

KRYSTYNA MUSIAŁ i LESŁAW PRZYWARA

Zakład Cytologii i Embriologii Roślin

Uniwersytet Jagielloński

Grodzka 52, 31-044 Kraków

e-mail: musial@grodzki.phils.uj.edu.pl

e-mail: przywara@grodzki.phils.uj.edu.pl

## GYNOGENEZA U ROŚLIN

### WSTĘP

Termin gynogeneza (ginogeneza), w pierwotnym znaczeniu, określa rozwój organizmu haploidalnego z niezapłodnionej komórki jajowej zachodzący wówczas, gdy plemnik, który wniknął do gamety żeńskiej degeneruje przed kariogamią (RIEGER i współaut. 1974). Spontaniczną gynogenezę, w takim znaczeniu, opisano w świecie zwierząt u niektórych płazińców, nicieni, pierścienic i ryb.

Do embriologii eksperymentalnej roślin termin gynogeneza został wprowadzony przez SAN NOEUM (1979) i używany jest dla określenia rozwoju w warunkach *in vitro* haploidalnych zarodków i roślin z niezapłodnionego woreczka zalążkowego. Termin ten oznacza także rozwój zarodków *in vitro* bezpośrednio z megaspory (MÓL 1999). Niektórzy autorzy (np. BOHANEK 1994, BARAŃSKI 1996a) terminu gynogeneza używają także do indukcji haploidów *in situ* w wyniku zapylenia napromieniowanym pyłkiem.

Rośliny haploidalne stanowią cenny materiał w hodowli, ponieważ podwojenie liczby ich chromosomów pozwala na uzyskanie osobników homozygotycznych, które są powszechnie wykorzystywane w programach hodowlanych. W naturze spontaniczny rozwój haploidów jest zjawiskiem bardzo rzadkim, co uniemożliwia wykorzystanie tak powstałych roślin na szerszą skalę w praktyce.

Uzyskiwanie linii homozygotycznych tradycyjnymi metodami (np. w wyniku zapyleń wstecznych) jest procesem bardzo czasochłonnym. W przypadku gatunków allogamicznych i dwuletnich dopiero po upływie kilku lat możliwe jest otrzymanie czystych linii homozygotycznych stanowiących materiał wyjściowy do dalszych badań. Stosowane obecnie techniki eksperymentalne pozwalają na uzyskanie roślin haplo-

dalnych w znacznie krótszym czasie - nawet po upływie kilku miesięcy.

Wśród metod sztucznego indukowania rozwoju haploidów u roślin można wyróżnić dwie główne kategorie:

— techniki zapylenia prowadzące do rozwoju haploidalnych zarodków *in situ* (np. opóźnione zapylenie własnym pyłkiem, zapylenie międzyrodzajowe lub międzygatunkowe, zapylenie pyłkiem napromieniowanym); metody te mogą być wspomagane kulturą *in vitro* nasion, załazni lub zarodków;

— techniki kultury *in vitro* organów generatywnych: pylników lub izolowanych mikrospor (androgeneza) oraz niezapłodnionych załazni lub załazzków (gynogeneza).

W niniejszym artykule omówione zostaną zagadnienia związane z gynogenezą u roślin.

Próby kultury *in vitro* niezapylnych załazni lub załazzków podjęto pod koniec lat 50., jednak bez powodzenia. Kilka lat później udało się zaindukować rozwój haploidalnego kalusa w kulturze niezapłodnionych gametofitów żeńskich *Ginkgo biloba* (TULECKE 1964). U roślin okrytonasiennych po raz pierwszy uzyskano haploidalny kalus w kulturze załazni *Zea mays* i załazzków *Solanum melongena* (UCHIMIYA i współaut. 1971), a pierwsze gynogeniczne rośliny w wyniku kultury załazni *Hordeum vulgare* (SAN NOEUM 1976).

Pomyślna indukcja gynogenicznych zarodków nie zawsze prowadzi do otrzymania roślin, bowiem może nastąpić zahamowanie rozwoju zarodków tuż po ich powstaniu. Nie udało się np. zregenerować siewek z haploidalnych zarodków u *Astragalus cicer*, *Baptisia australis* (PONITKA i ŚLUSARKIEWICZ-JARZINA 1987), *Olea europaea* (Fodale i współaut. 1992, cyt. wg

Tabela 1. Lista gatunków, u których uzyskano gynogeniczne rośliny.

Takson	Literatura*
<i>Allium cepa</i>	MUREN 1989, CAMPION i ALONI 1990, KELLER 1990
<i>Allium cepa</i> var. <i>aggregatum</i>	COHAT 1994
<i>Allium porrum</i>	SCHUM i współaut. 1993
<i>Allium tuberosum</i>	TIAN i YANG 1989
<i>Asparagus officinalis</i>	KUNITAKE i współaut. 1998
<i>Beta vulgaris</i>	HOSEMANS i BOSSOUTROT 1983
<i>Capsicum</i> sp.	DUNWELL 1986
<i>Coix lacryma-jobi</i>	LI i ZHANG 1984 (cyt. wg YANG i ZHOU 1990)
<i>Cucurbita pepo</i>	DE VAULX i CHAM BONNET 1986
<i>Gerbera jamesonii</i>	CAGNET-SITBON 1981
<i>Helianthus annuus</i>	YANG i współaut. 1986
<i>Hevea brasiliensis</i>	Chen i współaut. 1985 (cyt. wg YANG i ZHOU 1990)
<i>Hordeum vulgare</i>	SAN NOEUM 1976
<i>Lilium davidii</i> var. <i>willmottiae</i>	GU i CHENG 1983
Oriental lily var. <i>Leraza</i>	PRAKASH i GILES 1986
<i>Melandrium album</i>	MÓL 1992
<i>Morus alba</i>	THOMAS i współaut. 1999
<i>Morus indica</i>	SITA i RAVINDRAN 1991
<i>Nicotiana rustica</i>	WU i CHENG 1982a
<i>Nicotiana tabacum</i>	ZHU i WU 1979
<i>Oryza sativa</i>	ASSELIN de BEAUVILLE 1980, ZHOU i YANG 1980
<i>Panicum miliaceum</i>	KASHIN i współaut. 2000
<i>Petunia axillaris</i>	DE Verna i COLLINS 1984
<i>Populus x simonigra</i>	Wu i Xu 1984 (cyt. wg BAJAJ 1990)
<i>Solanum tuberosum</i>	TAO i współaut. 1988
<i>Triticum aestivum</i>	ZHU i WU 1979
<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i>	MDARHRI-ALAOUI i współaut. 1998
<i>Zea mays</i>	AO i współaut. 1982

\* wymieniono tylko pierwsze doniesienia o otrzymaniu gynogenicznych roślin u danego gatunku

MUKHAMBETZHANOV 1997) i *Gingko biloba* (FONTANEL i współaut. 1994).

Dotychczas na drodze gynogenezy otrzymano rośliny u 28 taksonów Angiospermae (Tabela 1). Dla porównania liczba gatunków, u których

uzyskano androgeniczne haploidy znacznie przekracza obecnie 200 gatunków (zob. GÓRALSKI i współaut. 1999 i zawarta tam literatura).

Niska wydajność procesu gynogenezy oraz mała liczba uzyskiwanych regenerantów są nadal czynnikami ograniczającymi szerokie zastosowanie tej metody w hodowli roślin. Jedynie w przypadku buraka, ryżu, gerbery, słonecznika i cebuli gynogeniczne haploidy są już praktycznie wykorzystywane w programach hodowlanych. Należy jednak podkreślić, że otrzymywanie haploidów na drodze gynogenezy jest metodą alternatywną u gatunków, u których inne sposoby haploidyzacji nie przyniosły pomyslnych rezultatów, a także u roślin męskosterylnych. Dodatkową zaletą tej metody jest to, że frekwencja regeneracji zielonych roślin gynogenicznych może być wyższa niż w przypadku androgenozy, gdzie częstym zjawiskiem jest powstawanie dużej liczby albinotycznych siewek (YANG i ZHOU 1982, MUKHAMBETZHANOV 1997). Warto także dodać, że oprócz ewidentnych korzyści praktycznych, opracowanie metody indukcji gynogenezy *in vitro* stworzyło jeszcze jeden system eksperymentalny umożliwiający badanie mechanizmów związanych z wczesnymi etapami embriogenezy u roślin (KRANZ i współaut. 1995, KRANZ i DRESSELHAUS 1996, ROUGIER i współaut. 1996).

W literaturze światowej problematyka gynogenezy u roślin omówiona została w kilku pracach przeglądowych (YANG i ZHOU 1982, JENSEN 1986, BAJAJ 1990, BOHANEK 1994, FERRIE i współaut. 1995, MUKHAMBETZHANOV 1997, MÓL 1999). Również w języku polskim kilka lat temu ukazały się artykuły, w których poruszone zostały niektóre zagadnienia związane z kulturą niezaplodnionych zalążni i zalążków (NIEMIROWICZ-SZCZYTT 1989, 1995; BARAŃSKI 1996a). W ostatnich latach obserwuje się wyraźne zwiększenie zainteresowania gynogenezą w różnych ośrodkach na świecie. Opublikowano liczne prace eksperymentalne, które wydatnie wzbogaciły naszą wiedzę na ten temat.

Na efektywność indukcji gynogenezy wpływa szereg czynników, z których najważniejsze to: genotyp rośliny donorowej, skład pożywki, stadium rozwojowe woreczka zalążkowego, warunki kultury, rodzaj eksplantatu, wiek oraz warunki wzrostu rośliny matecznej.

#### GENOTYP ROŚLINY DONOROWEJ

Stwierdzono ścisłą zależność między genotypem rośliny matecznej a zdolnością do gynogenezy. U *Gerbera jamesonii*, spośród 19 badanych odmian, tylko odmiana „Fresultane” ujawniła

wysoką zdolność do formowania haploidalnego kalusa (ponad 7%), który charakteryzował się dużym potencjałem morfogenetycznym (MEYNET i SIBI 1984). Także MIYOSHI i ASAKURA

(1996) wykazali, że wśród 17 testowanych genotypów gerbery, tylko jeden odznaczał się wysoką frekwencją indukcji kalusa (17.5%), podczas gdy u czterech genotypów nie udało się stymulować tworzenia tkanki kalusowej.

Badania nad indukcją gynogenezy u *Allium cepa* potwierdziły, że genotyp rośliny donorowej ma decydujący wpływ na frekwencję rozwoju haploidów (MUREN 1989, SMITH i współaut. 1991, CAMPION i współaut. 1992, BOHANEK i współaut. 1995, JAKSE i współaut. 1996). GEOFFRIAU i współaut. (1997) stwierdzili, że u 22 genotypów cebuli pochodzących z różnych stron Europy i USA wydajność gynogenezy wahała się od 0.2% do 17%. Podobne różnice ujawnili BOHANEK i JAKSE (1999) u badanych genotypów z Europy, Japonii i Ameryki Północnej. Wykazano także, że materiał hodowlany z Ameryki odznaczał się prawie pięciokrotnie wyższą zdolnością do gynogenezy niż materiał z Europy i dziewięciokrotnie wyższą niż w przypadku genotypów pochodzących z Japonii. Różnice w wydajności gynogenezy od 0% do 10% obserwowano również u 30 polskich genotypów cebuli

(MICHALIK i współaut. 2000). Stwierdzono ponadto, że u tego samego genotypu w kolejnych latach kultury *in vitro* efektywność gynogenezy znacznie się różniła (GEOFFRIAU i współaut. 1997, MICHALIK i współaut. 2000). BOHANEK i JAKSE (1999) nie odnotowali jednak takich różnic w badanym przez siebie materiale. Dotychczas najwyższą frekwencję indukcji gynogenezy zaobserwowano u cebuli szalotki (*Allium cepa* var. *aggregatum*); w zależności od genotypu wynosiła ona od 0% do 55% (COHAT 1994).

Fakt, że genotyp rośliny donorowej jest podstawowym czynnikiem warunkującym wydajność procesu gynogenezy, potwierdziły również badania nad *Oryza sativa* (ZHOU i YANG 1981, RONGBAI i współaut. 1998), *Zea mays* (TRUONG-ANDRE i DEMARLY 1984), *Beta vulgaris* (VAN GEYT i współaut. 1987, BARAŃSKI 1996b), *Helianthus annuus* (ZHOU i współaut. 1986, GELEBART i SAN 1987), *Hordeum vulgare* (CASTILLO i CISTUÉ 1993), *Allium porrum* (SCHUM i współaut. 1993) oraz *Triticum turgidum* subsp. *durum* (MDARHRI-ALAOUI i współaut. 1998).

#### SKŁAD POŻYWKI

Na efektywność gynogenezy bardzo istotny wpływ ma również odpowiedni dobór składników pożywki indukującej. Jako pożywki podstawowe stosowano najczęściej pożywki: N6 (Chu 1978, cyt. wg GAMBORG i PHILLIPS 1995), Millera (MILLER 1963), MS (MURASHIGE i SKOOG 1962) oraz B5 (GAMBORG i współaut. 1968). W zależności od wymagań poszczególnych gatunków lub genotypów pożywki te są modyfikowane, głównie poprzez dodatek regulatorów wzrostu oraz sacharozy, których optymalne stężenie ustala się eksperymentalnie (Tabela 2).

W większości przypadków obecność egzogennych hormonów jest niezbędna do indukcji gynogenezy, aczkolwiek ich wysokie stężenie może niekiedy stymulować formowanie kalusa z tkanek somatycznych przy jednoczesnym hamowaniu rozwoju gynogenicznych zarodków (YANG i ZHOU 1982, MUKHAMBETZHANOV 1997). Zjawisko takie obserwowano np. w kulturze załączków *Helianthus annuus* (YANG i współaut. 1986).

Badania CAMPION i współaut. (1995) nieoczekiwanie ujawniły, że u *Allium cepa* rozwój gynogenicznych zarodków możliwy jest także na pożywce bez egzogennych fitohormonów. Dotychczas nie obserwowano takiego zjawiska u innych gatunków. Wskazuje to, że cebula posiada szczególne predyspozycje do gynogene-

zy, które mogą być uwydatnione dodatkiem regulatorów wzrostu.

Efektywność gynogenezy może być znacząco zwiększona także poprzez uzupełnienie medium takimi substancjami jak np. hydrolizat kazeiny, ekstrakt z drożdży, mleczko kokosowe. Dodatek mleczka kokosowego miał wyraźnie korzystny wpływ na formowanie haploidalnego kalusa w kulturze załączków *Hordeum vulgare* (CASTILLO i CISTUÉ 1993). Podobne wyniki uzyskano u *Oryza sativa* przez dodanie do medium ekstraktu z drożdży (ASSELIN de BEAUVILLE 1980) lub hydrolizatu kazeiny (KUO 1982). W kulturze niezapylnych załączni *Panicum miliaecum* wykazano, że obecność w pożywce ekstraktu z ziemniaka ma wpływ na formę przebiegu gynogenicznego rozwoju. U tego gatunku ekstrakt z ziemniaka obniżał frekwencję tworzenia embriogenego kalusa natomiast zwiększał częstotliwość procesu bezpośredniej embriogenezy (KASHIN i współaut. 2000). W kulturze załączków *Gerbera jamesonii* stwierdzono ponadto, że obecność w pożywce aktywowanego węgla drzewnego silnie hamuje indukcję haploidalnego kalusa (CAPPADOCIA i współaut. 1988).

Na wydajność gynogenezy może mieć również wpływ rodzaj czynnika zestalającego pożywkę. Zastosowanie czynnika żelującego w postaci gellan gum, zamiast powszechnie stoso-

Tabela 2. Przykłady pożywek wykorzystywanych do indukcji gynogenezy u wybranych gatunków Angiospermae.

Takson	Pożywka podstawowa	Regulatory wzrostu	Stężenie sacharozы (%)	Literatura
<i>Allium cepa</i>	B5	2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BA	10	MUREN 1989
	MS	2 mg/l 2iP + 1 mg/l NAA lub 2 mg/l 2iP + 1.5 mg/l IAA	3	CAMPION i ALLONI 1990
	BDS		10	CAMPION i współaut. 1992
<i>Allium cepa</i> var. <i>aggregatum</i>	B5	2 mg/l BA + 2 mg/l 2,4-D 9 $\mu$ M 2,4-D + 6.5 $\mu$ M BAP	10	COHAT 1994
	MS	1 $\mu$ M NAA + 8 $\mu$ M 2iP	3 lub 6	SCHUM i współaut. 1993
<i>Allium porrum</i>	ZHU i WU (1979)	2 mg/l 2,4-D	8	HOSEMANS i BOSSOUTROT 1983
<i>Beta vulgaris</i>	N6	2.85 $\mu$ M IAA + 0.94 $\mu$ M KIN lub 0.88 $\mu$ M BAP	6	FERRANT i BOUHARMONT 1994
<i>Cucurbita pepo</i>	MS	1 lub 5 mg/l 2,4-D	3	METWALLY i współaut. 1998
<i>Gerbera jamesonii</i>	MS	0.5 mg/l IAA + 2 mg/l BA + 2 mg/l KIN	4.5	CAGNET-SITBON 1981
	MS	0.05 mg/l IAA + 0.3 mg/l BA + 0.1 mg/l GA <sub>3</sub>	2	MEYNET i SIBI 1984
<i>Helianthus annuus</i>	MS	0.1 mg/l IAA + 0.2 mg/l BA	1	AHMIM i VIETH 1986
	N6	0.5-2 mg/l MCPA	6	YAN i współaut. 1985, YANG i współaut. 1986
<i>Hordeum vulgare</i>	MS	2 mg/l NAA	10	GELEBART i współaut. 1987
	Miller	2 mg/l 2,4-D	10	SAN NOEUM 1976, 1979
	N6	0.5 mg/l 2,4-D + 1 mg/l NAA + 1 mg/l KIN	3	WANG i KUANG 1981
	N6	1-2 mg/l MCPA + 1 mg/l NAA + 0.5 mg/l KIN	3	HUANG i współaut. 1982
<i>Oryza sativa</i>	Miller	3 mg/l NAA	6	ASSELIN DE BEAUVILLE 1980
	N6	0.125 mg/l MCPA	3	ZHOU i YANG 1981
	N6	2 mg/l 2,4-D	4	KUO 1982
<i>Zea mays</i>	MS	3 mg/l 2,4-D	12	TRUONG-ANDRE i DEMARLY 1984

Użyte skróty: B5 — GAMBORG i współaut. (1968), MS — MURASHIGE i SKOOG (1962), BDS — DUNSTAN i SHORT (1977), N6 — Chu (1978, cyt. wg GAMBORG i PHILLIPS 1995), Miller — MILLER (1963); BAP(BA) — 6-benzylaminopuryna benzyladenina), GA<sub>3</sub> — kwas gibberelinowy, IAA — kwas  $\beta$ -indoliloctowy, KIN — 6-furfurylaminopuryna [kinetyna], NAA — kwas  $\alpha$ -naftelenoocowy, MCPA — kwas 2-metylo-4-chlorofenoksyocowy, 2iP — 2-izopentyladenina, 2,4-D — kwas 2,4-dwuchlorofenoksyocowy.

wanego agaru, znacznie zwiększyło indukcję rozwoju zarodków gynogenicznych u cebuli (JAKSE i współaut. 1996). Zarodki te były jednak silnie uwodnione, co było przyczyną uzyskania stosunkowo małej liczby regenerantów. Rezultaty tych badań sugerują, że agar może być czynnikiem ograniczającym indukcję gynoge-

nezy. Wydaje się, że dalsze eksperymenty powinny koncentrować się na doborze takich środków żelujących, które miałyby pozytywny wpływ na frekwencję indukcji, a jednocześnie nie powodowały niepożądanego uwodnienia tkanek.

#### STADIUM ROZWOJOWE WORECZKA ZALAŻKOWEGO

Badania nad różnymi gatunkami Angiospermae wskazują, że stadium rozwojowe gametofitu żeńskiego jest bardzo istotnym czynnikiem warunkującym indukcję i przebieg gynogenezy. U większości testowanych gatunków lepsze rezultaty uzyskiwano na ogół w przypadku starszych stadiów rozwojowych megagametofitu. Dojrzały woreczek zalażkowy był stadium optymalnym do indukcji gynogenezy u *Zea mays* (TRUONG-ANDRE i DEMARLY 1984), *Beta vulgaris* (HOSEMANS i BOSSOUTROT 1983, FERRANT i BOUHARMONT 1994), *Helianthus annuus* (YANG i współaut. 1986, GELEBART i SAN 1987). W przypadku *Hordeum vulgare* haploidalne zarodki uzyskiwano wprawdzie w kulturze zalażni zawierających gametofity w różnych stadiach rozwojowych (od 1-jądrowego woreczka zalażkowego do stadium dojrzałego woreczka), jednak najwyższą frekwencję odnotowano kiedy zalażki w momencie inokulacji zawierały dojrzałe lub 8-jądrowe woreczki zalażkowe (HUANG i współaut. 1982, CASTILLO i CISTUE 1993). U *Oryza sativa* obserwowano rozwój haploidalnych roślin nawet bezpośrednio z megaspory (ASSELIN de BEAUVILLE 1980), jednak lepsze rezultaty przyniosła kultura starszych zalażni ryżu (KUO 1982, ZHOU i YANG 1981, RONGBAI i współaut. 1998). Również u *Allium cepa* indukcja gynogenezy możliwa jest w różnych stadiach rozwojowych gametofitu żeńskiego (od woreczka 2-jądrowego do dojrzałego) (MUSIAL i współaut. 1999, 2000). W tym przypadku jednak, przeciwnie niż u ryżu, stadia młodsze wydają się być bardziej podatne, co potwierdza wcześniejsze

obserwacje MURENA (1989). Autor ten zauważył mianowicie, iż najwyższa frekwencja gynogenicznych zarodków występowała w zalażniach izolowanych trzy do pięciu dni przed pyleniem, kiedy to, jak wiadomo z badań GUHA i JOHRI (1966), w zalażkach obecne są komórki macierzyste megaspor.

U niektórych gatunków gynogeniczne zarodki mogą rozwijać się wprost z megaspory, np. u *Lilium davidii* (GU i CHENG 1983), *Nicotiana tabacum* (WU i CHENG 1982 a,b). W przypadku tytoniu indukcja gynogenezy następowała jednak także w stadium dojrzałego woreczka zalażkowego. Interesujące wyniki przyniosły ostatnio opublikowane badania nad rozwojem niezapłodnionych zalażków tytoniu w kulturze *in vitro*. LOBANOVA i ENALEEVA (1998) wykazały, że po inokulacji zalażni w stadium komórki macierzystej megaspor, w kulturze może zachodzić proces megasporogenezy oraz rozwój woreczka zalażkowego. Również u *Melandrium album* obserwowano w warunkach *in vitro* formowanie się megaspor i rozwój gametofitów żeńskich w zalażkach, które w momencie inokulacji zawierały komórki archesporialne bądź megasporocyty (MÓL 1993). W świetle tych badań doniesienia o rozwoju gynogenicznych zarodków bezpośrednio z megaspory wymagają dalszych studiów. Nie można bowiem wykluczyć, że również i w tych przypadkach w bardzo młodych zalażkach umieszczonych na pożywce najpierw następuje dalszy rozwój gametofitu żeńskiego, a dopiero później indukcja gynogenezy.

#### WARUNKI KULTURY

Gynogeniczne rośliny uzyskuje się na drodze kultur jednostopniowych (na tej samej pożywce zachodzi indukcja rozwoju oraz regeneracja siewek) lub dwustopniowych (po stymulacji rozwoju haploidalnych zarodków lub tkanki kalusowej na medium indukcyjnym, konieczne jest ich przeniesienie na medium regeneracyjne). Zwykle kultury prowadzone są w temperaturze 22–28°C w ciemności lub na świetle. Optymalne warunki prowadzenia kultury ustala-

ne są eksperymentalnie dla poszczególnych gatunków. YANG i ZHOU (1982) wskazują, że w kulturach zalażni i zalażków u większości gatunków wstępne działanie na eksplantat niską temperaturą jest nieefektywne. U *Cucurbita pepo* w kulturze zalażni izolowanych z pąków kwiatowych poddanych działaniu 4°C obserwowano tłumienie procesu embriogenezy (METWALLY i współaut. 1998). U *Allium cepa* działanie na zalażnie zarówno niską (5°C), jak i wyso-

ką (40°C) temperaturą nie wpływało w istotny sposób na efektywność gynogenezy (MUREN 1989). Jednakże u niektórych gatunków, takich jak np. ryż (RONGBAI i współaut. 1998), burak (LUX i współaut. 1990), *Triticum turgidum*

subsp. *durum* (MDARHRI-ALAOUI 1998), wstępne traktowanie eksplantatu niską temperaturą miało pozytywny wpływ na indukcję gynogenezy.

#### RODZAJ EKSPALANTATU

Wydajność procesu gynogenezy w dużym stopniu zależy od rodzaju użytego eksplantatu. U *Allium cepa* indukcję rozwoju gynogenicznych roślin można uzyskać stosując jako eksplantaty zarówno zalążki, zalążnie, jak i całe paki kwiatowe. Wydajność procesu była nieco wyższa w kulturze zalążni niż w przypadku kultury zalążków i porównywalna z efektywnością kultury paków kwiatowych (CAMPION i współaut. 1992, BOHANEK i współaut. 1995). Podobne rezultaty uzyskano w przypadku cebuli szalotki (COHAT 1994). W przeciwieństwie do *Allium cepa*, u *Beta vulgaris* i *Gerbera jamesonii* w kulturze zalążni nie udało się indukować gynogenezy, natomiast z powodzeniem prowadzi się kultury zalążków

(HOSEMANS i BOSSOUTROT 1983, CAGNET-SITBON 1981). U *Hordeum vulgare* lepsze rezultaty uzyskano w kulturze kwiatów pionowo wyszczepianych na pożywkę, niż w przypadku zalążni układanych poziomo (HUANG i współaut. 1982). Ponadto CASTILLO i CISTUÉ (1993) podkreślają, że efektywniejsze są kultury zalążni wraz z pylnikami. W przypadku *Oryza sativa* wyższą frekwencję indukcji haploidalnego kalusa obserwowano w kulturze wyizolowanych zalążni, jednakże podobną lub tylko nieco niższą frekwencję odnotowano gdy eksplantatem były zalążnie z częściowo pozostawionym okwiatem (RONGBAI i współaut. 1998).

#### WIEK ORAZ WARUNKI WZROSTU ROŚLINY MATECZNEJ

Dotychczas nieliczne badania dotyczyły określenia wpływu wieku rośliny donorowej na proces gynogenezy. Na przykładzie *Gerbera jamesonii* wykazano, że wiek rośliny jest bardzo ważnym czynnikiem wpływającym zarówno na wydajność formowania kalusa jak i na jego zdolności morfogenetyczne. Uzyskiwano większą frekwencję indukcji kalusa gdy eksplantaty pobierano jesienią, jednakże tkanka kalusowa powstająca w kulturach zalążni izolowanych wiosną, odznaczała się wyższym potencjałem morfogenetycznym (CAPPADOCIA i współaut. 1988). Również u gerbery TOSCA i współaut. (1999) wykazali związek między genotypem i porą roku a wydajnością gynogenezy. Spośród czterech badanych genotypów, u dwóch obser-

wowano wysoką frekwencję indukcji kalusa wiosną, u jednego jesienią, a w przypadku czwartego genotypu pora okresu wegetacyjnego nie wpływała zasadniczo na wydajność gynogenezy.

Czynnikiem wpływającym w istotny sposób na proces gynogenezy może być także temperatura w jakiej uprawiane są rośliny donorowe. PUDDEPHAT i współaut. (1999) obserwowali u *Allium cepa*, że wydajność gynogenezy wynosiła ok. 4% u roślin donorowych uprawianych w temperaturze 15°C, podczas gdy u roślin rosnących w temperaturze 10°C tylko 0.31% i była porównywalna z wydajnością u roślin, które rosły w warunkach szklarniowych (0.35%).

#### EMBRIOLOGIA GYNOGENEZY

Gynogeniczne rośliny mogą rozwijać się drogą bezpośredniej embriogenezy lub pośrednio poprzez wcześniejszą fazę tworzenia tkanki kalusowej. W przypadku embriogenezy bezpośredniej możliwy jest rozwój zarodka z niezaplodnionej komórki jajowej (partenogeneza) lub innych elementów woreczka zalążkowego (apogamia). Partenogenezę opisano u *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica* (WU i CHENG 1982a), *Hordeum vulgare* (HUANG i współaut. 1982), *Helianthus annuus* (YANG i współaut. 1986),

*Astragalus cicer*, *Baptisia australis* (PONITKA i ŚLUSARKIEWICZ-JARZINA 1987), *Lavandula* sp. (BUGARA 1988), *Salvia sclarea* (BUGARA i RUSINA 1989), *Allium tuberosum* (TIAN i YANG 1989), *Melandrium album* (MÓL 1992), *Beta vulgaris* (FERRANT i BOUHARMONT 1994, GOŚKA 2000) i *Allium cepa* (MUSIAŁ i współaut. 2000).

Apogamiczny rozwój zarodków z synergid stwierdzono u ryżu, tytoniu i kolendry (TIAN i YANG 1983, ZHOU i współaut. 1986, WU i CHENG 1982b, BUGARA 1988) oraz u *Beta vulgaris* (GOŚ-

KA i JASSEM 1988, GOŚKA 2000). U jęczmienia, tytoniu i *Allium tuberosum* zarodki mogły powstawać również z antypod (HUANG i współaut. 1982, WU i CHENG 1982, TIAN i YANG 1989).

Interesującą kwestią związaną z kulturą *in vitro* niezaplodnionych zalażni i zalażków jest rozwój bielma. U szeregu gatunków zaobserwowano rozwój autonomicznej endospermy, np. u *Gossypium hirsutum* (JENSEN i współaut. 1977), *Oryza sativa* (ZHOU i YANG 1981), *Hordeum vulgare* (HUANG i współaut. 1982), *Helianthus annuus* (YANG i współaut. 1986), *Melandrium album*, *Lupinus luteus* i *Helleborus niger* (MÓL i współaut. 1995), *Brassica napus* (CHMIELOWIEC i współaut. 1997, KUTA i współaut. 1997), *Viola odorata* (WIJOWSKA i współaut. 1998, 1999 a,b), *Viola riviniana*, *V. silvestris* i *V. tricolor* (WIJOWSKA i KUTA 2000), *Allium cepa* (MUSIAL i współ-

aut. 1999, 2000), *Lycopersicon esculentum* (ADAMOWICZ i współaut. 2000). Należy podkreślić, że z reguły tylko jedna struktura (albo zarodek albo endosperma) rozwijała się w danym woreczku zalażkowym. Tylko w przypadku *Allium cepa* sporadycznie występowały woreczki zalażkowe, w których gynogenicznym zarodkom towarzyszył rozwój autonomicznej endospermy (MUSIAL i współaut. 2000). Warto także zwrócić w tym miejscu uwagę, że u kilku z wymienionych wyżej gatunków, u których rozwijała się autonomiczna endosperma, nie udało się jak dotychczas indukować gynogenezy (por. Tabela 1).

Szersze omówienie embriologicznych aspektów gynogenezy u roślin zawiera praca MÓLA (1999).

#### STATUS KARIOLOGICZNY GYNOGENICZNYCH ROŚLIN

Rośliny powstałe na drodze gynogenezy mogą być haploidami, dihaploidami, a także mogą być miksoploidalne. Spontaniczne podwojenie liczby chromosomów zachodzi najczęściej wtedy, gdy rozwój odbywa się poprzez tworzenie tkanki kalusowej. Również w fazie kalusa mogą zachodzić procesy prowadzące do powstania miksoploidalności, co jest zjawiskiem niepożądanym ze względu na chimeryczny charakter rozwijających się roślin.

Oceny stopnia ploidalności uzyskanych roślin można dokonać na podstawie ustalenia liczby chromosomów w komórkach merystematycznych, aczkolwiek metoda ta nie zawsze jest pewna. Niekiedy gynogeniczne rośliny w komórkach stożka wzrostu pędu posiadają haploidalną liczbę chromosomów, podczas gdy w merystemach korzeniowych stwierdza się liczby diploidalne, poliploidalne lub stożki wzrostu mogą być miksoploidalne. Takie różnice w stopniu ploidalności — obserwowane np. u *Beta vulgaris* (VAN GEYT i współaut. 1987) i *Allium cepa* (CAMPION i współaut. 1955) — mogą być spowodowane różnymi czynnikami, np. bezpośrednim oddziaływaniem pożywki na stożek wzrostu korzenia, wysokim stężeniem regulatorów wzrostu czy długim czasem kultury.

W ostatnich latach do oceny stopnia ploidalności roślin stosuje się pomiar zawartości DNA w jądrach komórkowych przy użyciu cytofotometru przepływowego. Ploidalność można usta-

lić także metodami pośrednimi w oparciu o cechy morfologiczne i anatomiczne skorelowane ze stopniem ploidalności. Są to głównie takie cechy jak: wielkość rośliny, długość aparatów szparkowych i/lub liczba chloroplastów w komórkach szparkowych.

Najbardziej pożądanym efektem dla hodowcy jest uzyskanie dihaploidów, jednakże spontaniczne podwojenie liczby chromosomów w warunkach *in vitro* zachodzi stosunkowo rzadko, a częstotliwość występowania tego procesu zależy m.in. od gatunku i składu pożywki. Dla buraka, cebuli i gerbery w celu indukcji dihaploidów opracowano wydajne metody podwajania liczby chromosomów roślin gynogenicznych poprzez dodanie kolchicyny do pożywki (RAGOT i STEEN 1992; HANSEN i współaut. 1994, 1995; CAMPION i współaut. 1995; MIYOSHI i ASAKURA 1996). W każdym przypadku stężenie kolchicyny i czas działania ustalany był eksperymentalnie.

Uzyskane rośliny diploidalne każdorazowo muszą być sprawdzone, aby stwierdzić czy mamy do czynienia rzeczywiście z podwojonymi haploidami (dihaploidy), czy też są to osobniki powstałe z tkanek somatycznych. W tym celu stosuje się markery izoenzymatyczne lub molekularne (RAPD) (BOHANEK i współaut. 1995, JAKSE i współaut. 1996, JAVORNIK i współaut. 1998, BOHANEK i JAKSE 1999).

## GYNOGENESIS IN PLANTS

## Summary

A critical review is given on gynogenesis in plants induced by *in vitro* culture of unpollinated female reproductive organs. The culture of unfertilized ovules, ovaries or flower buds has successfully been used to produce haploid plants in several angiosperms including important crop plants, e.g. rice, onion, sugarbeet, barley, and sunflower. Attention is paid to the analysis of factors affecting the process of gynogenesis as well as embryological and cytological observations. Induction of haploid development depends on several factors: genotype of donor plants, stage of megagametophyte development, composition of nutrient media and culture conditions. Embryological studies have revealed that different component cells of a female gameto-

phyte: egg cells (parthenogenesis), synergids and antipodals (apogamy) can be triggered *in vitro* to sporophytic development. For most of the cases investigated so far, parthenogenesis is the source of gynogenic plants. The gynogenic embryos develop *via* either direct embryogenesis or callus formation followed by regeneration of plantlets. Chromosome counting of root tip cells or flow cytometry of leaf tissue were used for determining the ploidy level of plants produced. These studies have shown that most of gynogenic plants are haploids. In addition, a low number of dihaploids have also been produced in some species as demonstrated by biochemical (isozyme) and molecular (random amplified polymorphic DNA) analyses.

## LITERATURA

- ADAMOWICZ E., KUTA E., PRZYWARA L., 2000. *Embryological analysis of unfertilized ovules of tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) cultured in vitro*. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 42 (Suppl. 1), 34.
- AHMIN M., VIETH J., 1986. *Production de plantes haploïdes de Gerbera jamesonii par culture in vitro d'ovules*. Can. J. Bot. 64, 2355-2357.
- AO G. M., ZHAO S. X., LI G. H., 1982. *In vitro induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of corn (Zea mays L.)*. Acta Gen. Sin. 9, 281-283.
- ASSELIN DE BEAUVILLE M., 1980. *Obtention d'haploïdes in vitro à partir d'ovaires non fécondés de riz, Oryza sativa L.* Compt. Rend. Acad. Sci. Paris. Ser. D 290, 489-492.
- BAJAJ Y. P. S., 1990. *In vitro production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding*. [W:] *Biotechnology in Agriculture and Forestry. 12: Haploids in Crop Improvement I*. BAJAJ Y. P. S. (red.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 3-43.
- BARAŃSKI R., 1996a. *Proces gynogenezy*. [W:] *Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin*. MICHALIK B. (red.). Drukrol S. C., Kraków, 60-66.
- BARAŃSKI R., 1996b. *In vitro gynogenesis in red beet (Beta vulgaris L.): effects of ovule culture conditions*. Acta Soc. Bot. Pol. 65, 57-60.
- BOHANEK B., 1994. *Induction of gynogenesis in agricultural crops: a review*. Proc. IPBA, Rogla, 43-55.
- BOHANEK B., JAKSE M., 1999. *Variations in gynogenic response among long-day onion (Allium cepa L.) accessions*. Plant Cell Rep. 18, 737-742.
- BOHANEK B., JAKSE M., JAVORNIK B., 1995. *Studies of gynogenesis in onion (Allium cepa L.): induction procedure and genetic analysis of regenerants*. Plant Sci. 104, 215-224.
- BUGARA A. M., 1988. *Induction ways for sporophytic development in the culture of reproductive cells of flowering plants*. Proc. Int. Conf. Biol. Cult. Cells Biotech. Novosibirsk, USSR. 225.
- BUGARA A. M., RUSINA L. V., 1989. *Haploid callus formation in the culture of unfertilized ovules of clary sage*. Fiziol. Biokh. Kult. Rast. 20, 554-560.
- CAGNET-SITBON M., 1981. *Production of haploid Gerbera jamesonii plants by in vitro culture of unfertilised ovules*. Agronomie 1, 807-817.
- CAMPION B., ALONI C., 1990. *Induction of haploid plants in onion (Allium cepa L.) by in vitro culture of unpollinated ovules*. Plant Cell, Tissue and Org. Cult. 20, 1-6.
- CAMPION B., AZZOMONTI M.T., VICINI E., SCHIAVI M., FALAVIGNA A., 1992. *Advances in haploid plant induction in onion (Allium cepa L.) through in vitro gynogenesis*. Plant Sci. 86, 97-104.
- CAMPION B., PERRI E., AZZOMONTI M. T., VICINI E., SCHIAVI M., 1995. *Spontaneous and induced chromosome doubling in gynogenic lines of onion (Allium cepa L.)*. Plant Breed. 114, 243-246.
- CAPPADOCIA M., CHRETIEN L., LAUBLIN G., 1988. *Production of haploids in Gerbera jamesonii via ovule culture: influence of fall versus spring sampling on callus formation and shoot regeneration*. Can. J. Bot. 66, 1107-1110.
- CASTILLO A. M., CISTUÉ L., 1993. *Production of gynogenic haploids of Hordeum vulgare L.* Plant Cell Rep. 12, 139-143.
- CHMIELOWIEC M., KUTA E., PRZYWARA L., RÓG L., 1997. *An attempt to induce gynogenesis in Brassica napus L.* Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. et Zool. 39 (Suppl. 1), 49.
- COHAT J., 1994. *Obtention chez l'échalote (Allium cepa L. var. aggregatum) de plantes haploïdes gynogénétiques par culture in vitro de boutons floraux*. Agronomie 14, 299-304.
- DE VAULX R. D., CHAM BONNET D., 1986. *Obtention of embryos and plants from in vitro culture unfertilised ovules of Cucurbita pepo*. [W:] *Genetic manipulation in plant breeding*. HORN W., JENSEN C. J., ODENBACH W., SCHIEDER O. (red.), Walter de Gruyter Berlin, 95-97.
- DE VERNA J. W., COLLINS G. B., 1984. *Maternal haploids of Petunia axillaris via culture of placenta attached ovules*. Theor. Appl. Gen. 69, 187-192.
- DUNSTAN D., I., SHORT K. C., 1977. *Improved growth of tissue cultures of onion, Allium cepa*. Physiol. Plant. 41, 70-72.
- DUNWELL J., M., 1986. *Pollen, ovule and embryo culture as tools in plant breeding*. [W:] *Plant Tissue Culture and its Agricultural Application*. ALDERSON P., G., WITHERS L., A. (red.), Butterworths, Guildford, UK, 375-404.
- FERRANT V., BOUHARMONT J., 1994. *Origin of gynogenic embryos of Beta vulgaris L.* Sex. Plant Rep. 7, 12-16.
- FERRIE A. M. R., PALMER C. E., KELLER W. A., 1995. *Haploid embryogenesis* [W:] *In vitro Embryogenesis in Plants*. THORPE T. A. (red.). Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, 309-344.
- FONTANEL A., SERRAT I., PETIAND V., 1994. *Regeneration of Gingko biloba: induction of embryogenesis from megagametophyte according to development stage*. Compt. Rend. Acad. Sci. Ser. III 317, 149-155.
- GAMBORG O., MILLER R., OJIMA K., 1968. *Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells*. Exp. Cell Res. 150, 151-158.
- GAMBORG O., L., PHILLIPS G., C. (red.), 1995. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental Methods*.



- Springer Lab Manual. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- GELEBART P., SAN L.H., 1987. *Obtention de plantes haploïdes par culture in vitro d'ovaires et d'ovules non fécondés de tournesol (Helianthus annuus L.)*. Agronomie 7, 81–86.
- GEOFFRIAU E., KAHANE R., RANCILLAC M., 1997. *Variation of gynogenesis ability in onion (Allium cepa L.)*. Euphytica 94, 37–44.
- GOŠKA M., 2000. *Embryogenesis in unpollinated ovules of sugar beet (Beta vulgaris L.)*. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 42 (Suppl. 1), 22.
- GOŠKA M., JASSEM B., 1988. *Histological observations of sugar-beet ovules in in vitro cultures*. Bull. Pol. Acad. Sci. Biol. Sci. 36, 171–175.
- GÓRALSKI G., MATTHYS-ROCHON E., VERGNE P., PRZYWARA L., 1999. *Androgenetic development: a fascinating embryo formation process*. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 41, 51–65.
- GU Z. P., CHENG K. C., 1983. *In vitro induction of haploid plantlets from unpollinated young ovaries of lily and its embryological observations*. Acta Bot. Sin. 25, 24–28.
- GUHA S., JOHRI B. M., 1966. *In vitro development of ovary and ovule of Allium cepa L.* Phytomorphology 16, 353–364.
- HANSEN A. L., PLEVER C., PEDERSEN H. C., KEIMER B., ANDERSEN S. B., 1994. *Efficient in vitro chromosome doubling during Beta vulgaris ovule culture*. Plant Breed. 112, 89–95.
- HANSEN A. L., GERTZ A., JOERSBO M., ANDERSEN S. B., 1995. *Short-duration colchicine treatment for in vitro chromosome doubling during ovule culture of Beta vulgaris L.* Plant Breed. 114, 515–519.
- HOSEMANS D., BOSSOUTROT D., 1983. *Induction of haploid plants from in vitro culture of unpollinated beet ovules (Beta vulgaris L.)*. Z. Pflanzenzücht. 91, 74–77.
- HUANG Q. F., YANG H. Y., ZHOU C., 1982. *Embryological observations on ovary culture of unpollinated young flowers of Hordeum vulgare*. Acta Bot. Sin. 24, 295–300.
- JAKSE M., BOHANEK B., IHAN A., 1996. *Effect of media components on the gynogenic regeneration of onion (Allium cepa L.) cultivars and analysis of regenerants*. Plant Cell Rep. 15, 934–938.
- JAVORNIK B., BOHANEK B., CAMPION B. 1998. *Second cycle gynogenesis in onion, Allium cepa L., and genetic analysis of the plants*. Plant Breed. 117, 275–278.
- JENSEN C. J., 1986. *Haploid induction and production in crop plants*. [W:] Genetic Manipulation in Plant Breeding. HORN W., JENSEN C. J., ODENBACH W., SCHRIEDER O. (red.). Walter de Gruyter & Co., Berlin New York, 231–256.
- JENSEN W. A., SCHULZ P., ASHTON M. E., 1977. *An ultrastructural study of early endosperm development and synergid changes in unfertilized cotton ovules*. Planta 133, 179–189.
- KASHIN A.S., BLYUDNEVA E. A., SILKIN M. A., 2000. *Megagamete activation and regulation of in vitro embryogenesis in unpollinated millet ovaries*. Russ. J. Plant Physiol. 47, 260–269.
- KELLER J., 1990. *Culture of unpollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of genus Allium and haploid induction via gynogenesis in onion (Allium cepa L.)*. Euphytica 47, 241–247.
- KRANZ E., DRESSELHAUS T., 1996. *In vitro fertilization with isolated higher plant gametes*. Trends in Plant Sci. 1, 82–89.
- KRANZ E., VON WIEGEN P., LÖRZH., 1995. *Early cytological events after induction of cell division in egg cells and zygote development following in vitro fertilization with angiosperm gametes*. Plant J. 8, 9–23.
- KUNITAKE H., NAKASHIMA T., MORI K., TANAKA M., 1998. *Somacloonal and chromosomal effects of genotype, ploidy and culture duration in Asparagus officinalis L.* Euphytica 102, 309–316.
- KUO C., 1982. *The preliminary studies on culture of unfertilized ovary of rice in vitro*. Acta Bot. Sin. 24, 33–37.
- KUTA E., PRZYWARA L., RÓG L., CHMIELOWIEC M., 1997. *Induction of autonomous endosperm in in vitro culture of unpollinated ovules of Brassica napus L.* Abstr. VIII Conf. of Plant Embryologists, 16–18 Sept. 1997, Gdańsk, 56.
- LOBANOVA L., ENALEEVA N., 1998. *The development of embryo sacs in in vitro ovaries of Nicotiana tabacum L.* Plant Sci. 132, 191–202.
- LUX H., HERMANN L., WETZEL C., 1990. *Production of haploid sugar beet (Beta vulgaris L.) by culturing unpollinated ovules*. Plant Breed. 104, 177–183.
- MDARHRI-ALAOUI M., SAIDI N., CHLYAH A., CHLYAH H., 1998. *Green haploid plant formation in durum wheat through in vitro gynogenesis*. Compt. Rend. Acad. Sci. Ser. III 321, 25–30.
- METWALLY E. I., MOUSTAFA S. A., EL-SAWY B. I., HAROUN S. A., SHALBY T. A., 1998. *Production of haploid plants from in vitro culture of unpollinated ovules of Cucurbita pepo*. Plant Cell, Tissue Org. Cult. 52, 117–121.
- MEYNET J., SIBI M., 1984. *Haploid plants from in vitro culture of unfertilized ovules in Gerbera jamesonii*. Z. Pflanzenzücht. 93, 78–85.
- MICHALIK B., ADAMUS A., NOWAK E., 2000. *Gynogenesis in Polish onion cultivars*. J. Plant Physiol. 156, 211–216.
- MILLER C. O., 1963. *Kinetin and kinetin-like compounds*. [W:] Moderne Methoden der Pflanzenanalyse 6. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 194–202.
- MIYOSHI K., ASAKURA N., 1996. *Callus induction, regeneration of haploid plants and chromosome doubling in ovule culture of pot gerbera (Gerbera jamesonii)*. Plant Cell Rep. 16, 1–5.
- MÓL R., 1992. *In vitro gynogenesis in Melandrium album: from parthenogenetic embryos to mixoploid plants*. Plant Sci. 81, 261–269.
- MÓL R., 1993. *Embryo sac development during the culture of placenta attached ovules of Melandrium album*. Biol. Plant. 35, 25–30.
- MÓL R., 1999. *Embryological aspects of in vitro gynogenesis in plant organ cultures*. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 41, 67–74.
- MÓL R., BETKA A., WOJCIECHOWICZ M., 1995. *Induction of autonomous endosperm in Lupinus luteus, Helleborus niger, Melandrium album by in vitro culture of unpollinated ovaries*. Sex. Plant Rep. 8, 273–277.
- MUKHAMBETZHANOV S. K., 1997. *Culture of nonfertilized female gametophytes in vitro*. Plant Cell, Tissue Org. Cult. 48, 111–119.
- MURASHIGE J., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. 15, 473–497.
- MUREN R., 1989. *Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion*. HortScience 24, 833–834.
- MUSIAL K., BOHANEK B., PRZYWARA L., 1999. *Embryological analysis of in vitro cultured unpollinated ovules of Allium cepa L.* Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 41 (Suppl. 1), 51.
- MUSIAL K., BOHANEK B., PRZYWARA L., 2000. *Gynogenesis in onion (Allium cepa L.) – embryological study*. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 42 (Suppl. 1), 25.
- NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., 1989. *Otrzymywanie i zastosowanie haploidów*. [W:] Biotechnologia w genetyce i hodowli roślin. MAŁEPSZY S., NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., PRZYBECKI Z. (red.). PWN, Warszawa, 151–218.
- NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., 1995. *Haploidy roślin w biotechnologii*. Kosmos 44, 703–708.
- PONITKA A., ŚLUSARKIEWICZ-JARZINA A., 1987. *Induction of gynogenesis in selected plant species from the family Papilionaceae*. Gen. Pol. 28, 239–242.

- PRAKASH J., GILES K. L., 1986. *Production of doubled haploids in oriental lilies*. [W:] *Genetic Manipulation in Plant Breeding*. HORN W., JENSEN C. J., ODENBACH W., SCHRIEDER O. (red.). Walter de Gruyter & Co., Berlin New York, 335–337.
- PUDDEPHAT I. J., ROBINSON H. T., SMITH B. M., LYNN J., 1999. *Influence of stock plant pretreatment on gynogenic embryo induction from flower buds of onion*. *Plant Cell, Tissue Org. Cult.* 57, 145–148.
- RAGOT M., STEEN P. 1992. *Genetic and environmental effects on chromosome doubling of sugarbeet (Beta vulgaris L.) haploids*. *Euphytica* 63, 233–237.
- RIEGER R., MICHAELIS A., GREEN M. M., 1974. *Słownik terminów genetycznych*. PWRiL, Warszawa.
- RONGOBAI L., PANDEY M. P., GARG G. K., PANDEY S. K., DWIVEDI D. K., ASHIMA. 1998. *Development of a technique for in vitro unipollinated ovary culture in rice, Oryza sativa L.* 1998. *Euphytica* 104, 159–166.
- ROUGIER M., ANTOINE A. F., ALDON D., DUMAS C., 1996. *New lights in early steps of in vitro fertilization in plants*. *Sex. Plant Rep.* 9, 324–329.
- SAN NOEUM L. H., 1976. *Haploides d'Hordeum vulgare L. par culture in vitro non fécondés*. *Ann. Amélior. Plant.* 26, 751–754.
- SAN NOEUM L. H., 1979. *In vitro induction of gynogenesis in higher plants*. *Proc. Conf. on Broad. Gen. Base of Crops*. Pudoc Wageningen. 327–329.
- SCHUM A., MATTIESCH L., TIMMANN E. M., HOFMANN K., 1993. *Regeneration of dihaploids via gynogenesis in Allium porrum L.* *Gartenbauwissenschaft* 58, 227–232.
- SITA G. L., RAVINDRAN A., 1991. *Gynogenic plants from ovary culture of mulberry (Morus indica)*. [W:] *Horticulture – New Technologies and Applications*. PRAKASH J., PIERIK R. L. M. (red.). Proc. Int. Semin. New Frontiers in Horticulture, Bangalore, India. Kluwer Acad. Publ. 225–229.
- SMITH B. M., GODWIN R. M., HARVEY E., WERNER C. P., 1991. *Gynogenesis from whole flower buds in bulb onions (Allium cepa L.) and leeks (Allium porrum L.)*. *J. Gen. Breed.* 45, 353–358.
- TAO Z. R., LIU M. S., ZHU Z. C., 1988. *Induction of dihaploid plantlets from unipollinated ovaries of potato in vitro*. *Acta Gen. Sin.* 5, 329–334.
- THOMAS T. D., BHATANGAR A. K., RAZDAN M. K., BHOJWANI S. S., 1999. *A reproducible protocol for production of gynogenetic haploids of mulberry Morus alba L.* *Euphytica* 110, 169–173.
- TIAN H. Q., YANG H. Y., 1983. *Synergid apogamy and egg cell anomalous division in cultured ovaries of Oryza sativa L.* *Acta Bot. Sin.* 25, 403–410. *unipollinated ovary culture of Allium tuberosum*. *Acta Biol. Exp. Sin.* 22, 139–147.
- TIAN H. Q., YANG H. Y., 1989. *Haploid embryogeny and plant regeneration in unipollinated ovary culture of Allium tuberosum*. *Acta Biol. Exp. Sin.* 22, 139–147.
- TOSCA A., ARCARA L., FRANGI P., 1999. *Effect of genotype and season on gynogenesis efficiency in Gerbera*. *Plant Cell, Tissue Org. Cult.* 59, 77–80.
- TROUNG-ANDRE I., DEMERLY Y., 1984. *Obtaining plants by in vitro culture of unfertilized maize ovaries (Zea mays L.) and preliminary studies on the progeny of a gynogenetic plant*. *Z. Pflanzenzücht.* 92, 309–320.
- TULECKE W., 1964. *A haploid tissue culture from the female gametophyte of Gingko biloba L.* *Nature* 203, 94–95.
- UCHIMYA H., KAMEYA A. T., TAKAHASHI N., 1971. *In vitro culture of unfertilized ovules in Solanum melongena and ovaries in Zea mays*. *Jap. J. Breed.* 21, 247–250.
- VAN GEYT J., SPECKMANN JR. G. J., DHALLUIN K., JACOBS M., 1987. *In vitro induction of haploid plants from unipollinated ovules and ovaries of the sugarbeet (Beta vulgaris L.)*. *Theor. Appl. Gen.* 73, 920–925.
- WANG C., KUANG B., 1981. *Induction of haploid plants from the female gametophyte of Hordeum vulgare L.* *Acta Bot. Sin.* 23, 22–23.
- WIJOWSKA M., KUTA E., 2000. *Eymbryological analysis of unipollinated ovaries of Viola L. cultured in vitro*. *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 42 (Suppl. 1), 31.
- WIJOWSKA M., KUTA E., PRZYWARA L., 1998. *Autonomous endosperm formation in in vitro culture of unipollinated ovules of Viola odorata L.* *Folia Morphol.* 57, 71.
- WIJOWSKA M., KUTA E., PRZYWARA L., 1999a. *Autonomous endosperm induction by in vitro culture of unfertilized ovules of Viola odorata L.* *Sex. Plant Rep.* 12, 164–170.
- WIJOWSKA M., KUTA E., PRZYWARAW L., 1999b. *In vitro culture of unfertilized ovules of Viola odorata L.* *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 41, 95–101.
- WU B. J., CHENG K. C., 1982. *Cytological and embryological studies on haploid and diploid plant production from cultured unipollinated ovaries of Nicotiana tabacum and Nicotiana rustica*. [W:] *Plant Tissue Culture*. Fujiwara A. (red.). Abe Photo Printing Co. Ltd., Tokyo, 119–120.
- WU B. J., CHENG K. C., 1982. *Cytological and embryological studies on haploid plant production from cultured unipollinated ovaries of Nicotiana tabacum L.* *Acta Bot. Sin.* 24, 125–129.
- YAN H., WU Y., CHEN N. X., WEI Z., ZHOU C., YANG H., 1985. *Microscopical observations on the embryoid formation in cultured unfertilized ovules of Helianthus annuus L.* *Acta Bot. Sin.* 27, 13–18.
- YANG H. Y., ZHOU C., 1982. *In vitro induction of haploid plants from unipollinated ovaries and ovules*. *Theor. Appl. Gen.* 63, 97–104.
- YANG H. Y., ZHOU C., 1990. *In vitro gynogenesis*. [W:] *Developments in Crop Science 19. Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*. BHOJWANI S., S. (red.). Elsevier, Amsterdam Oxford New York Tokyo, 242–258.
- YANG H. Y., ZHOU C., CAI D. T., YAN H., WU Y., CHEN X. M., 1986. *In vitro culture of unfertilized ovules in Helianthus annuus L.* [W:] *Haploids of Higher Plants In Vitro*. Hu H., YANG H. Y. (red.). Springer-Verlag, Berlin, 182–191.
- ZHU Z. C., WU H. S., 1979. *In vitro production of haploid plantlets from the unipollinated ovaries of Triticum aestivum and Nicotiana tabacum*. *Acta Gen. Sin.* 6, 181–183.
- ZHOU C., YANG H. Y., 1980. *In vitro induction of haploid plantlets from unipollinated young ovaries of Oryza sativa L.* *Acta Gen. Sin.* 7, 287–288.
- ZHOU C., YANG H. Y., 1981. *Induction of haploid rice plantlets by ovary culture*. *Plant Sci. Lett.* 20, 231–237.
- ZHOU C., YANG H. Y., TIAN H. Q., LIU Z. L., YAN H., 1986. *In vitro culture of unipollinated ovaries in Oryza sativa L.* [W:] *Haploids of Higher Plants In Vitro*. Hu H., YANG H. Y. (red.). Springer-Verlag, Berlin, 165–181.