

HAPLOIDYZACJA ROŚLIN WYŻSZYCH I JEJ ZASTOSOWANIA

THE HAPLOIDYZATION OF HIGHER PLANTS AND ITS APPLICATIONS

Jerzy Andrzej PRZYBOROWSKI

Summary. The paper presents the results obtained until the present day in higher plants haploidization. Special attention has been focused on the processes on which haploidization techniques are based. Most attention has been paid to the methods based on apomixis. In addition to this a general description of haploid induction by eliminating chromosomes from hybrid embryo and somatic tissue in vitro culture, by in vitro androgenesis have been done. Haploid induction and production methods having been described, possibilities of using haploid plants in genetics, breeding and taxonomic sciences are discussed.

Key words: haploidization, apomixis, androgenesis in vitro, gynogenesis in vitro

Dr Jerzy Andrzej Przyborowski, Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Akademia Rolniczo-Techniczna, Pl Łódzki 3, 10-724 Olsztyn

WSTĘP

Pierwsze doniesienia o otrzymaniu haploidalnych roślin pochodzą z 1921 roku i dotyczą haploidów *Datura stramonium* otrzymanych przez Bergnera [5]. W 1924 roku Clausen i Mann uzyskali haploidy *Nicotiana tabacum* [47]. Pierwszą propozycję wykorzystania haploidalnych roślin w hodowli mutacyjnej podali u *Datura stramonium* Blakeslee i Belling [6] i Blakeslee i współpracownicy [7]. Morrison [43] stwierdził przydatność haploidów do tworzenia linii czystych pomidora, zaś Sears [69] do tworzenia łańcuchów monosomicznych pszenicy. W 1941 roku po raz pierwszy zwrócono uwagę na atrakcyjność haploidów w hodowli roślin ozdobnych (*Pelargonium*) ze względu na efekt dekoracyjny kwiatów i przedłużone kwitnienie spowodowane sterylnością [35].

Melchers i Labib [41] ze względu na prostszą segregację genetyczną u haploidów wskazują na ich przydatność do izolacji różnych

kombinacji genowych. Nitsche [51] donosi o możliwości hodowli allosubstytutywnych mieszańców, zaś Kasha [32] użył haploidalnych roślin do transformacji genów z gatunku poliploidalnego do diploidalnego. W 1974 roku uzyskano mieszańce jako produkt fuzji protoplastów wyizolowanych z dwóch haploidalnych mutantów chlorofilowych *Nicotiana tabacum* [42].

Nie są to jedyne badania jakie przeprowadzono nad otrzymywaniem i zastosowaniem haploidów. Wzbudzają one powszechne zainteresowanie fizjologów, genetyków i hodowców, jednak aby móc je wykorzystać trzeba je otrzymać w zadowalającej ilości i na tym przede wszystkim skupiają się badania.

Przełom w tym zakresie nastąpił po otrzymaniu roślin haploidalnych w wyniku kultury in vitro pylników u *Datura* [24, 25] i u *Nicotiana tabacum* [9].

Obecnie liczbę gatunków, u których zaobserwowano powstawanie haploidalnego kalusa, zarodków somatycznych czy roślin, bądź to

spontanicznie, bądź wykorzystując naturalne procesy do ich indukcji, można określić na 339, w tym 252 gatunki z klasy dwuliściennych, z 36 rodzin i 87 gatunków z klasy jednoliściennych, z 6 rodzin. Najwięcej haploidalnych tkanek czy roślin zanotowano w rodzinie *Solanaceae* (u 99 gatunków) i *Gramineae* (u 72 gatunków) [47].

Techniki haploidyzacji oparte są na czterech podstawowych procesach biologicznych, do których należą:

- apomiksja,
- eliminacja chromosomów,
- androgenesa in vitro,
- gynogenesa in vitro.

Procesy prowadzące do powstawania haploidów i metody ich indukowania przedstawia schemat na str. 3 (wg. Wenzel, 1978, uzupełnione). W przypadku niektórych gatunków roślin (*Hordeum*, *Nicotiana*, *Petunia*) wszystkie procesy mogą być skutecznie wykorzystane do otrzymywania haploidów, ale dla większości gatunków, np. *Beta vulgaris*, *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, charakterystyczny jest jeden z procesów, w oparciu o który możliwe jest otrzymywanie roślin haploidalnych.

APOMIKSJA

Zarodki haploidalne rozwijają się z komórek gametofitu o zredukowanej liczbie chromosomów bez udziału zapłodnienia.

Proces apomiksji można podzielić na kilka form prowadzących do powstawania zarodków, a następnie roślin haploidalnych:

- 1) partenogeneza haploidalna,
- 2) apogamia,
- 3) semigamia,
- 4) androgenesa,
- 5) poliembryonia rzekoma.

Najczęściej wykorzystywaną formą apomiksji jest partenogeneza haploidalna, czyli rozwój zarodka z haploidalnej, nie zapłodnionej komórki jajowej. Aby rozwój komórki jajowej poszedł w kierunku tworzenia zarodka, musi być ona do takiego rozwoju zaindukowana.

Czynnikami indukującymi partenogenetyczny rozwój zarodka mogą być:

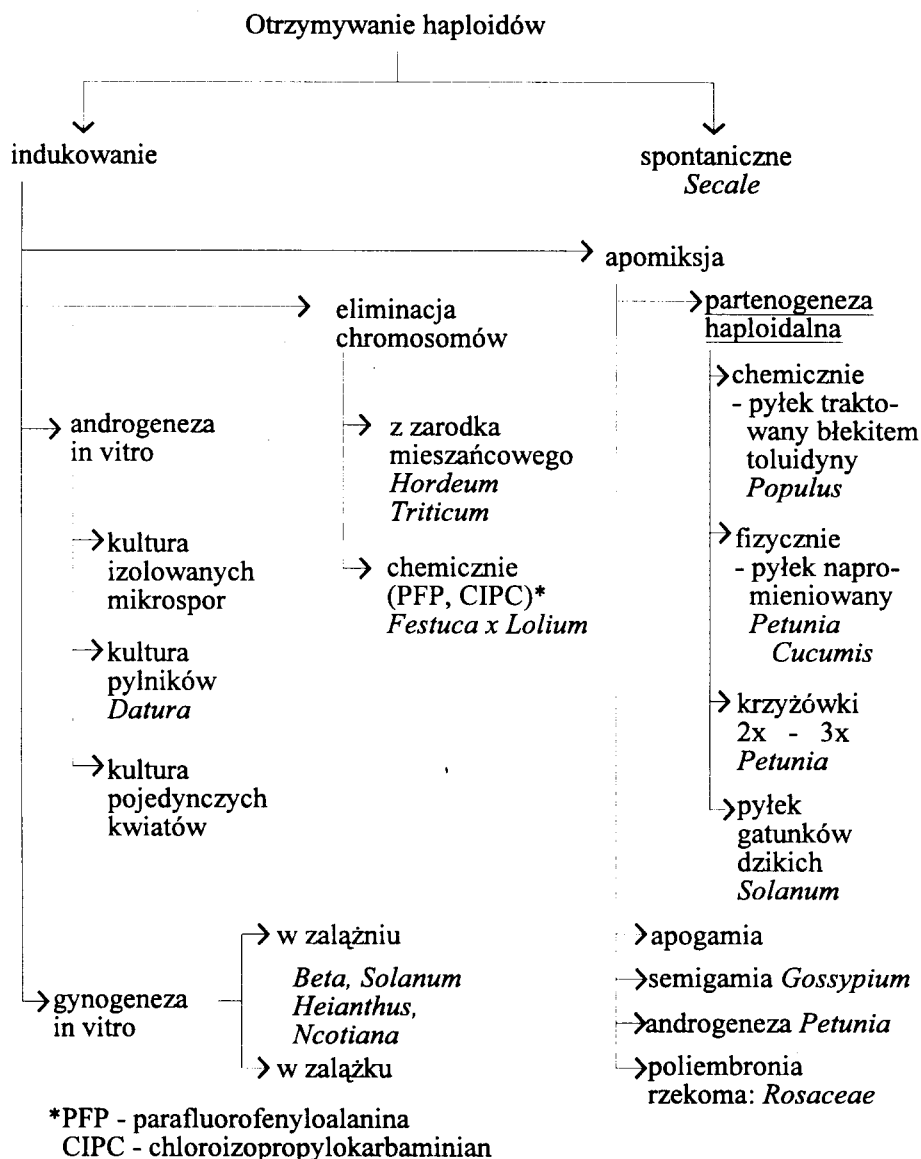
- 1) pyłek o zmienionych właściwościach, tzn. zdolny do zapylenia i penetracji woreczka zalążkowego, ale pozbawiony zdolności zapłodnienia. Może to być:
 - a) pyłek tego samego gatunku,
 - b) pyłek obcego gatunku lub rodzaju.
- 2) Pyłek innego gatunku lub rodzaju.
- 3) Pyłek tego samego rodzaju o innej ploidalności.

Czynnikiem najczęściej stosowanym jest zapylenie pyłkiem o zmienionych właściwościach przez użycie fizycznych bądź chemicznych inaktywatorów. Blakeslee i in. [5] otrzymali pierwsze rośliny haploidalne wykorzystując wpływ niskich temperatur na mejozę, zaś Müntzing [44] stosując tę samą metodę uzyskał haploidy żyta. Stwierdzono również, że czynnikiem indukującym może być wysoka temperatura [53, 58, 86]. Gay i in. [18] wskazują na możliwość użycia pyłku zmienionego przez traktowanie niską temperaturą i suszą, do indukcji rozwoju haploidalnych zarodków u *Cucurbita pepo*.

Często stosowanym inaktywatorem fizycznym jest promieniowanie jonizujące. Promienie X znalazły zastosowanie w indukcji partenogenetycznych haploidów u kukurydzy [71], zaś promienie UV u *Antirrhinum* [34]. Były to jednocześnie pierwsze gatunki, u których uzyskano haploidalne rośliny przy użyciu promieniowania jonizującego. Jednak najpowszechniej stosowanym rodzajem tego promieniowania jest promieniowanie „gamma”.

Stettler i Bawa [72] używali mieszaniny pyłku napromienionego i normalnego do indukcji partenogenezy haploidalnej u *Populus trichocarpa*, zaś Pandey i Phung [54] oraz Todua [77] użyli napromienionego pyłku do indukcji haploidów u *Nicotiana*, Banga i in. [4] u *Glicine*, Raquin [59] u *Petunia*, Śnieżko i Visser [74] u *Pirus communis*, Rode i Dumas de Vaulx [63] u *Daucus carota* oraz Luo i Wu [36] u *Brassica napus* var. *oleifera*, Dore [14] u *Brassica oleracea*. W rodzinie dyniowatych użyto promieniowania „gamma” do indukcji partenogenetycznych haploidów. Sauton i Dumas de Vaulx [65], Sauton [66, 67] otrzymali tą drogą haploidalne rośliny *Cucumis melo*, zaś Truong-Andre [80], Niemirowicz-Szczytt i Dumas de Vaulx [48],

Tabela. 1



Sauton [68], Przyborowski i in. [56, 57] u *Cucumis sativus*.

Illies [29] przeprowadził eksperymenty, których celem była indukcja partenogenezy u *Populus tremulata* przez zapylenie pyłkiem *Populus tremuloides* inaktywowanym błękitem toluidyny i otrzymał w ten sposób haploidalne rośliny. W podobny sposób otrzymano haploidy pa-

przyki, stosując jako czynnik inaktywujący podtlenek azotu [16], zaś u sorgo po zastosowaniu formaldehydu [82].

Dość często stosowanym czynnikiem indukującym rozwój partenogenetyczny zarodków jest pyłek tego samego rodzaju lub pyłek pochodzący od gatunku blisko spokrewnionego, ale o innej poliploidalności. Luo i Wu [36] użyli pył-

ku *Brassica campestris* do indukcji haploidów u *Brassica napus* var. *oleifera*, zaś Hougas i in. [28] przedstawili metodę produkcji haploidów *Solanum tuberosum* ($2n = 4x = 48$) przez zapylenie pyłkiem *Solanum phureja* ($2n = 2x = 24$). Jest to klasyczny przykład partenogenetycznego rozwoju komórki jajowej. W rodzinie dyniowatych otrzymano w podobny sposób haploidy *Cucurbita maxima* ($2n = 40$) używając pyłku *Cucurbita moschata* ($2n = 40$) [26] oraz haploidy *Cucumis melo* ($2n = 2x = 24$) przez zapylenie pyłkiem dzikiego gatunku *Cucumis ficifolius* ($2n = 4x = 48$) [17].

Rozwojowi partenogenetycznemu zarodka towarzyszą najczęściej różnego rodzaju zaburzenia, wynikiem których jest zahamowanie procesu rozwoju bielma lub w ogóle brak jego rozwoju. Niemirowicz-Szczytt i Dumas de Vaulx [49] przeprowadzili badania, których celem było określenie wpływu napromienionego pyłku na zapylenie i rozwój partenogenetyczny komórki jajowej u *Cucumis melo*. Badając wnętrze zalążków co 3 dni do 18 dnia od momentu zapylenia, w żadnym z przypadków nie stwierdzili normalnego rozwoju zarodka w porównaniu z kontrolą, a procent degenerujących struktur zarodkowych zwiększał się. Sauton i Dumas de Vaulx [65] i Sauton [68] podają, że nigdy nie zaobserwowano rozwoju haploidalnego zarodka w obecności bielma.

W takiej sytuacji zarodek niedożywiony rozwija się tylko do pewnego określonego stadium i zamiera, dalszy więc rozwój musi przejść na sztucznej pożywce aż do stadium rośliny włączone.

Apogamia to inna forma apomiksji, która polega na rozwoju zarodka z innej komórki gametofitu żeńskiego niż komórka jajowa. Dla prawidłowego rozwoju takiego zarodka również niezbędna jest obecność bielma.

Kolejną formą apomiksji jest semigamia, dzięki której otrzymano haploidy u *Gossypium herbaceum* [81]. Polega ona na tym, że jądro gamety męskiej (plemnik) wnika do cytoplazmy komórki jajowej, ale nie dochodzi do fuzji jąder. Jądra te dzielą się niezależnie i powstaje zarodek typu mozaikowatego. W wyniku takiego rozwoju powstają rośliny z sektorami tkanki ha-

ploidalnej. Z pąków powstałych z tych sektorów uzyskano haploidy.

Androgeneza ma miejsce wtedy, kiedy jądro plemnikowe po wnikięciu do cytoplazmy komórki jajowej przejmuje jej funkcje. Roślina powstająca z takiej komórki będzie wykazywała cechy rośliny ojcowskiej [60]. Proces semigamii i androgenezy występuje bardzo rzadko.

Rośliny o apomiktycznym sposobie rozmnażania wytwarzają często nasiona o dwóch zarodkach, tzw. zarodki bliźniacze. Mogą one powstać w wyniku zapłodnienia, np. komórki jajowej i rozwoju zarodka haploidalnego z synergidy. Takie dwa zarodki rosną w jednym woreczku zalążkowym. U gatunków, które wytwarzają więcej niż jeden woreczek zalążkowy w jednym ośrodku jest możliwe wystąpienie zarodków bliźniaczych, z których każdy rozwija się w odrębnym woreczku zalążkowym. Jest to poliembryonia rzekoma, która dość powszechnie obserwowana jest w rodzinie różowatych [46].

ELIMINACJA CHROMOSOMÓW

Redukcja liczby chromosomów może mieć miejsce w czasie eliminacji chromosomów zarówno z komórek zarodka mieszańcowego, jak i również z tkanki somatycznej w kulturze in vitro. Proces eliminacji chromosomów z komórek zarodków mieszańcowych *Hordeum vulgare* x *Hordeum bulbosum* został opisany przez Kasha i Kao [31]. Eliminacja chromosomów *H. bulbosum* powoduje, że zarodek w dalszych etapach rozwoju zachowuje gametyczną liczbę chromosomów. Z powodu braku bielma niezbędne jest zastosowanie kultury in vitro tych zarodków. *Hordeum bulbosum* może również posłużyć jako forma zapyłająca w eliminacji chromosomów z zarodka mieszańcowego *Triticum aestivum*, *Secale cereale* oraz gatunków *Hordeum* i ich mieszańców. Proces eliminacji chromosomów z zarodków u *H. vulgare* może być też powodowany przez inne gatunki, takie jak *H. maritimum*, *S. cereale*, *Psathyrostachys fragilis*.

Uważa się, że eliminacja chromosomów może być wynikiem nienormalności wrzeczona kariokinetycznego, asynchronii w cyklach mito-

tycznych form rodzicielskich lub zaburzeń systemu enzymatycznego [32].

Oprócz eliminacji chromosomów z zarodka mieszańcowego, można otrzymać haploidy przez eliminację chromosomów w tkance somatycznej. Można ją wywołać przez stosowanie fizycznych bądź chemicznych czynników. Przykładem czynnika fizycznego jest promieniowanie jonizujące, np. somatyczna redukcja przy pomocy promieni X u *Citrullus vulgaris* [73].

W kulturze in vitro można doprowadzić do eliminacji chromosomów z tkanki somatycznej przez dodanie do pożywki w odpowiednim stężeniu substancji takich, jak hormony, pochodne aminokwasów, herbicydy i inne. Możliwe jest otrzymanie w ten sposób haploidalnych linii komórkowych, a z nich regenerować haploidalne rośliny. Najczęściej w badaniach wykorzystywano parafluorofenylalaninę (PFP) i stwierdzono, że powoduje ona zróżnicowanie liczby chromosomów w tkance somatycznej i jej działanie może być skorelowane z częstością pojawiania się nienormalnych mitoz [50, 52].

ANDROGENEZA IN VITRO

Pierwsze dane o kulturze pylników in vitro, w wyniku której otrzymano haploidalne rośliny *Datura*, pochodzą z roku 1964 [24, 25]. Metoda ta wzbudziła powszechne zainteresowanie badaczy i do roku 1985 liczba gatunków, u których otrzymano haploidy, zarodki lub kalus wzrosła do 233 [47]. Przez te lata poznano dość dobrze proces androgenezy oraz warunki kultury. Na podstawie badań wyróżniono dwa zasadnicze typy rozwoju haploidalnego z mikrospor:

- 1) Embriogenezę bezpośrednią przez stadium wielojądrowej lub wielokomórkowej mikrospory i dalsze stadia rozwoju do stadium pędu lub rośliny.
- 2) Rozwój wielojądrowej lub wielokomórkowej mikrospory w kalus i regeneracja roślin.

W wyniku rozwoju tkanki kalusowej, a nawet zarodków bezpośrednio z mikrospor możemy otrzymać nie tylko rośliny haploidalne, ale również diploidalne lub poliploidalne oraz miksploidalne [3]. O skuteczności kultury pylni-

ków lub pyłku decyduje wiele czynników, z których najważniejsze dotyczą:

- 1) rośliny dawcy eksplantatów, a więc gatunek, ploidalność, genotyp, a także warunki wzrostu i stan fizjologiczny;
- 2) tzw. traktowania wstępnego, czyli działania różnymi czynnikami fizycznymi bądź chemicznymi na roślinę dawcę lub izolowane pylniki w celu stymulacji procesu androgenezy;
- 3) sposobu przeprowadzania kultury:
 - całe pylniki (stadium rozwojowe, położenie),
 - uwolnione mikrospory (sposób uwalniania, zagęszczenie, dymorfizm ziarna pyłku),
 - metody łączone;
- 4) warunków kultury (skład, konsystencja i wartość osmotyczna pożywki, temperatura, światło).

Warunki kultury pylników i uwolnionych mikrospor zostały omówione szczegółowo w wielu pracach przeglądowych [3, 37, 38, 83] oraz w książce pod redakcją Zenktelera [92].

Próbowano określić, czy zdolność do androgenezy in vitro dziedziczy się i czy można stymulować geny warunkujące ten proces. Jacobsen i Sopory [30] próbowali przez krzyżowanie najlepszych pod względem zdolności do androgenezy klonów *Solanum tuberosum* otrzymać rośliny o podwyższonej zdolności do androgenezy. W potomstwie otrzymali rośliny, które wykazywały dużo większą zdolność do androgenezy niż inne. Podobne próby przeprowadzono u pszenicy, gdzie stwierdzono, że zdolność do androgenezy wzrastała w kolejnych cyklach kultury pylników [55, 62] i odwrotnie, że zdolności androgeniczne były słabsze u linii otrzymanych z roślin haploidalnych niż u odmiany wyjściowej [2]. Można przypuszczać, że w czasie selekcji roślin haploidalnych i podwojonych haploidów na cechy użytkowe, usuwa się rośliny o wysokiej zdolności do androgenezy.

W rodzinie *Cucurbitaceae* otrzymanie roślin haploidalnych w wyniku kultury in vitro pylników jest trudne. Indukowano jedynie kalus lub embrioidy u *Luffa cylindrica* i *Luffa echinata*, zaś roślin haploidalnych tą metodą nie otrzymano [47].

GYNOGENEZA *in vitro*

Proces gynogenezy polega na rozwoju roślin z komórek woreczka zalążkowego lub nawet megaspor. Próby kultury zalążków lub zalążni w celu otrzymania haploidów były prowadzone od dawna, jednak rozwój tych badań zapoczątkowały udane doświadczenia z kulturą *in vitro* zalążni *Hordeum vulgare* [64]. Później w wyniku kultury *in vitro* zalążni otrzymano haploidalne rośliny *Hordeum*, *Nicotiana* i *Oryza*. Zaś w wyniku kultury *in vitro* zalążków otrzymano haploidy *Gerbera jamesoni*, *Nicotiana tabacum*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Lilium davidii*, *Beta vulgaris*, *Petunia exillaris*, *Petunia hybrida*, *Alium*, *Solanum tuberosum*, *Helianthus annuus* [8, 13, 19, 21, 22, 23, 27, 45, 59, 75, 79, 84, 87, 89, 90, 94].

Rozwój roślin haploidalnych następuje przez embrioidy lub kalus z komórek inicjalnych od tetrad megaspor do komórek woreczka zalążkowego. Obok roślin haploidalnych powstają diploidalne, a także aneuploidalne. Udział roślin haploidalnych w stosunku do wyłożonych eksplantatów nie przekracza kilku procent. Czynniki decydujące o skuteczności gynogenezy *in vitro* można by uszeregować podobnie jak w przypadku androgenezy *in vitro* i zostały dokładnie omówione przez Yanga i Zhou [89] w pracy przeglądowej.

Metoda otrzymywania haploidów w procesie gynogenezy *in vitro* może stanowić alternatywną w stosunku do innych, a dla niektórych gatunków jest dotychczas jedyną skuteczną metodą. W rodzinie *Cucurbitaceae* podjęto próbę indukcji haploidalnych gynogenicznych roślin *Cucumis sativus*, *Citrullus vulgaris* i *Cucurbita pepo* [15]. W wyniku tych prób otrzymano haploidalny kalus, ale nie udało się uzyskać regeneracji roślin.

Proces gynogenezy wydaje się być podobny do partenogenezy haploidalnej, gdyż zarówno w jednym jak i w drugim przypadku rośliny mogą powstawać poprzez indukcję rozwoju komórki jajowej. Sauton [68] donosi o indukcji gynogenezy przez zapylenie pyłkiem napromienionym u *Cucumis sativus* i *C. melo*. Jednak podany przez autorkę opis metody i rozwoju zarodka

wskazuje raczej na to, że jest to partenogeneza haploidalna indukowana zapyleniem pyłkiem napromienionym.

ZASTOSOWANIE HAPLOIDÓW

Dostępność na dużą skalę produkcyjną haploidalnych tkanek i roślin zregenerowanych z pojedynczych haploidalnych komórek decyduje o tym, że stanowią one nowe i ważne narzędzie w genetyce i hodowli roślin. Haploidy z powodzeniem zostały użyte do produkcji roślin monosomicznych, z których później utworzono serie monosomiczne. Dzięki temu możliwe było uzyskanie obszernej wiedzy o lokalizacji genów u pszenicy, jak również przeprowadzenie badań i opracowanie metodologii transferu genów z *Aegilops*, *Agropyron* i innych spokrewnionych z pszenicą gatunków [61, 70].

Przy użyciu haploidów możliwe jest zbadanie działania genów pojedynczo i w dawce podwójnej. Pozwalają one na ujawnienie genów recesywnych występujących w diploidzie w stanie heterozygotycznym. Podwojone monohaploidy znajdują również zastosowanie w bardzo precyzyjnej analizie cech ilościowych, np. u monohaploidów jęczmienia. Rośliny haploidalne można wykorzystać także do analizy genomów i pochodzenia gatunków. Podstawę takiej analizy może stanowić obserwacja chromosomów w mejozie. Zdolność do tworzenia bivalentów lub do częściowego łączenia się w pary chromosomów czy tylko pewnej ich liczby może świadczyć o autopoliploidalnym bądź allopoliploidalnym pochodzeniu gatunku wyjściowego [33].

Jednym z podstawowych utrudnień w hodowli mutacyjnej roślin wyższych jest tworzenie się chimer występujących po traktowaniu mutagenem wielokomórkowych organów, a także brak stabilności indukowanej mutacji. Problem ten może być generalnie usunięty przez zastosowanie mutagenyzy *in vitro* i regenerację roślin z jednej zmutowanej komórki. Najczęściej materiałem eksperymentalnym są tkanki somatyczne roślin diploidalnych, gdyż kultury haploidalnych tkanek i ich mutageneza jest znacznie trudniejsza. Podejmowano wiele prób, w których stosowano różnego rodzaju mutageny

(najczęściej promieniowanie jonizujące), jednak w większości rezultaty nie były pomyślne. Mimo to haploidy nadal wzbudzały zainteresowanie wśród badaczy zajmujących się hodowlą mutacyjną. W badaniach podejmowano między innymi takie problemy, jak:

- uzyskanie mutantów auktotroficznych jako markerów biochemicznych,
- uzyskanie odporności na antybiotyki – odporność na streptomycynę u tytoniu [39, 76],
- uzyskanie odporności na herbicydy i inne związki organiczne
- odporność na 5-bromodeoxyurydynę u tytoniu [40], na chlorsulfuron i sulfometuron u tytoniu [10], na chlorsulfuron u *Brassica napus* [73] oraz na hydroxy-L-prolinę u tytoniu [88].
- uzyskanie form odpornych lub tolerancyjnych na obniżone pH i zasolenie – odporność na obniżone pH i zasolenie u pszenżyta [93], tolerancja na zasolenie u tytoniu [91] oraz tolerancja na stres solny u jęczmienia [20].

Przez odpowiednie krzyżowanie haploidów z roślinami o innej ploidalności można otrzymać aneuhaploidy, np. z całą serią brakujących chromosomów. Używając takich linii badano efekt działania pojedynczego chromosomu, efekt dawki genów i lokalizację genów.

Haploidy posłużyły również jako materiał wyjściowy do izolacji i fuzji protoplastów. Początkowo były to raczej próby i teoretyczne rozważania nad możliwością wykorzystania haploidów do tego celu, jednakże z czasem osiągnięto postęp w tym zakresie. Pierwszy z nich został dokonany przez Melhers i Labib [42], którzy wyizolowali i dokonali fuzji protoplastów mezofilowych pochodzących z dwu bezchlorowych odmian *Nicotiana tabacum*. Chuong i in. [11, 12] poprzez fuzję haploidalnych protoplastów *Brassica napus* otrzymali dwa typy cybrydów:

- z cytoplazmatyczną męską sterylnością, odporne na triazyne,
- męskosterylne z wrażliwością na triazyne, zaś Toryama i in. [78] wyizolowali z zawiesiny komórkowej haploidalnego kalusa protoplasty, a z nich zregenerowali haploidalne i diploidalne rośliny ryżu.

Przydatność haploidów w hodowli roślin jest obecnie dobrze udokumentowana przez wielu autorów. Główne korzyści stosowania technik haploidyżacji to oszczędność czasu i wzrost wydajności selekcji. Skrócenie czasu hodowli odmian jest oczywiste, gdy uwzględni się możliwość uzyskiwania homozygot z heterozygotycznych rodziców w jednym pokoleniu. Posiadanie homozygot znacznie ułatwia selekcję pożądanych kombinacji genów z populacji mieszańcowych, gdyż formy te nie wykazują zjawisk dominacji i segregacji cech.

Czynnikiem ograniczającym wykorzystanie haploidów zarówno w badaniach genetycznych jak i w hodowli roślin jest wciąż mała ilość otrzymywanych haploidów i ich płodność przed lub po podwojeniu liczby chromosomów. Ważna jest również długość okresu potrzebnego do wytworzenia roślin haploidalnych, nakład pracy i poniesione koszty. Szybkie tworzenie linii homozygotycznych ma szczególne znaczenie w przypadku roślin obcopylnych, wykazujących znaczną depresję wsobną oraz roślin o długim okresie wzrostu. W przypadku wielu roślin opracowano lub opracowuje się programy hodowlane z wykorzystaniem podwojonych haploidów. Programy takie rozpoczyna się od wyboru najlepszych materiałów wyjściowych. Muszą one być jak najbardziej wartościowe, gdyż zwiększa to możliwość wystąpienia korzystnych segregacji lub rekombinacji w gametach pokolenia F₁ lub F₂.

Dysponowanie efektywną metodą produkcji podwojonych haploidów nie jest jedynym kryterium pozwalającym na zastosowanie tego systemu w analizie genetycznej czy programach hodowlanych. Z punktu widzenia praktycznej hodowli istotne znaczenie ma fakt, czy uzyskane określoną metodą linie DH są stabilne genetycznie oraz czy reprezentują one losową próbę gamet wytworzonych przez rodzicielską heterozygotę. Jedną z najlepiej opracowanych roślin pod względem otrzymywania i wykorzystania haploidów w hodowli jest jęczmień. Powstało w oparciu o ten system wiele odmian, a badania są prowadzone nadal w licznych krajach.

Tytoń należy do gatunków doskonale opracowanych pod względem metody uzyskiwania

haploidów w kulturze *in vitro*. Większość prac prowadzonych na tytoniu to modyfikacje metod lub badania genetyczne, nieliczne zaś to ocena wartości użytkowych otrzymanych haploidów i podwojonych haploidów. Ponadto programy hodowlane oparte o wykorzystanie haploidów prowadzi się dla pszenicy, ryżu, rzepaku, ziemniaka i szparaga.

Reasumując, pomimo prowadzonych od wielu lat badań, haploidyżacja jest nadal trudnym i złożonym problemem, lecz możliwości jakie niesie ze sobą skłaniają badaczy do poszukiwania nowych, skutecznych i wydajnych metod.

LITERATURA

- [1] AALDERS L. E. 1958. Monoploidy in cucumbers. *J. Hered* **49**: 41–44.
- [2] BAENZIGER P. S., SCHAEFFER G. W. 1983. Dihaploid via anthers cultured in vitro. W: L. D. OWENS (red.), *Genetic engineering: Applications to agriculture*, Beltsville Symposia in Agricultural Research VII Rowman and Allauheld, Toronto, New Jersey: 269–284.
- [3] BAJAJ Y. P. S. 1983. In vitro production of haploids. W: *Handbook of plant cell culture*, 1. *Techniques for propagation and breeding*. MacMillan Publ. Co, New York: 235–287.
- [4] BANGA S. K., BANGA S. S., SRIVASTAVA M. 1984. Induced parthenogenesis in soyabean. *Soyabean Genetics Newsletter* **11**: 45.
- [5] BLAKESLEE A. F., BELLING J., FARNHAM M. E. BERGNER A. D., 1922. A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*. *Science* **55**: 646–647.
- [6] BLAKESLEE A. F., BELLING J. 1924. Chromosomal mutations in the Jimson weed, *Datura stramonium*. *J. Hered* **15**: 195–206.
- [7] BLAKESLEE A. F., MORRISON G., AVERY A. G. 1927. Mutations in a haploid *Datura*. *J. Hered* **18**: 193–199.
- [8] Bommman Ch. 1985. Haploidisation of sugar beet (*Beta vulgaris*) via gynogenesis. *In Vitro*, **21**, 3, II, 36A.
- [9] BOURGIN J. P., NITSCH J. P. 1967. Obtention de Nicotiana haploids a partir de gametes cultives in vitro. *Ann. Physiol. Veg. (Paris)* **9**: 377–328.
- [10] CHALEFF R. S., RAY T. B., MAUVAIS C. J. 1985. Selection and characterisation of herbicide-resistant mutants in *Nicotiana tabacum*. *In Vitro*, **21**, 3, II, 62A.
- [11] CHUONG P. V., PAULUS K. P., POWELL A. D., BEVERSDORF W. D., 1986. Somatic transfer of cytoplasmic traits in *Brassica* by haploid protoplast fusion. *Crucifer Genetics Cooperative*.
- [12] CHUONG P. V., BEVERSDORF W. D., POWELL A. D., PAULUS K. P. 1988. The use of haploid protoplast fusion to combine cytoplasmic atrazine resistance and cytoplasmic male sterility in *Brassica napus*. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* **12**(2): 181–184.
- [13] DOCTRINAL M., SANGWAN R. S., Sangwan-NORREEL B. S. 1989. In vitro gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: effects of plant growth regulators, temperature, genotypes and season. *Plant Cell Tis. Org. Cult.*, **17**(1): 1–11.
- [14] DORE C. 1989. Obtaining haploid cabbage plants (*Brassica oleracea* L. subsp. *capitata*) after in vitro culture of ovules pollinated with irradiated pollen. *Compt. Rend. de l'Acad. des Scien. III Scien de la Vie*, **309**, **19**: 729–734.
- [15] DRYANOWSKA O. A. 1985. Induced callus in vitro from ovaries and anthers of species from the *Cucurbitaceae* family. *Compt. Rend. de l'Acad. Bulg. des Scien.*, **38**, **9**: 1243–1244.
- [16] Dumas de VAULX R., POCHARD E. 1974. Essai d'induction de la parthenogenese haploide par action du protoxyde d'azote sur les fleurs de piments (*Capsicum annum* L.). *Ann. Amelior. Plantes* **24**: 283–306.
- [17] Dumas de VAULX R. 1979. Obtention des plantes haploides chez le melon (*Cucumis mello* L.) apres pollinisation par *Cucumis ficifolius* A. Rich. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **289**: 875–878.
- [18] GAY G., KERHOAS C., DUMAS C. 1987. Quality of a stress-sensitive *Cucurbita pepo* L. pollen. *Planta* **171**: 82–87.
- [19] GEYT J. van, SPECKMANN G. J., D'HALLUIN K., JACOBS M., 1987. In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovules and ovaries of the sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* **73**(6): 920–925.
- [20] GLAND A. 1988. Evaluation of barley genotypes for salt stress tolerance by different haploid techniques and F₂-bulk families. W: J. P. SPRIVASTAVA, M. C. SAXENA, S. VARMA, M. J. TAHIR *Procc. of Intern. Symp. of winter cereals and food...* Ankara, Turkey 1987. **1988**: 287–291.
- [21] GOŚKA M. 1985. Sugar beet haploids obtained in the in vitro culture. *Biull. of the Polish Acad. of Scien. Biol. Scien.* **33**: 1–6.
- [22] GOŚKA M., JASSEM B. 1988. Histological observations of sugar beet ovules in in vitro culture. *Biull. of the Polish Acad. of Scien. Biol. Scien.* **36**: 7–9.
- [23] GOŚKA M., JASSEM B., JAŻDŻEWSKA E. 1990. Die Embryoentwicklung aus Samenanlagen der Zuckerrübe in *In Vitro* Kulturen. *Proc. 53 Winter Kongress, Bruxelles*: 145–154.
- [24] GUHA S., MAHESHWARI S. C. 1964. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature (Lond)*, **204**: 497.
- [25] GUHA S., MAHESHWARI S. C. 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature* **212**: 97–98.
- [26] HAYASE H. 1954. Cucurbita crosses. Occurrence of a haploid twin pair from a F₁ progeny of *C. maxima* x *C. moschata*. *Jap. J. Breed.* **4**: 55.
- [27] HOSEMANS D., BASSOUTROT D. 1983. Induction of haploid plants from in vitro culture of unpollinated beet ovules (*Beta vulgaris* L.). *Z. Pflanzenzüchtung* **91**: 74–77.
- [28] HOUGAS R. W., PELOQUIN S. J., ROSS R. W. 1958. Haploids of the common potato. *J. Hered.* **49**: 103–106.
- [29] ILLIES Z. M. 1974. Induction of haploid parthenogene-

- sis in aspen by postpollination treatment with toluidine-blue. *Silvae Genetica*, **23**: 208–226.
- [30] JACOBSEN E., SOPORY S. K. 1978. The influence and possible recombination of genotypes on the production of microspore embryoids in anther cultures of *Solanum* and dihaploids hybrids. *Theor. Appl., Genet.*, **52**: 119–123.
- [31] KASHA K. J., KAO R. N. 1970. High frequency haploid production in barley. *Nature* **225**: 874–876.
- [32] KASHA K. J. 1974. Haploids from somatic cells. W: K. J. KASHA (red.), *Haploids in higher plants. Procced.* 1. st. Inter. Symp. 67–87.
- [33] KIMBER G., RILEY R. 1963. Haploid angiospermes. *Bot. Rev.* **29**: 480–530.
- [34] KNAPP E. 1939. Haploide Pflanzen von *Antirrhinum majus*. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **57**: 371–379.
- [35] KOSTOFF D. 1941. The problem of haploidy. *Bibl. Genet.* **13**: 1–148.
- [36] LUO P., WU S. H. 1988. Application of induced parthenogenesis in rapeseed breeding. *Cruciferae Newsletter* **13**: 64–65.
- [37] MAHESHWARI S. C., TYAGI A. K., MALHOTRA K., SOPORY S. K. 1980. Induction of haploidy from pollen grains in angiosperms – the current status. *Theor. Appl., Genet.* **58**: 193–206.
- [38] MAHESHWARI S. C., RASHID A., TYAGI A. K. 1982. Haploids from pollen grains – retrospect and prospect. *Am. J. Bot.* **69**(5): 865–879.
- [39] MALIGA P., MARTON L., BREZNOWITS A. Sz. 1973. 5-Bromodeoxyuridine – resistant cell lines from haploid tobacco. *Plant Sci. Lett.* **1**: 119–121.
- [40] MALIGA P., BREZNOVITS A. Sz., MARTON L. 1973b. Streptomycin – resistant plants from callus culture of haploid tobacco. *Nature* **244**: 29–30.
- [41] MELCHERS G., LABIB G. 1970. Die Bedeutung haploider höherer Pflanzen für Pflanzenphysiologie und Pflanzenzüchtung. Durch Antherenkultur erzeugte Haploide, ein neuer Durchbruch für die Pflanzenzüchtung. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **83**: 129–150.
- [42] MELCHERS G., LABIB G. 1974. Somatic hibridisation of plants by fusion of protoplasts. I. Selection of light resistant hybrids of „haploid” light sensitive varieties of tobacco. *Molec. gen. Genet.* **135**: 277–294.
- [43] MORRISON G. 1932. The occurrence and use of haploid plants in the tomato with special reference to the variety Marglobe. *Procc. 6th Intern. Congr. Genet.* **2**: 137–139.
- [44] MÜNTZING A. 1937. Note on a haploid rye plant. *Hereditas* **23**: 401–404.
- [45] MUREN R. C. 1989. Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion. *Hort Scien.* **24**, **5**: 833–834.
- [46] NIEMIROWICZ-SZCZYTT K. 1982. Apomiksja w rodzinie różowatych. *Wiad. Bot.* **26**: 19–28.
- [47] NIEMIROWICZ-SZCZYTT K. 1989. Otrzymywanie i zastosowanie haploidów. W: MALEPSZY S., NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., PRZYBECKI, *Z Biotechnologia w genetyce i hodowli roślin*. PWN Wa-wa: 151–212.
- [48] NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., Dumas de VAULX R. 1989. Preliminary data on haploid cucumber (*Cucumis sativus* L.) induction. *Cuc. Genet. Coop.* **12**: 24–25.
- [49] NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., Dumas de VAULX R. The influence of pollen irradiation on fertilization and embryo development in *Cucumis melo* L. (w druku).
- [50] NIIZEKI M. 1977. Haploid, polyploid and aneuploid plants from cultured anthers and calluses in species of *Nicotiana* and forage crops. *J. Fact. Agr. Hokkaido Univ.* **58**: 343–466.
- [51] NITZSCHE W. 1972. Deutsches Weidelgras (*Lolium perenne* L.) aus Kreuzungen zwischen Wiesenschwingel (*Festuca pratensis* Huds.) und Welschem Weidelgras (*Lolium multiflorum* Lam.). *Habilitationsschr. Univers. Bonn*.
- [52] NITZSCHE W. 1980. Chromosom reduction by halogenized amino acids in *Festuca-Lolium* hybrids. *Z. Pflanzengchtg.* **84**: 78–81.
- [53] NORDENSKIÖLD H. 1939. Studies of a haploid rye plant. *Hereditas* **25**: 204–210.
- [54] PANDEY K. K., PHUNG M. 1982. Hertwig Effect in Plants: Induced parthenogenesis through the use of irradiated pollen. *Theor. Appl., Genet.* **62**: 295–300.
- [55] PICARD E., BUYSER J. de. 1977. High production of embryoids in anther culture of pollen derived homozygous spring wheat. *Ann. Amelior. Plantes* **24**: 483–488.
- [56] PRZYBOROWSKI J., NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., RUCIŃSKA M. 1991. Wykorzystanie kultury *in vitro* w otrzymywaniu haploidów ogórka (*Cucumis sativus* L.). *Roslinne kultury tkankowe w Polsce*. VI Konf. Nauk. **1991**: 75.
- [57] PRZYBOROWSKI J., NIEMIROWICZ-SZCZYTT K. 1992. Haploids production in *Cucumis sativus* L. and their preliminary description. *Procc. of Fifth Eucarpia Cucurbitaceae Symposium, Warsaw, Poland 1992*: 87–90.
- [58] RANDOLPH L. F. 1932. Some effects of high temperatures on polyploidy and other variations in maize. *Procc. Nat. Acad. Sci.* **18**: 222–229.
- [59] RAQUIN C. 1985. Induction of haploid plants by *in vitro* culture of *Petunia* ovaries pollinated with irradiated pollen. *Euphytica* **36**, **1**: 287–294.
- [60] RAQUIN C., CORNU A., FARCY E., MAIZONNIER D., Pelletier, VEDEL G. F. 1989. Nucleus substitution between *Petunia* species using gamma ray-induced androgenesis. *Theor. Appl., Genet.* **78**: 337–341.
- [61] RILEY R., CHAPMAN V., JOHNSON R. 1968. The incorporation of alien disease resistance in wheat by genetic interference with the regulation of meiotic chromosome synapsis. *Genet. Res. Cambr.* **12**: 199–219.
- [62] RIVES M., PICARD E. 1977. A case of genetic assimilation: Selection through androgenesis or parthenogenesis of haploid producing systems. (an hypothesis). *Ann. Amelior. Plantes* **27**: 489–491.
- [63] RODE J. C., Dumas de VAULX R. 1987. Haploids of carrot (*Daucus carota* L.) obtained by means of parthenogenesis induced *in situ* by irradiated pollen and *in vitro* culture of immature seeds. *Comp. Ren. de l'Acad. des Scien. III Scien. de la Vie* **305**(6): 225–229.
- [64] SAN NOEUM Z. H. 1976. Haploids d'*Hordeum Vulgare*

- L. par culture in vitro non fécondes. *Ann. Amélior. Plantes* **26**: 751–754.
- [65] SAUTON A., DUMAS DE VAULX R. 1987. Obtention de plantes haploïdes chez le melon (*Cucumis melo* L.) par gynogenèse induite par du pollen irradié. *Agronomie* **7**, **2**: 134–148.
- [66] SAUTON A. 1988. Doubled haploid production in melon (*Cucumis melo* L.). *Cucurbitaceae* 119–128.
- [67] SAUTON A. 1988. Effect of season and genotype on gynogenetic haploid production in muskmelon (*Cucumis melo* L.). *Scien. Hort.* **35**: 71–75.
- [68] SAUTON A. 1989. Haploid gynogenesis in *Cucumis sativus* induced by irradiated pollen. *Cuc. Genet. Coop.* **12**: 22–23.
- [69] SEARS E. R. 1939. Cytogenetic studies with polyploid species of wheat. I. Chromosomal aberrations in the progeny of a haploid of *Triticum vulgare*. *Genetics* **24**: 509–523.
- [70] SEARS E. R., 1956. The transfer of leaf-rust resistance from *Aegilops umbellulata* to wheat. *Brookh. Symp. in Biol.* **9**: 1–22.
- [71] STADLER L. J. 1931. The experimental modification of heredity in crop plants. I. Induced chromosomal irregularities. *Sci. Agric.* **11**: 557–572.
- [72] STETTLER R. E., BAWA K. S. 1971. Experimental induction of haploid parthenogenesis in black cottonwood (*Populus trichocarpa*). *Silvae Genetica* **20**: 15–25.
- [73] SWAMINATHAN M. S., SINGH M. P. 1958. X-ray induced haploidy in water melon. *Curr. Sci.* **27**: 63–64.
- [74] SWANSON E. B., COUMANS M. P., BROWN G. L., PATEL J. D., BEVERS DORF W. D. 1988. The characterisation of herbicide tolerant plants in *Brassica napus* L. after in vitro selection of microspores and protoplasts. *Plant Cells Rep.* **7**(2): 83–87.
- [75] ŚNIEZKO R., VISSER T. 1987. Embryo development and fruit-set in pear induced by untreated and irradiated pollen. *Euphytica* **36**(1): 287–294.
- [76] TAO Z. R., LIU M. S., ZHU Z. C. 1985. In vitro production of haploid plantlets from unpollinated ovaries of potato. *Hered. China* **7**(5): 24.
- [77] TO K. Y., CHEN C. C., LAI Y. K. 1989. Isolation and characterisation of streptomycin-resistant mutants in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Theor. Appl., Genet* **78**, **1**: 81–86.
- [78] TODUA V. A. 1982. Haploid and diploid apomixis in the genus *Nicotiana*. *Otdalen, gibridiz i apomiksiz*: 109–119.
- [79] TORIYAMA K., HINATA K., SASAKI T. 1986. Haploid and diploid plant regeneration from protoplasts of anther callus in rice. *Theor. Appl., Genet.* **73**, **1**: 16–19.
- [80] TRUONG-ANDRE I., DEMARLY Y. 1984. Obtaining plants by in vitro culture of unfertilized maize ovaries (*Zea mays* L.) and preliminary studies on the patogeny of gynogenetic plant. *Z. Pflanzenzchtg* **92**: 309–320.
- [81] TRUONG-ANDRE I. 1988. In vitro haploid plants derived from pollination by irradiated pollen on cucumber. *Procc. Eucarpia Meeting on Cucurbitaceae* **88**: 128–141.
- [82] TURCOTTE E. L., FEASTER C. V. 1969. Semigametic production of haploids in *Pima* cotton. *Crop. Sci.* **9**: 653–655.
- [83] USEGLIO DE TREIYER E. E. 1971. Estudio de haploidia sorgos. *Inform. Técnica, Estacion Exp. Agropecuaria Manfredi No 42*, pp 6. *Cordoba Argentina. Plant Breeding. Abstr.* **44**: 7697 1974.
- [84] VASIL I. K. 1980. Androgenetic haploids. *Intern. Rev. Cytol.* **11A**: 195–223.
- [85] VERNA DE J. W., COLLINS G. B. 1984. Maternal haploids of *Petunia axillaris* L. B. S.P. via culture of attached ovules. *Theor. Appl., Genet.* **69**: 187–192.
- [86] WENZEL G. 1978. Production of haploids of rape and rye. *Procc. Intern. Symp. on plant cell culture, Mnchen* **1978**: 312–318.
- [87] WINTON L. L., EINSIPAHR D. W. 1968. The use of heat-freated pollen for aspen haploid production. *Forest Sci.* **14**: 406–407.
- [88] WU H. S., ZHU Z. C. 1988. Observation on the ploidy level and characters of the plantlets regenerated from tobacco unpollinated ovaries in vitro. *Genet. Manip. in Crops. Newsl.* **4**(2): 69–75.
- [89] XU Y., ZHU O. L. 1988. Selection of hydroxy-L-proline resistant variants of tobacco from cultured haploid callus and studies on their physiological and biochemical characteristics. III. Response of the Hyp-resistant variant to environmental stress. *Chinese Jour. Biotech.* **4**, **1**: 55–59.
- [90] YANG H. Y., ZHOU C. 1982. In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules. *Theor. Appl., Genet.* **63**: 97–104.
- [91] 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. *Hapl. of higher plants in vitro*: 182–191.
- [92] ZENK M. H. 1974. Haploids in physiological and biochemical research. W: K. J. KASHA (red.), *Haploids in higher plants*. 339–353.
- [93] ZENKTELER M. 1984. Uzyskiwanie roślin haploidalnych metodą hodowli in vitro. W: *Hodowla komórek i tkanek roślinnych*. PWN Wa-wa.
- [94] ZHANG C. H., CAO J., BAO W. K. 1986. Selection and characterisation of variants with high pH resistance or salt resistance from haploid triticale callus (n=28). *Act. Bot. Sin.* **28**(2): 137–141.
- [95] ZHU-PING G., KUO-CHANG C. 1983. In vitro induction of haploid plantlets from unpollinated young ovaries of lily and its embryological observations. *Act. Bot. Sin.* **25**, **1**: 24–28.