a ich jądro przechodzi przemiany poprzedzające podział mitotyczny. Stadium mikrospory obejmuje okres, w którym komórki stanowiące obiekt doświadczenia są w różnych stanach fizjologicznych. Wskaźnikiem stadium może być wielkość jądra mikrospory, np. w mikrosporach jęczmienia od momentu uwolnienia mikrospor z tetrad do mitozy jądro powiększa się sześciokrotnie [77].

Właściwa androgeneza zaczyna się po mitozie haploidalnego jądra mikrospory, czyli w dwujądrowym pyłku. Wcześniejsze wyłożenia pylnika pozwala na zaadaptowanie jego tkanek do warunków *in vitro* i dojrzewanie do stadium

dwujądrowego pyłku. Przykładowo *Hyoscyamus niger* najlepiej wyszczepiać w stadium mikrospor, zaś pylniki *Datura innoxia* w stadium dwujądrowego pyłku. W eksplantantach obu gatunków androgeneza zaczyna się w momencie, kiedy pyłek jest dwujądrowy. Pylniki *Hyoscyamus* dojrzewają na pożywce. Mikrospory rosną w nich, przechodzą mitozę i dopiero wtedy zaczyna się namnażanie haploidalnych komórek [63].

Okres dojrzewania pylników na pożywce bywa różny i nie zawsze zależy tylko od stadium w jakim rozpoczęto hodowlę. Na ogół jednak inkubacja trwa tym dłużej, im młodsze było stadium, w którym pylnik implantowano. Większość pylników roślin dwuliściennych potrzebuje od kilku do kilkunastu dni inkubacji, zaś jednoliścienne tylko 3–4 dni, zanim rozpocznie się w nich androgeneza [83].

Dla wydajności androgenezy nie bez znaczenia jest skład i konsystencja pożywki oraz sposób wyłożenia pylnika. Najlepszy efekt daje wyłożenie pylnika na stałą pożywkę tak, by stykał się z nią jedną krawędzią lub niewielką powierzchnią. Rzadziej stosuje się zanurzenie pylnika w płynnej pożywce. Im większy kontakt pylnika z pożywką, tym szybciej rozwija się kalus ze ścian i tkanek łącznika. Może on zdominować rozwój kalusa pochodzącego z mikrospory [82].

Skład pożywki jest niewątpliwie czynnikiem stymulującym podziały w mikrosporach lub ziarnach pyłku, a stymulacja zależy głównie od stężenia substancji wzrostowych i sacharozy. Wymagania co do składu i stężeń elementów pożywki zależą od genotypu pyłku i stadium hodowli. Na przykład pyłek jęczmienia wymaga 25% sacharozy do rozpoczęcia androgenezy, a pyłki innych gatunków roślin niekiedy jeszcze wyższych stężeń [45]. Niektórym gatunkom jest potrzebna pewna domieszka jakichś specjalnych substancji lub podwyższone stężenie jednego ze składników, np. jonów żelazowych dla pyłku *Solanaceae*, inozytolu lub proliny, adeniny, witaminy C itp. [8, 19, 31, 36, 72, 83].

Bardzo ważne jest stężenie i wzajemne proporcje substancji wzrostowych w pożywce wyj-

ściowej [84]. Hormony wzrostowe są nieodzownym stymulatorem podziałów komórkowych w pyłku większości roślin. Wyjątek stanowią niektóre gatunki *Solanaceae* [50]. Z reguły substancje te to cytokininy (kinetyna) i auksyna, najczęściej 2, 4-D. Niektóre gatunki pyłku wymagają dodatkowo gibereliny. Dobór stężenia zależy od wymagań genotypu pyłku. W miarę rozwoju kalusa z pyłku trzeba tak zmienić skład pożywki, by w kolejnych pasażach malało stężenie substancji wzrostowych i sacharozy. Obniżenie stężenia tych dwóch grup substancji wywołuje embriogenezę w kalusie tzn. stymuluje powstawanie zarodków somatycznych. Najczęściej regenerację roślin prowadzi się na pożywkach coraz uboższych w substancje wzrostu, a w końcowych etapach hodowli pożywki są zupełnie pozbawione tych substancji. Haploidalne rośliny niektórych gatunków można zregenerować jedynie na pożywkach zawierających węgiel aktywowany. Uważa się, że węgiel aktywowany absorbuje nadmiar substancji wzrostowych syntetyzowanych przez rozwijające się organy roślin, a także wiąże inne metabolity, które mogłyby wpływać hamująco na wzrost regeneratów [27]. Pod koniec regeneracji roślin z pyłku najlepiej stosować dwuwarstwową pożywkę. Dolna warstwa pożywki jest zestalona agarą i zawiera zawieszinę węgla aktywowanego. Górna warstwa jest płynna z węglem lub jest przesączem z nadmiaru węgla aktywowanego [75, 76].

Podczas androgenezy u niektórych gatunków węgiel aktywowany bywa potrzebny już we wczesnych stadiach hodowli, kiedy w eksplantacie są tkanki pylnika. Uważa się, że tkanki pylników tych gatunków wytwarzają metabolity hamujące rozwój haploidalnego kalusa i zarodków somatycznych z ziaren pyłku [62, 75, 76]. W wielu doświadczeniach konieczne jest wykonywanie zabiegów wstępnych – działanie na całą roślinę lub tylko na kwiatostany przed pobraniem pylników do hodowli *in vitro*. Stosuje się różnorodne stresy i szoki, by przygotować sprzyjający androgenezie stan fizjologiczny pylników. Działanie stresu lub szoku ma na celu zaburzenia lub spowolnienie rozwoju pyłku. Dla

wywołania androgenezy korzystne jest opóźnienie mitozy w pyłku pod wpływem chłodu lub innych czynników [2, 3, 15, 19]. Najczęściej stosuje się ochładzanie (temp. 3–10°C)

całej rośliny, kwiatostanów lub tylko pylników [65, 70]. Znałe jest działanie chłodu na rozwój pylników w naturze. Ochłodzenie powoduje, że procesy zachodzą wolniej, może wystąpić zaburzenie w przebiegu mejozy oraz mitozy pyłku. Żeby zwiększyć liczbę ziaren pyłku zdolnych do androgenezy, zamiast do rozwoju w męski gametofit, Heberle-Bors [18] zastosował czynnik zaburzający determinację płci. Takim feminizującym czynnikiem był niedobór azotu w odżywianiu mineralnym rośliny podczas tworzenia pąków kwiatowych. Kyo i Harada [30] zastosowali podobne głodzenie pylników dojrzewających *in vitro*. Do doświadczenia pobrali bardzo młode pylniki, które umieścili na pożywce ubogiej w jony azotowe. Zwiększyło to liczbę ziaren pyłku zdolnych do androgenezy. Podobnie może działać także niedobór innych składników mineralnych w pożywce. Zwiększenie liczby ziaren pyłku rozwijających się w kalus lub embrioidy można wywołać przez zastosowanie krótkotrwałego szoku elektrycznego we wstępnej fazie inkubacji [9].

Innym typem stresu jest obniżenie turgoru rośliny na krótko przed pobraniem pylników. W chwili pobierania pylników roślina powinna być ponownie w stanie pełnego turgoru. Można też przetrzymać roślinę w wysyczonej wilgocią atmosferze, pozbawionej tlenu lub z podwyższonym stężeniem CO₂. Pozytywny efekt można niekiedy wywołać przez działanie pola magnetycznego, albo napromieniowanie małą dawką promieni X lub gamma kwiatostanów krótko przed pobraniem pylników do hodowli. Napromieniowanie bywa czasem skuteczniejsze, kiedy zastosować je już po wyszczepieniu pylników na początku inkubacji. Próby stosowania różnych czynników wzmagających androgenezę są opisywane w licznych pracach [5, 16, 25, 26, 28, 55, 59, 65, 69]. Każdy z wymienionych stresów i szoków musi być wyważony, by

nie zmniejszyć żywotności pyłku i nie zahamować całkowicie podziału mitotycznego, od którego zaczyna się androgeneza. Zastosowanie szoków i stresów wiąże się z poglądem, że

androgeneza może nastąpić tylko wtedy, kiedy rozchwiany zostanie naturalny rozwój pyłku w gametofit męski.

Gametofitowy typ rozwoju polega na tym, że podział mitotyczny w mikrosporze jest nierównomierny. Wykształcają się dwie odmienne komórki, w których ilość cytoplazmy i stopień kondensacji jądra są wzajemnie zależne. Komórka wegetatywna ma jądro o luźno rozmieszczonej chromatynie i dużo cytoplazmy, a generatywna ma jądro o skondensowanej chromatynie i mało cytoplazmy. W naturalnych warunkach, w przyszłości komórka wegetatywna nie powinna się już dzielić tylko wyrosnąć w łagiewkę pyłkową. Jeśli zaburzony zostanie gametofitowy typ rozwoju, to zmienia się determinacja komórki wegetatywnej i generatywnej. Najczęściej nie różnicują się one jako odmienne komórki, lecz są do siebie podobne wielkością, mają zbliżoną ilość cytoplazmy i populacje organelli oraz jądra o luźno rozmieszczonej chromatynie [6]. Ważna wydaje się obecność plastydów w obu komórkach pyłku zdolnego do androgenazy. Typowo wykształcony pyłek *Hyoscyamus niger* nie ma plastydów w komórce generatywnej, natomiast w pyłku z zaburzeniami rozwoju plastidy występują w obu komórkach [51].

Pogląd o nieprawidłowo rozwiniętym pyłku jako źródle androgenicznego kalusa i embrioidów nie znalazł potwierdzenia w doświadczeniach na *Lolium perenne* i *Festuca pratensis* oraz ich mieszańcach. W pylnikach tych roślin typowe ziarna pyłku rozwijały się w kalus, a ziarna z zaburzeniami degenerowały [54, 71]. Zauważono, że w pylnikach ryżu do androgenazy zdolne są tylko te mikrospory, które gromadzą najwięcej skrobi i tłuszczów podczas wstępnej inkubacji. Uznano, że te mikrospory są najbardziej żywotne i dlatego zdolne do więcej niż jednego podziału. Podobną obserwację prze-

prowadziła Benito Moreno i współpracownicy [9], lecz uważali oni, że wzmożona akumulacja materiałów zapasowych w pewnych mikrosporach jest wynikiem działania pożywki i warunków *in vitro*. Jednak wielu eksperymentatorów jest zdania, że do androgenazy łatwiej pobudzić pyłek wykazujący anomalie rozwojowe [17, 18, 19, 20, 60, 62]. Sunderland [60] nazwał taki pyłek P-grains. Uważa on, że w pylnikach pozostających na roślinie działają czynniki całkowicie hamujące rozwój P-grains. Odcięcie pylnika i wyłożenie go na pożywkę znosi działanie tych czynników, dlatego *in vitro* więcej ziaren pyłku rozwija się w kalus lub haploidalne embrioidy niż to mogło by mieć miejsce w naturze.

Sunderland opisał dwa najczęściej spotykane typy rozwoju haploidalnego kalusa i embrioidów. Typ „A” jest częściej spotykany [60]. W tym typie mitozą w mikrosporze jest zarazem pierwszym podziałem prowadzącym do androgenazy. Następnie dzieli się tylko komórka wegetatywna. Podziały początkowo mogą dotyczyć tylko jądra, a zakładanie ścian bywa opóźnione. Komórka generatywna stopniowo degeneruje i nie namnaża komórek. W typie „B” dzielią się jądra obu komórek pyłku. Po pewnym czasie zakładają się ściany i powstaje tkanka złożona z komórek pochodnych wegetatywnej i generatywnej komórki. Za odmianę typu „B” Sunderland uznał powstawanie kalusa tylko z komórki generatywnej [64].

Na roślinie androgeneza polega na kilkakrotnym podziale jąder bez zakładania ścian komórkowych. Dopiero po namnożeniu się pewnej liczby jąder po kolejnych podziałach następuje cytokineza i równocześnie budują się ściany komórkowe między istniejącymi już jądrami. *In vitro* częściej obserwuje się cytokinezy i budowę ścian komórkowych po każdym podziale jąder. Od razu powstaje tkanka. Tłumaczy się to wpływem sacharozy obecnej w pożywce. Sacharoza jest materiałem energetycznym, może być jednak przetworzona na polisacharydy potrzebne do budowy ścian komórkowej, jak to ma miejsce podczas androgenazy *in vitro* [9].

Dalsze namnażanie i wzrost komórek dopro-

wadza do pęknięcia egzyny i wydostania się kalusa lub embrioidu do komory pyłkowej [31, 54, 82, 83]. Bardzo często obserwuje się wydostające się z egzyny embrioidy, a nie ma pośredniego stadium kalusa. Embrioidy izoluje się z tkanek pylnika i wyklada na świeże pożywki zawierające mleczko kokosowe. Mleczko kokosowe jest najlepszym komponentem pożywki, stymulującym prawidłowy rozwój zarodków, ale w pewnych hodowlach daje się je zastąpić bielmem kukurydzy. Jeżeli z egzyny uwalnia się kalus, to pozostawia się go dłużej w tkankach pylnika. Po wyizolowaniu z komory pylnika kalus inkubuje się w pożywce stymulującej organogenezę lub embrionię somatyczną. Zarodki somatyczne przeszczepia się po pewnym czasie do indywidualnych hodowli i regeneruje z nich haploidalne rośliny. Nie zawsze udaje się pobudzić kalus do wytworzenia zarodków somatycznych, nie wszystkie zarodki regenerują w roślinę. Zarodki somatyczne wytworzone na drodze androgenезы mogą mieć inne wymagania co do warunków regeneracji niż zarodki somatyczne pochodzące z komórek sporofitowych. Wskazywało by to na odmienną kontrolę genetyczną procesów prowadzących do odtworzenia rośliny haploidalnej i diploidalnej [19].

Wydatność androgenезы jest ograniczona wieloma różnymi czynnikami w każdym z zestawów hodowli. Mimo tych trudności, jak to zostało napisane we wstępie, metoda pozyskiwania roślin haploidalnych tą właśnie drogą nabrała obecnie znaczenia praktycznego. Pierwsze rośliny haploidalne, które posłużyły do krzyżowań po wcześniejszym podwojeniu ich garniturów chromosomowych, były ubocznym efektem doświadczenia na tytoniu *in vitro* [44]. Wkrótce potem pierwsze udoskonalone dzięki takim roślinom odmiany tytoniu weszły do uprawy w Chinach [40], lecz naprawdę ważne było udoskonalenie odmian pszenicy i ryżu odpowiednich do uprawy w warunkach południowej Azji [13, 14, 24, 52]. Zboża te są podstawą żywienia w najbardziej zaludnionych krajach świata.

Androgenеза *in vitro* jest przede wszystkim

drogą do pozyskiwania roślin haploidalnych, ale oprócz nich otrzymuje się tą metodą rośliny o innych stopniach ploidalności [41, 42, 43, 81]. Podwojenie haploidalnego genomu następuje niekiedy samoistnie przed uformowaniem embrioidu w ziarnie pyłku. Zlewanie się jąder i endomitozy we wczesnych stadiach androgenезы mogą spowodować, że embrioidy z pyłku są w różnym stopniu poliploidalne, np. 2–5 n [36, 70, 71, 83].

We wczesnych fazach rozwoju zarodki pochodzące z pyłku i z tkanek pylnika są bardzo podobne do siebie. Embrioidy z tkanek pylnika regenerują w diploidalne rośliny przypominające roślinę, z której pobrano pylnik. Są one heterozygotyczne. Spoliploidyżowane rośliny pochodzenia androgenicznego są całkowicie homozygotyczne [12, 45]. Każda zregenerowana poliploidalna roślina homozygotyczna może być bardzo wartościowym materiałem w krzyżowaniach zmierzających do udoskonalenia odmiany. W całym potomstwie takiej rośliny pożądana cecha jest mocniej wyrażona niż po krzyżowaniu z rośliną diploidalną.

W pewnych szczepach *Solanum tuberosum* powstają diploidalne mikrospory. Androgenеза wywołana w takich mikrosporach prowadzi do regeneracji diploidalnych, heterozygotycznych roślin [72]. W innych szczepach *Solanum tuberosum* podczas mejozy zachodzą zaburzenia w rozdziale chromosomów. Tworzą się mikrospory o ploidalności 1–3n oraz mikrospory haploidalne z dodatkowymi chromosomami. Embrioidy pochodzące z takich mikrospor są odpowiednio ploidalne i heterozygotyczne. Regeneracja roślin z embrioidów o niezrównoważonym genotypie jest trudna. Rośliny o nieparzystym garniturze chromosomowym, tzn. tri- i pentaploidalne oraz aneuploidalne z dodatkowymi chromosomami są niepłodne na skutek zaburzeń w mejozie i nie są przydatne dla hodowców. W praktyce stosuje się działanie kolchicyny na stózek wzrostu tak, by wywołać podwojenie garnituru chromosomowego. Po podwojeniu genomu rośliny na ogół stają się płodne. Wytwarzają jednak często mikrospory także o różnych geno-

typach i jeżeli używa się ich do zapylania, to potomstwo F_1 jest bardziej zróżnicowane niż po krzyżowaniu z naturalną heterozygotą. Rośliny takie są przydatne w hodowli, jeśli selekcja pożądanых w F_1 fenotypów jest łatwa.

Przeszkodą w korzystaniu z roślin autodiploidalnych często jest ich obniżona żywotność na skutek ekspresji recesywnych genów semiletalnych. Jednak wyhodowanie jednej żywotnej rośliny autodiploidalnej o pożądanых cechach przynosi znaczne przyspieszenie efektu hodowli. W homozygotie, jaką jest roślina autodiploidalna podwojony jest gen pożądaney cechy, co nie zawsze udaje się osiągnąć tradycyjną metodą samozapylania powtarzanego przez wiele pokoleń. Samozapylenie u wielu gatunków napotyka na bariery niezgodności, co dodatkowo utrudnia wyhodowanie rośliny homozygotycznej. Autodiploid użyty do krzyżowania przekazuje gen pożądaney cechy całemu potomstwu. Współczesny poziom wiedzy na temat klonowania roślin *in vitro* otwiera szansę namnożenia roślin autodiploidalnych na drodze embriogenezy somatycznej. Operowanie klonem roślin autodiploidalnych, a nie pojedynczą rośliną, pozwala osiągnąć rezultaty hodowli na skalę produkcyjną. W przyszłości zarówno wydajność androgenezy, jak i metody klonowania *in vitro* zostaną jeszcze udoskonalone i będą miały wielkie znaczenie dla praktyki rolniczej [52, 78].

PYLEK *IN VITRO* – SELEKCJA GENOTYPÓW

W tradycyjnych metodach selekcji roślin odpowiednich do krzyżowania bierze się pod uwagę cechy fenotypowe sporofitu. Selekcję prowadzi się w kolejnych pokoleniach, co jest szczególnie długotrwałe w sadownictwie, gdzie trzeba kilku lat hodowli by ocenić wartość rośliny. Do selekcji konieczne jest hodowanie setek roślin na dużych obszarach. Stanowi to czynnik ograniczający tradycyjne metody, poza tym jest kosztowne.

Selekcjonowanie pyłku zamiast selekcji sporofitów w kolejnych pokoleniach znacznie przy-

spiesza dobór roślin do krzyżowania. Selekcja w fazie haploidalnej jest łatwiejsza i tańsza, gdyż trwa krótko, a wielka liczba ziaren pyłku pozwala na statystyczną ocenę obserwacji i obiektywizm.

W warunkach naturalnych pyłek roślin wyższych zachowuje zdolność do kiełkowania stosunkowo krótko, tj. od kilku do najwyżej kilkunastu godzin u roślin dwuliściennych i zaledwie pół godziny u zbóż. Opracowano metody pobierania i przechowywania pyłku przez wiele tygodni a nawet miesięcy, więc czynnik ten nie stanowi przeszkody w stosowaniu testów na kiełkującym pyłku w dowolnym niemal czasie [73]. Kiełkowanie łagiewek *in vitro* trwa około dwóch godzin w temperaturze 22–27°C. Zatem cały test można przeprowadzić w ciągu kilku godzin [9].

Selekcję oparto na założeniu, że około 60% genów jest czynnych zarówno w fazie haploidalnej, jak i diploidalnej rośliny. Doświadczalnie udowodniono, że geny determinujące szybki wzrost podlegają ekspresji w fazie haploidalnej, co przejawia się szybkim wzrostem łagiewki, w fazie diploidalnej szybkim wzrostem organów wegetatywnych rośliny [33, 37, 38, 39, 48, 57, 66]. Założono, że wigor wyrażający się tempem wzrostu i odpornością rośliny, powinien przejawiać się już podczas wzrostu łagiewki. Pyłek, który tworzy szybko rosnące łagiewki odporne na różne stresy, powinien przekazać te cechy potomstwu pochodzącemu z zapylenia tym pyłkiem [32, 46, 47].

Pyłek wyszczepia się na płynne pożywki w formie zawiesiny. Zakłada się po dwie hodowle z pyłkiem z tej samej rośliny. Jedna jest hodowlą kontrolną, w której pyłek kiełkuje na pożywce. Na podstawie liczby ziaren kiełkujących w łagiewkę oraz długości tych łagiewek ocenia się żywotność pyłku danej próby. Druga hodowla służy do przeprowadzenia testu. Aby sprawdzić czy pyłek jest nośnikiem genu determinującego odporność na podwyższone stężenie soli lub inny szkodliwy czynnik występujący w podłożu, do pożywki dodaje się sól lub inną substancję. NaCl i Na₂SO₄ najczęściej powodują szkodliwe

zasolenie gleb. Równocześnie zakłada się hodowlę z pyłkiem kilku roślin, które mogłyby być zapylaczami w krzyżowaniu. Porównuje się zdolność kielkowania pyłku i tempo wzrostu łagiewek każdej z roślin. Wybiera się próby, w których najwięcej ziaren pyłku wykiełkowało i gdzie wzrost łagiewek był najszybszy w zasolonej pożywce. Próby wskazują roślinę, z której należy pobierać pyłek do krzyżowania, aby w następnym pokoleniu roślin nasiliła się odporność na zasolenie gleb. Zapylenie pyłkiem, który szybko kiełkuje i wyrasta w łagiewkę stwarza większe szanse zapłodnienia przez jego gamety niż gamety z pyłku powoli kielkującego. Szybko rosnące łagiewki pozwalają mieć nadzieję, że prędzej niż inne dotrą do komórki jajowej. Zatem test żywotności i wigoru pyłku pozwala wybrać właściwą roślinę zapylającą bez długotrwałych obserwacji w fazie sporofitowej.

Podobnie jak odporność na zasolenie gleby, także inne cechy, np. odporność na zakażenie bakteryjne lub grzybowe, można wzmocnić w następnych pokoleniach przez zapylenie odpowiednim pyłkiem. Pyłek kiełkuje wtedy na pożywce zawierającej ekstrakty (najczęściej toksyny), wydzielane przez patogenne organizmy. Wybiera się taki pyłek, który może kiełkować na pożywce ze szkodliwym dodatkiem. Roślina wytwarzająca odporny na toksyny pyłek powinna być dawcą pyłku do krzyżowania, by w następnych pokoleniach otrzymać rośliny bardziej odporne na zakażenie patogenem. Podobnie testuje się pyłek pod względem odporności na antybiotyki [10, 11], a także herbicydy i inne podobnego typu substancje, które stosuje się w praktyce rolniczej. Takie doświadczenia zostały opisane przez wielu eksperymentatorów w ciągu ostatniego dziesięciolecia [7, 9, 22, 23, 46, 53, 58, 79, 80].

Najnowsze doświadczenia idą dalej niż wyselekcjonowanie rośliny-dawcy pyłku. W pylnikach każdej rośliny obok ziaren pyłku bardzo żywotnych i odpornych są także ziarna nie mające pożądanых cech. Zapylenie całą pulą pyłku powstającego w pylnikach rośliny stwarza szansę pożądanego zapłodnienia, ale w praktyce

zawsze część potomstwa pochodzi z zapłodnienia niepożądanym pyłkiem.

Obecnie czyni się próby selekcji poszczególnych ziaren pyłku do zapylenia (informacja ustna Bino i Stephenson z 1988 roku). Z zawiesziny pyłku w pożywce testującej wybiera się ziarna najlepiej kielkujące. Takie ziarna pyłku powinny być nośnikami pożądanego genu, więc przenosi się je na znamię słupka, do szyjki lub bezpośrednio na zalążki. Dotychczas próby takiego wybiórczego zapłodnienia nie powiodły się. Kielkujący pyłek obumiera podczas przenoszenia z kropli pożywki na znamię słupka lub zalążek. Łagiewka pyłkowa jest bardzo wrażliwa na wszelkie zmiany otoczenia i pęka lub więdnie podczas przenoszenia jej z pożywki na słupek.

Postęp w hodowli *in vitro* wyizolowanych zalążków pozwala mieć nadzieję, że w przyszłości wybiórcze zapłodnienie będzie możliwe [29, 74]. Metoda taka wydaje się jednak zbyt skomplikowana i mało wydajna, aby mogła mieć znaczenie praktyczne. Na razie manipulacja pojedynczymi ziarnami pyłku jest trudna. Wymaga to użycia mikroskopu i mikromanipulatorów. Jedynie pyłek niektórych gatunków roślin dyniowatych jest dostatecznie duży, by stosunkowo łatwo posłużyć się pojedynczym ziarnem, np. pyłek cukinii (informacja ustna Stephenson). Poza tym na znamieniu, a nawet mikropyle zalążka występują reakcje rozpoznawania się łagiewki i komórek organów żeńskich. Mogą to być reakcje niezgodności. Bardzo często powodzenie zapłodnienia zależy od subtelnej i do końca jeszcze nie wyjaśnionej reakcji rozpoznawania między pyłkiem a tkanką znamienia. Aby uniknąć reakcji niezgodności należy przede wszystkim usunąć egzynę z przylegającymi do niej substancjami odpowiedzialnymi za najwcześniejsze reakcje rozpoznawanie niezgodnego pyłku. Obecnie udaje się wyizolować woreczek zalążkowy i utrzymać go przez pewien czas przy życiu na pożywce. Najnowsze doświadczenia polegają na izolowaniu protoplastów lub gamet męskich z kielkującego pyłku [4, 34, 35, 67]. Na razie doświadczenia zmierzają do poznania fizjologii protoplastów i gamet, ale w

przyszłości zdobyta wiedza pozwoli na bardziej skuteczną manipulację tymi bardzo wrażliwymi komórkami. Wybiórcze zapłodnienie mogłoby znacznie przyspieszyć efekt hodowli, nawet gdyby otrzymano tą drogą tylko pojedyncze rośliny.

Równoległy rozwój metod w wielu dziedzinach hodowli tkanek i postęp wiedzy o embriologii, a szczególnie o procesach zachodzących w fazie progamicznej pozwala mieć nadzieję, że w przyszłości wybiórcze zapłodnienie będzie miało duże znaczenie dla hodowli roślin uprawnych.

LITERATURA

- [1] AGACHE S., DE BUYSER J., HENRY I., SNAPE J. W. 1988. Studies of the genetic relationship between anther culture and somatic tissue culture abilities in wheat. *Plant Breeding* 100: 26–33.
- [2] ALAMI S., SOUVRE A., ALBERTINI L. 1988. The effects of stresses (cold or and darkness) on pollen viability of two varieties of grain-Sorghum. W: M. CRESTI, P. GORI, E. PACINI (red.), *Sexual Reproduction in Higher Plants*. Springer, Berlin-Heidelberg, ss. 256–264.
- [3] ALAMI S., SOUVRE A., ALBERTINI L. 1988. Effects de l'obscurité et du froid sur l'ontogenes et la vialité du pollen chez deux varietes de sorgha grain (*Sorghum bicolor* L. Moench.). Incidence sur les correspondances entre le developpement végétatif et la formation du pollen. *Rev. Cytol. Biol. Végét. Bot.* 1(1): 13–41.
- [4] BALDI B. G., EVERARD J. D., LOEWUS F. A. 1988. Preparation of sporoplasts for studies of pollen physiology. W: M. CRESTI, P. GORI, E. PACINI (red.), *Sexual Reproduction in Higher Plants*. Springer, Berlin-Heidelberg, ss. 101–106.
- [5] BARNABAS B., RAJCI E. 1981. Fertility of deep-frozen maize (*Zea mays*) pollen. *Ann. Bot.* 48: 861–864.
- [6] BARNABAS B., SZAKACS E., LISZT K. 1988. Cytological aspects of in vitro androgenesis in cereals. W: M. CRESTI, P. GORI, E. PACINI (red.), *Sexual Reproduction in Higher Plants*. Springer, Berlin-Heidelberg, ss. 113–118.
- [7] BARROW J. R. 1983. Comparisons among pollen viability measurement methods in cotton. *Crop Sci.* 23: 734–736.
- [8] BARROW J. R. 1986. The conditions required to isolate and maintain viable cotton microspores. *Plant cell Rep.* 5: 405–408.
- [9] BENTTO MORENO R. M., MACKE F., HAUSER M. T., ALWEN A., HEBERLE-BORS E. 1988. Sporophytes and male gametophytes from in vitro cultured, immature tobacco pollen. W: M. CRESTI, P. GORI, E. PACINI (red.), *Sexual Reproduction in Higher Plants*. Springer, Berlin-Heidelberg, ss. 137–142.
- [10] BINO R. J., FRANKEN J., HILLE J. 1987. Kamamycin resistance during in vitro development of pollen from transgenic tomato plants. *Plant Cell Reports* 6: 333–336.
- [11] BINO R. J., FRANKEN J., VANDER ZEEUW E. 1988. Method development for applying pollen selection in *Cucumber* breeding programmes: effects of centrifugation on pollen competence. W: M. CRESTI, P. GORI, E. PACINI (red.), *Sexual Reproduction in Higher Plants*. Springer, Berlin-Heidelberg, ss. 27–32.
- [12] CHATURVEDI H. C., SHARMA A. K. 1985. Androgenesis in *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle. *Planta* 165: 142–144.
- [13] CHEN Y., LI L. T. 1978. Investigation and utilisation of pollen derived haploid plants in rice and wheat. W: *Proceed. Symp. Plant Tissue Culture. Sci. Press*, ss. 199–211. Peking.
- [14] DE BUYSER J., HENRY J., LONNET P., HERTZOG R., HESPEL A. 1987. „Florin”: A double haploid wheat variety developed by the anther culture method. *Plant Breeding* 98: 53–56.
- [15] DIEU P., DUNWELL J. M. 1988. Anther culture with different genotypes of opium poppy (*Papaver somniferum* L.): effect of cold treatment. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 12: 263–271.
- [16] DUNWELL J. M. 1981. Stimulation of pollen embryo induction in tobacco by pretreatment of excised anthers in a water-saturated atmosphere. *Plant Sci. Lett.* 21: 9–13.
- [17] HEBERLE-BORS E. 1982. In vitro pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L. and its relation to floral induction, sex balance and pollen sterility of the pollen donor plants. *Planta* 156: 396–399.
- [18] HEBERLE-BORS E. 1983. Induction of embryogenit pollen grains and subsequent embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L. by treatment of the pollen donor plants with feminizing agents. *Physiol. Plant.* 59: 67–72.
- [19] HEBERLE-BORS E. 1984. Genotypic control of pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum*. *Theor. Appl. Genet.* 68: 475–479.
- [20] HEBERLE-BORS E. 1985. In vitro haploid formation from pollen: a critical review. *Theor. Appl. Genet.* 71: 361–374.
- [21] HENRY Y., DE BUYSER J., GUENEGOU T., ORY C. 1984. Wheat microspore embryogenesis during in vitro anther culture. *Theor. Appl. Genet.* 67: 439–442.
- [22] HODGKIN T. 1988. In vitro pollen selection in *Brassica napus* L. W: M. CRESTI, P. GORI, E. PACINI (red.), *Sexual Reproduction in Higher Plants*. Springer, Berlin-Heidelberg, ss. 57–62.
- [23] HODGKIN T., MACDONALD M. V. 1986. The effect of phytotoxin from *Alternaria brassicicola* on *Brassica* pollen. *New Phytol.* 104: 631–636.
- [24] HU H., HSI T., TSENG C. C., OUYANG T. W., CHING C. K. 1978. Application of anther culture to crop plants.

- W: THORPE. (red.), *Frontiers of plant tissue culture*. IAPTC Calgary, ss. 123–130.
- [25] IMMAMURA J., HARADA H. 1980. Studies on the changes in the volume and proliferation rate of cells during embryogenesis of *in vitro* cultured pollen grains of *Nicotiana tabacum* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 96: 261–267.
- [26] IMMAMURA J., HARADA H. 1980. Studies on the changes in the volume and proliferation rate during embryogenesis *in vitro* of *Nicotiana tabacum* pollen. *Z. Pflanzenphysiol.* 100: 285–289.
- [27] JOHANSSON L. 1983. Effects of activated charcoal in anther cultures. *Physiol. plant.* 59: 397–403.
- [28] JONES A. M., PETOLINA J. F. 1988. Effects of support medium on embryo and plant production from cultured anthers of soft-red Winter wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 12: 253–261.
- [29] KEIJZER C. J., REINDERS M. C., LEFERINKTEN KLOSTER H. B. 1988. A micromanipulation method for artificial fertilization in *Torrenia*. W: M. CRESTI, P. GORI, E. PACINI (red.), *Sexual Reproduction in Higher Plants*. Springer, Berlin-Heidelberg, ss. 119–124.
- [30] KYO M., HARADA H. 1986. Control of the development pathway of tobacco pollen *in vitro*. *Planta* 168: 427–432.
- [31] MAHESHWARI S. C., RASHID A., TYAGI A. K. 1982. Haploids from pollen grains – retrospect and prospect. *Am. J. Bot.* 69: 865–879.
- [32] MARIEN J. N. 1988. Breeding for frost resistance in *Eucalyptus* using pollen selection: screening on viability using flowcytometry. W: M. CRESTI, P. GORI, E. PACINI (red.), *Sexual Reproduction in Higher Plants*. Springer, Berlin-Heidelberg, ss. 51–55.
- [33] MASCARENHAS J. P., STINSON J. R., WILLING R. P., PE M. F. 1986. Genes and their expression in the male gametophyte of flowering plants. W: D. L. MULCAHY, G. BERGAMINI-MULCAHY, E. OTTAVIANO (red.), *Biotechnology and ecology pollen*. Springer, New York, ss. 39–44.
- [34] MATTHYS-ROCHON E., DETCHEPORE S., WAGNER V., ROECKEL P., DUMAS C. 1988. Isolation and characterization of viable sperm cells from tricellular pollen grains. W: M. CRESTI, P. GORI, E. PACINI (red.), *Sexual Reproduction in Higher Plants*. Springer, Berlin-Heidelberg, ss. 245–250.
- [35] MIKI-HIROSHIGE H., NAKAMURA S., TAKAHASHI T., TANAKA I. 1988. Ultrastructural observations on isolated and cultured protoplasts of lily pollen. W: M. CRESTI, P. GORI, E. PACINI (red.), *Sexual Reproduction in Higher Plants*, ss. 239–244. Springer, Berlin-Heidelberg.
- [36] MORRISON R. A., KONING R. E., EVANS D. A. 1986. Anther culture of an interspecific hybrid of *Capsicum*. *J. Plant Physiol.* 126: 1–9.
- [37] MULCAHY D. L., MULCAHY G. B. 1975. The influence of gametophytic competition on sporophytic quality in *Dianthus chinensis*. *Theor. Appl. Genet.* 46: 277–280.
- [38] MULCAHY D. L., CURTIS P. S., SNOW A. A. 1983. Pollen competition in a natural population. W: C. E. JONES, R. J. LITTLE (red.), *Handbook of Experimental Pollination Biology*. Sci. and Acad. Edit, New York, ss. 330–337.
- [39] MULCAHY D. L., MULCAHY G. B., POPP R., FONG N., PALLAIS N., KALINOSKI A., MARIEN J. N. 1988. Pollen selection for stress tolerance or the advantage of selecting before pollination. W: M. CRESTI, P. GORI, E. PACINI (red.), *Sexual Reproduction in Higher Plants*. Springer, Berlin-Heidelberg, ss. 43–50.
- [40] NAKAMURA A., YAMADA T., KADOTANI N., ITAGAKI R., OKA M. 1974. Studies on the haploid method of breeding in tobacco. *Sabraoj* 6: 107–131.
- [41] NARAYANASWAMY S., CHANDY L. 1971. *In vitro* induction of haploid diploid and triploid androgenic embryos and plantlets in *Datura metel* L. *Ann. Bot.* 35: 535–542.
- [42] NITSCH C. 1974. La culture du pollen isolé sur milieu syntétique. *CR Acad. Sci.* Ser. D. 27B: 1031–1034.
- [43] NITSCH C. 1981. Production of isogenic lines: basic technical aspects of androgenesis. W: T. A. THORPE (red.), *Plant Tissue Culture, Methods and Application in Agriculture*. Acad. Press London New York, ss. 241–252.
- [44] NITSCH C., NORREL B. 1973. Effect d'un choc thermique sur le pouvoir embryogène du pollen de *Datura* cultivé dans l'anthere ou isolé de l'anthere. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 267: 303–306.
- [45] NITSCH J. P. 1969. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology* 19: 398–404.
- [46] OTTAVIANO E., MULCAHY D. L. 1986. Gametophytic selection as a factor of crop plant evolution. W: C. BARIGOZZI (red.), *The Origin and Domestication of Cultivated Plants*. Elsevier, Amsterdam, Oxford N. Y, ss. 101–117.
- [47] OTTAVIANO E., SARI-GORLA M., FROVA C., PE E. 1988. Male gametophytic selection in higher plants. W: M. CRESTI, P. GORI, E. PACINI (red.), *Sexual Reproduction in Higher Plants*, ss. 35–42. Springer Berlin-Heidelberg.
- [48] PEDERSEN S., SIMONSEN V., LOESCHKE I. 1987. Overlap of gametophytic and sporophytic gene expression in barley. *Theor. Appl. Genet.* 75: 200–206.
- [49] POWELL W. 1988. The influence of genotype and temperature pretreatment on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 12: 291–297.
- [50] RAGHAVAN V. 1978. Origin and development of pollen embryoids and pollen calluses in cultured anther segments of *Hyoscyamus niger* (Henbane). *Amer. J. Bot.* 65: 984–1002.
- [51] RAGHAVAN V. 1984. Protein synthetic activity during normal pollen development and during induced pollen embryogenesis in *Hyoscyamus niger*. *Can. J. Bot.* 62: 2493–2513.
- [52] RODE A., HARTMANN C., DRON M., PICARD E., OUE-
TIER F. 1985. Organelle genome stability in anther-de-

- rived doubled haploids of wheat (*Triticum aestivum* L. cv. „Moisson”). *Theor. Appl. Genet.* **71**: 320–324.
- [53] RODRIGUEZ-GARAY B., BARROW J. R. 1988. Pollen selection for heat tolerance in cotton. *Crop Sci.* **28**(5): 857–859.
- [54] ROSE J. B., DUNWELL J. M., SUNDERLAND N. 1987. Anther culture of *Lolium temulentum*, *Festuca pratensis* and *Lolium x Festuca hybrids*. II. Anther and pollen development *in vivo* and *in vitro*. *Ann. Bot.* **60**: 203–214.
- [55] ROSE J. B., DUNWELL J. M., SUNDERLAND N. 1987. Anther Culture of *Lolium temulentum*, *Festuca pratensis* and *Lolium x Festuca hybrids*. III. Influence of pretreatment culture medium and culture incubation conditions on callus production and differentiation. *Ann. Bot.* **60**: 191–201.
- [56] SAGI L., SZAKACS E. 1988. Morphogenetic processes in wheat anther culture. W: M. CRESTI, P. GORI, E. PACINI (red.), *Sexual Reproduction in Higher Plants*. Springer, Berlin-Heidelberg, ss. 483.
- [57] SEARCY K. B., MULCAHY D. L. 1985. Pollen selection and the gametophyte expression of metal tolerance in *Silene dioica* (Caryophyllaceae) and *Mimulus guttatus* (Scrophulariaceae). *Amer. J. Bot.* **72**: 1700–1706.
- [58] SNOW A. 1986. Pollination dynamics in *Epilobium canum* (Onagraceae). Consequence for gametophytic selection. *Amer. J. Bot.* **73**: 139–151.
- [59] STANLEY R. G., LINSKENS H. F. 1974. Pollen biology, biochemistry and management. Springer, Berlin-Heidelberg, New York.
- [60] SUNDERLAND N. 1971. Anther culture: a progress report. *Sci. Prog.* (London) **59**: 527–549.
- [61] SUNDERLAND N. 1974. Anther culture as a means of haploid production. W: K. J. KASHA (red.), *Haploids in Higher Plants: Advances and Potential*. Univ. Guelph Press, Guelph, ss. 91–222.
- [62] SUNDERLAND N. 1978. Strategies on the improvement of yields in anther culture. W: *Proceed. Symp. Plant Tissue Culture*. Sci. Press, Peking, ss. 65–86.
- [63] SUNDERLAND N. 1984. Induction of growth in the culture of pollen. W: M. M. YEOMAN, D. TRUMAN (red.), *Differentiation in vitro*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, ss. 1–24.
- [64] SUNDERLAND N., COLLINS G. B., DUNWELL J. M. 1974. The role of nuclear fusion in pollen embryogenesis of *Datura innoxia* Mill. *Planta*. **117**: 227–241.
- [65] SUNDERLAND N., ROBERTS M. 1979. Cold pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anthers. *Ann. Bot.* **43**: 405–414.
- [66] TANSKLEY S. D., ZAMIR D., RICK C. N. 1981. Evidence for existence overlap of sporophytic and gametophytic gene expression in *Lycopersicon esculentum*. *Science* **213**: 453–455.
- [67] THEUNIS C. H., VAN WENT J. L., WILMSD M. J. 1988. A technique to isolate sperm cells of mature *Spinacia* pollen. W: M. CRESTI, P. GORI, E. PACINI (red.), *Sexual Reproduction in Higher Plants*, ss. 233–238. Springer Berlin-Heidelberg.
- [68] THURLING V., CHANY P. M. 1984. The influence of donor plant genotype and environment on production of multicellular microspores in cultured anthers of *Brassica napus ssp. oleifera*. *Ann. Bot.* **54**: 681–693.
- [69] TORRIZO L. B., ZAPATA F. J. 1986. Anther culture in rice. IV. The effect of abscisic acid on plant regeneration. *Plant Cell Reports* **5**: 136–139.
- [70] TSAY H. S., MIAO S. H., WIDHOLM J. M. 1986. Factors affecting haploid plant regeneration from maize anther culture *J. Plant. Physiol.* **126**: 33–40.
- [71] TSAY S. S., TSAY H. S., CHAO C. Y. Cytochemical studies of callus development from microspore in cultured anther of rice. *Plant Cell Reports* **5**: 119–123.
- [72] UHRIG H. 1985. Genetic selection and liquid medium conditions improve the yield of androgenetic plants from diploid potatoes. *Theor. Appl. Genet.* **71**: 455–460.
- [73] VISSER T. 1955. Germination and storage of pollen. *Meded. Landbouwhogeschool*, Wageningen, **55**: 1–68.
- [74] WAGNER V. T., SONG Y., MATTHYS-ROCHON F., DUMAS C. 1988. The isolated embryo sacs of *Zea mays* structural and ultrastructural observations. W: M. CRESTI, P. GORI, E. PACINI (red.), *Sexual Reproduction in Higher Plants*. Springer, Berlin-Heidelberg, ss. 125–130.
- [75] WEATHERHEAT M. A., BURDON J., HENSHAW G. G. 1978. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. *Z. Pflanzenphysiol.* **89**: 141–147.
- [76] WEATHERHEAT M. A., BURDON J., HENSHAW G. G. 1979. Effect of charcoal addition to plant tissue culture media. *Z. Pflanzenphysiol.* **94**: 399–405.
- [77] WHEATLEY W. G., MARSOLAIS A. A., KASHA K. J. 1986. Microspore growth and anther culture in barley. *Plant Cell Reports* **5**: 47–49.
- [78] YEOMAN M. M. 1987. Bypassing the plant. *Ann. Bot.* **60**, Supl. **4**: 157–174.
- [79] ZAMIR D., TANSKLEY S. D., JONES R. A. 1982. Haploid selection for low temperature tolerance of tomato pollen. *Genetics* **101**: 129–137.
- [80] ZAMIR D., TANSKLEY S. D., JONES R. A. 1987. Pollen selection for low temperature adaptation in tomato. *Theor. Appl. Genet.* **74**: 545–548.
- [81] ZENKTELER M. 1971. *In vitro* production of haploid plants from pollen grains of *Atropa belladonna* L. *Experientia* **27**: 1087.
- [82] ZENKTELER M. (red.) 1984. Hodowla komórek i tkanek roślinnych. PWN, Warszawa.
- [83] ZENKTELER M., MISTIURA E., PONITKA A. 1975. Induction of androgenetic embryoids in the *in vitro* cultured anthers of several species. *Experientia* **31**: 289–291.
- [84] ZHUANG J. J., JIA X. 1983. Increasing differentiation frequencies in wheat pollen calluses. W: *Cell and Culture Techniques for Cereal Crop Improvement*. Sci. Press, Peking, ss. 431.