

ZBIGNIEW BRODA**SYLWIA MIKOŁAJCZYK**

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Akademia Rolnicza, Poznań

Indukowanie haploidów żyta (*Secale cereale* L.)

Induction of haploids in rye (*Secale cereale* L.)

Stosując klasyczne metody hodowli roślin, takie jak chów wsobny, do otrzymania linii homozygotycznych potrzeba kilku lat. Wykorzystując techniki kultur *in vitro* możemy uzyskać te linie w znacznie krótszym czasie. U zbóż do indukowania form haploidalnych najczęściej stosuje się: androgenezę (kultury pylników i kultury izolowanych mikrospor) oraz eliminację chromosomów. Za najważniejsze czynniki decydujące o otrzymaniu roślin haploidalnych przyjmuje się: fizjologiczną kondycję roślin donorowych, genotyp, stadium rozwojowe mikrospor i czas prowadzenia kultury, traktowanie wstępne kłosów i pylników, skład pożywki, warunki prowadzenia kultury. W ostatnich latach wzrasta znaczenie haploidów w hodowli takich gatunków, jak: pszenica, pszenżyto, jęczmień, rzepak, tytoń i wielu innych. Żyto (*Secale cereale* L.) jest rośliną, u której indukowanie haploidów na drodze androgenozy sprawia szereg trudności. Najczęściej spotykanym problemem jest niski odsetek regenerowanych roślin i wysoki udział roślin albinotycznych.

Słowa kluczowe: androgeniza, czynniki, eliminacja chromosomów, haploidy, *Secale cereale*, żyto

Inbred lines production in rye (*Secale cereale* L.) with the classical breeding procedure is a difficult and time consuming task. With use of *in vitro* culture techniques for obtaining doubled haploid plants of rye it can be done in a shorter time. In cereals, for the haploid induction the androgenesis (anther culture and isolation microspores) and elimination of chromosomes are widely used. The most important factors influencing the androgenic capacity are: growth of donor plant material, genotype, the initial treatment of spikes and anthers, the stage of microspores development, the medium and culture condition. Rye (*Secale cereale* L.) is a species in which induction of haploids *in vitro* anther cultures causes many problems. The most frequent occurring problems are low percentage of regenerated plants and high participation albinotic plants.

Key words: androgenesis, factors, elimination of chromosomes, haploids, rye, *Secale cereale*

WSTĘP

Stosując klasyczne metody hodowli roślin, takie jak chów wsobny, do otrzymania linii homozygotycznych potrzeba kilku lat. Wykorzystując techniki kultur *in vitro* (androgeniza) i krzyżowanie oddalone (eliminacja chromosomów) możemy uzyskać te linie w znacznie krótszym czasie pod warunkiem, że dysponujemy efektywną metodyką. Linie podwojonych haploidów charakteryzują się pełną homozygotycznością oraz możliwością

ujawnienia pełnej zmienności wynikającej z segregacji alleli w pokoleniu F₂. W hodowli linii DH odpowiadają liniom czystym. Wykorzystanie linii DH do technologii produkcji odmian w stacjach hodowli wymaga dwóch etapów:

- otrzymania roślin haploidalnych oraz podwojenia u nich liczby chromosomów;
- rozmnożenia nasion roślin linii DH i ich oceny.

W ostatnich latach wzrasta znaczenie haploidów w hodowli takich gatunków, jak: pszenica, pszenżyto, jęczmień, rzepak, tytoń i wielu innych. U zbóż do indukowania form haploidalnych najczęściej stosuje się: androgenezę (kultury pylników, kultury izolowanych mikrospor) oraz eliminację chromosomów. Wśród gatunków, dla których opracowano te metody z bardzo zadowalającymi wynikami, należy wymienić: pszenicę (*Triticum aestivum*), pszenżyto (*Triticale*), jęczmień (*Hordeum vulgare*), kukurydzę (*Zea mays*). Niestety żyto (*Secale cereale*) jest rośliną, u której indukowanie haploidów na drodze androgenezy sprawia szereg trudności. Najczęściej spotykanym problemem wydaje się niski odsetek regenerowanych roślin i wysoki udział roślin albinotycznych.

METODY OTRZYMYWANIA ROŚLIN HAPLOIDALNYCH

Dla indukowania roślin haploidalnych w warunkach *in vitro* u zbóż, w tym i u żyta stosuje się metody: pylnikowe, izolowanych mikrospor oraz eliminację chromosomów, często określaną jako metoda bulbozowa. Metody te posiadają szereg zalet i wad. Charakterystykę tych metod przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Porównanie metod otrzymywania linii podwojonych haploidów
Comparison of methods of double haploids lines production

Androgeneza Androgenesis				Eliminacja chromosomów Elimination of chromosomes	
Kultury pylników Anther culture		Kultury izolowanych mikrospor Isolated microspore culture			
zalety advantage	wady disadvantage	zalety advantage	wady disadvantage	zalety advantage	wady disadvantage
wydajność efficiency	wpływ genotypu influence of genotype	wysoka wydajność high efficiency	wpływ genotypu influence of genotype	prostota simplicity	niska wydajność low efficiency
prostota simplicity	albinizm albino	ujawnienie pełnej zmienności full variability	albinizm albino	niższy koszt pożywek lower cost of medium	znaczna pracochłonność considerable in put of labour
niska pracochłonność low input of labour	koszt pożywek cost of medium		wyższy koszt pożywek high cost of medium	mniejsza zależność od genotypu less dependence from getypes	kolchicynowanie use of colchicine
	zmienność gametoklonalna gametoclinal variation		zmienność gametoklonalna gametoclinal variation	brak albinizmu no albino	

ANDROGENEZA

Androgeneza to sporofityczny rozwój gametofitu męskiego, dający początek haploidalnemu zarodkowi, a dalej haploidalnej roślinie. Prowadzone intensywne badania nad haploidyzacją umożliwiły wyróżnienie najważniejszych czynników decydujących o sukcesie. Wśród nich jako najważniejsze przyjmuje się: fizjologiczną kondycję roślin donorowych, stadium rozwojowe mikrospor i czas prowadzenia kultury, traktowanie wstępne kłosów i pylników, skład pożywki, warunki prowadzenia kultury oraz najważniejszy z nich — genotyp (Deimling i Flehinghaus-Roux, 1997).

Warunki wzrostu roślin donorowych

Warunki wzrostu roślin donorowych są ważnym czynnikiem decydującym o procesie androgenезы. Większy odsetek roślin haploidalnych powstaje, gdy rośliny będące źródłem pylników lub mikrospor rosną w warunkach całkowicie kontrolowanych. Kiełkowanie powinno odbywać się w warunkach szklarniowych w temperaturze 20° C. Jarowizacja trwa dwanaście tygodni w temperaturze 4° C i przy 8 godzinnym oświetleniu. Po zakończonej jarowizacji przenosi się rośliny do szklarni, temperatura powinna wynosić 10° C w dzień i 8° C w nocy, aż do zakończenia fazy strzelania w źdźbło. W trakcie dalszego rozwoju temperaturę należy podnieść do 18° C w dzień i 14° C w nocy, którą należy utrzymać do czasu pobierania materiału roślinnego (Daniel, 1993). W pracy Flehinghaus-Roux i wsp. (1995) podano zbliżone warunki wzrostu roślin donorowych, z tą różnicą, że jarowizację prowadzono w krótszym czasie i niższej temperaturze (10 tygodni, 2° C), a wzrost roślin w późniejszym okresie odbywał się w szklarni o temperaturze 20° C w dzień i 16° C w nocy, przy 16 godzinnym oświetleniu.

Traktowanie wstępne kłosów

Drugim ważnym czynnikiem decydującym o powodzeniu kultur pylników i izolowanych mikrospor jest traktowanie wstępne kłosów, z których będą pobierane pylniki (Marsolais i in., 1984; Powell, 1988). Wyniki opisane w wielu publikacjach wskazują, że szok termiczny (podniesienie lub obniżenie temperatury) wpływa korzystnie na androgenезę. Czas działania tego czynnika jest zależny od gatunku. Dla żyta zaleca się obniżenie temperatury od 4° C do 6° C, na okres jednego tygodnia (Wenzel i in., 1977; Daniel, 1993; Flehinghaus-Roux i in., 1995; Rakoczy-Trojanowska i in., 1996 a; Immonen i Anttila, 1999). Thomas i wsp. (1975) wskazują na korzystny wpływ obniżenia temperatury do 6° C przez 3 do 15 dni. Orlikowska (1977), traktując kłosa obniżoną temperaturą (4° C) przez 1 do 2 dni, nie zaobserwowała wpływu szoku termicznego na wzrost zdolności androgennych.

Stadium rozwojowe mikrospor

O powstawaniu haploidalnych roślin decyduje również stadium rozwojowe mikrospor. Zagadnienie to dotyczy kultur pylników, jak i izolowanych mikrospor. Najczęściej wyszczepia się pylniki zawierające mikrospory średnio- lub późnojednodrowe (Flehinghaus-Roux i in., 1995). Stadium rozwojowe określa się wykonując preparaty cytologiczne, na podstawie położenia jądra oraz wielkości wakuoli (Orlikowska, 1977).

Pożywka i warunki inkubacji eksplantatów

Kolejnymi czynnikami decydującymi o powodzeniu kultur są pożywka oraz warunki inkubacji wyszczepionych eksplantatów. W kulturach pylników żyta (*Secale cereale* L.) stosuje się szereg najróżniejszych pożywek z modyfikacjami poszczególnych autorów. Wśród najczęściej stosowanych można wymienić: MS z modyfikacjami (Sharma i in., 1982; Milewska-Pawliczuk, 1987; Daniel, 1993); N₆ (Wenzel i in., 1976); N₆ z modyfikacjami (Flehinghaus i in., 1991; Rakoczy-Trojanowska i in., 1997; Ślusarkiewicz-Jarzina i in., 1999); pożywka z ekstraktem ziemniaczanym (Wenzel i in., 1977; Sharma i in., 1982; Rakoczy-Trojanowska i in., 1997; Ślusarkiewicz-Jarzina i in., 1999); pożywka Nitscha i Nitscha (Thomas i in., 1975); pożywki Blaydesa, White'a oraz Schenka i Hildebrandta (Wenzel i Thomas, 1974). Pożywki stosowane w kulturach pylników zawierają regulatory wzrostu i rozwoju. Do najczęściej stosowanych należy zaliczyć 2,4-D, NAA, IAA, BAP, kinetynę, picloram, dicambę.

W pierwszych pracach dotyczących androgenezy u żyta (Wenzel i Thomas, 1974) zaobserwowano wyraźnie stymulujący wpływ pożywek zawierających wysokie stężenia auksyn na rozwój kalusa (powyżej 0,6 mg/l 2,4-D lub 1,0 mg/l NAA). Thomas i wsp. (1975) wskazują na korzystny wpływ 2,4-D jako jedynego regulatora wzrostu. Z kolei Daniel (1993) otrzymał wyższy odsetek zregenerowanych roślin na pożywce MS zawierającej picloram, IAA oraz BAP. Rakoczy-Trojanowska i wsp. (1996 a) najwyższą indukcję androgenezy otrzymali na pożywce zawierającej 2,0 mg/l 2,4-D i 0,5 mg/l kinetyny.

Poza tak oczywistymi czynnikami wpływającymi na przebieg regeneracji w warunkach *in vitro*, jak regulatory wzrostu i rozwoju roślin pewne znaczenie wykazują także źródło węgla organicznego oraz środek zestalający pożywkę. Flehinghaus i wsp. (1991) wskazują korzystny wpływ maltozy na regenerację z pylników żyta oraz niekorzystne działanie agaru, który można zastąpić np. agarozą.

Wśród czynników decydujących o przebiegu androgenezy nie wolno pominąć zagadnień związanych z warunkami, w jakich ma odbywać się rozwój pylników i mikrospor. Niektórzy autorzy dobierają najróżniejsze kombinacje temperatury oraz oświetlenia. Wenzel i Thomas (1974), Flehinghaus i wsp. (1991) oraz Daniel (1993) preferują temperaturę rzędu 24–28° C i zaciemnienie kultur. Z kolei Orlikowska (1977), Sharma i wsp. (1982) i Milewska-Pawliczuk (1987) skłaniają się do podobnej temperatury, ale uważają doświetlanie kultur za konieczne.

Genotyp

Najczęściej do indukowania androgenezy wykorzystywane są genotypy z gatunku *Secale cereale* oraz mieszańce międzygatunkowe *Secale cereale* × *Secale vavilovii* (tab. 3). Genotyp rośliny donorowej decyduje o przebiegu i efektywności androgenezy. Zdolność do generowania form haploidalnych jest uwarunkowana genetycznie (Szarejko, 1994) i często powoduje różne odsetki otrzymywanych roślin haploidalnych u różnych gatunków z rodzaju *Secale*, u odmian tego samego gatunku, a nawet pomiędzy poszczególnymi liniami DH. W pracy Hörlein (1991) testowano zdolność do androgenezy siedmiu linii podwojonych haploidów. U najlepszej z nich zdolności androgenne wykazało 5,3% wyłożonych pylników. Szereg prac wskazuje na trudności w zregenerowaniu zielonych

roślin u gatunku *Secale cereale* (Orlikowska, 1977; Sharma i in., 1982; Milewska-Pawliczuk, 1987; Flehinghaus i in., 1991; Hörlein, 1991). W jednej z cytowanych prac otrzymano 68 roślin na 84000 wyłożonych pylników, z których 7 było zielonych (Wenzel i in., 1976). Flehinghaus-Roux i wsp. (1995) z puli genowej „Petkus” otrzymali maksymalnie 6,8% regenerujących pylników, z których nie było możliwe zregenerowanie zielonych roślin. Ślusarkiewicz-Jarzina i wsp. (1999) dla 30 genotypów żyta otrzymała od 0,1 do 2,6 roślin/100 pylników. Odmiany: Amilo, Dańkowskie Złote, Dańkowskie Nowe, Kier, Motto, Walet, Warko charakteryzują się niskimi zdolnościami do androgenezy; u najlepszej z nich (Amilo) odsetek indukcji androgenezy wynosił 0,3% (Broda, Mikołajczyk, 2001). Androgenezę można indukować u bardzo wielu gatunków roślin. Podstawowym warunkiem decydującym o wykorzystaniu tej techniki jest jej wysoka efektywność. Niski odsetek regenerowanych roślin, częste defekty chlorofilowe uniemożliwiają wykorzystanie haploidów oraz linii DH żyta w hodowli na skalę masową.

KULTURY IZOLOWANYCH MIKROSPOR

Technika izolowanych mikrospor jest u *Secale cereale* stosowana sporadycznie. Czynniki decydującymi o powodzeniu tych kultur są:

- warunki wzrostu roślin donorowych
- odpowiednie stadium rozwojowe mikrospor (stadium średnio- lub późnojednojądrowe),
- warunki inkubacji mikrospor.

Wenzel i wsp. (1975) izolowali mikrospory, ale nie były one zdolne do zregenerowania roślin. Jako optymalne stadium izolacji mikrospor najczęściej podają stadium późnojednojądrowe, a czynnikiem wpływającym na przebieg regeneracji jest dodatek do pożywki indukcyjnej mannitolu w stężeniu 0,5 M.

Deimling i wsp. (1994) podają, że udało się zregenerować rośliny z izolowanych mikrospor u genotypu SC35, który charakteryzował się wysoką zdolnością do androgenezy również w kulturach pylników (63,5% androgennych pylników, z których otrzymano 5,6% zielonych roślin). Wskazują również, że traktowanie wstępne kłosów lub pylników (obniżenie temperatury do 14° C przez 6 dni oraz prekultury pylników na pożywce zawierającej 7% mannitolu w temperaturze 14° C) może powodować spadek zdolności regeneracyjnych. Na korzystny wpływ prekultury mikrospor w 7% stężeniu mannitolu wskazują również Rakoczy-Trojanowska i wsp. (1996). Zarówno dla pylników, jak i izolowanych mikrospor podaje się, że korzystniejszym źródłem węgla organicznego jest maltoza, przy czym dla mikrospor optymalna zawartość w pożywce wynosi 60 g/l (dla pylników 90–120 g/l).

ELIMINACJA CHROMOSOMÓW

Istotą metody jest krzyżowanie oddalone, w wyniku którego eliminacji ulegają chromosomy pochodzące od formy ojcowskiej. Cechą charakterystyczną metody jest konieczność traktowania roślin matecznych regulatorami wzrostu i rozwoju zarówno

przed, jak i po zapyleniu poprzez oprysk lub iniekcję do źdźbeł roztworu auksyn (Suenaga, 1994; Wędzony i in., 1998; Ślusarkiewicz-Jarzina i in., 1999).

Metoda ta na szeroką skalę jest stosowana u jęczmienia od trzydziestu lat i nosi nazwę bulbozowej (Kasha i Kao, 1970; Bajaj, 1990). Polega na krzyżowaniu *Hordeum vulgare* z *Hordeum bulbosum*. Gatunkiem wykorzystywanym do zapylenia pszenicy i pszenżyta jest kukurydza *Zea mays* (Laurie, Benett, 1989; Wędzony i in., 1998). Stwierdzono, że chromosomy kukurydzy są eliminowane już w trakcie pierwszych trzech podziałów komórkowych (Laurie, Benett, 1989). Mechanizm pierwszych podziałów zygoty jest zdeterminowany przez cytoplazmę komórki jajowej. W tym przypadku następuje przyłączenie wrzeczona kariokinetycznego do chromosomów rośliny matecznej. Stąd w pierwszych podziałach następuje wyeliminowanie chromosomów wniesionych do zygoty przez formę ojcowską.

Stosując ją podjęto próby krzyżowań żyta z kukurydzą, niestety zarodki mieszańcowe po przeniesieniu na pożywkę nie rozwijały się (Ślusarkiewicz-Jarzina i in., 1999). Z doświadczeń prowadzonych w badaniach własnych należy nadmienić, że dodatkowym utrudnieniem jest synchronizacja terminów kwitnienia żyta i kukurydzy. Doświadczenia wykazały, że metoda nie jest efektywna dla uzyskiwania haploidów żyta.

REGENERACJA

W kulturach pylników i izolowanych mikrospor można wyróżnić dwa podstawowe rodzaje regeneracji: powstawanie zarodków haploidalnych (embriogeneza bezpośrednia) oraz tworzenie się embriogennego kalusa (embriogeneza pośrednia). Dla hodowli najbardziej pożądana jest embriogeneza bezpośrednia, ponieważ regeneracja pośrednia niesie ze sobą takie zagrożenia, jak zmienność gametoklonalna, powstawanie aneuploidów oraz zmianę stopnia ploidalności (często powstają miksoploidy i poliploidy).

Flehinghaus i wsp. (1991) wskazują jako najkorzystniejszą do regeneracji zmodyfikowaną pożywkę N₆ z dodatkiem kinetyny, która jest niezbędna do prawidłowego ukorzenienia roślin. Z kolei Wenzel i wsp. (1977) oraz Daniel (1993) otrzymali podobne wyniki na pożywce N₆ bez regulatorów wzrostu. Hörlein (1991) po przetestowaniu 11 różnych pożywek regeneracyjnych stwierdziła, że do rozwoju kalusa w zielone rośliny niezbędny jest niski poziom auksyn.

Flehinghaus i wsp. (1991) umieszczali zielone struktury oraz roślinki na pożywce regeneracyjnej (zmodyfikowana pożywka N₆) w temperaturze 22° C. Jarowizację prowadzono w warunkach *in vitro*, zjarowizowane rośliny, będące w dobrej kondycji wysadzano do gleby.

Otrzymane rośliny Daniel (1993) przenosił do gleby, gdy miały dwa, trzy liście. Sadzonki umieszczał w szklarni o temperaturze 20° C i wysokiej wilgotności. Po 14 dniach rośliny poddawano jarowizacji przez 10 tygodni w temperaturze 4° C. Czas potrzebny do otrzymania pierwszego pokolenia linii DH wynosi około 18 miesięcy (Deimling, Flehinghaus-Roux, 1997). W tabeli 2 podano czas trwania jednego cyklu kultur pylników z wyszczególnieniem poszczególnych etapów od siewu roślin donorowych do wysadzenia roślin haploidalnych do gleby.

Tabela 2

Czas trwanie jednego cyklu kultur pylników od wysiewu roślin donorowych do otrzymania roślin pokolenia R₁

Duration of whole cycle of anther culture from sowing of donor plant to obtaining R₁ generation of plants

Czynność Operation	Tygodnie Weeks
wysiew roślin donorowych, kiełkowanie, wzrost siewek sowing the seeds, germination and donor seedlings development	1
jarowizacja vernalization	10
adaptacja do warunków szklarniowych adaptation in to greenhouse conditions	2
wzrost roślin donorowych growth the donor plants	8
pobieranie materiału roślinnego, traktowanie wstępne kłosów collecting of donor spike, spike pretreatment	1
wyszczepianie pylników anthers culturing	1
indukowanie androgenezy induction of androgenesis	12
pasażowanie kalusów, regeneracja roślin, podwajanie liczby chromosomów callus passage, plant regeneration, doubling chromosome number	4
jarowizacja zregenerowanych roślin vernalization of regenerated plants	10
adaptacja adaptation	2
wysadzanie roślin do gleby, wzrost roślin, samozapylenie transfer plant to soil in the greenhouse, plant growth, self-pollination	22

ALBINIZM

Poza niskim odsetkiem regenerujących roślin oraz typem regeneracji kolejnym znaczącym problemem w androgenezie zbóż jest powstawanie roślin z defektami chlorofilowymi lub całkowicie albinotycznymi. U pszenicy (Tuveson i in., 1989) i jęczmienia (Larsen i in., 1991) albinizm jest kontrolowany genetycznie, najprawdopodobniej przez delecje w DNA chloroplastów. Żyto charakteryzuje się bardzo wysokim odsetkiem regenerantów z defektami chlorofilowymi. Już w pierwszych pracach (Thomas i in., 1975) zaobserwowano liczne rośliny albinotyczne od 70,4% do 89,7%. Wielu autorów wskazuje na bardzo silny wpływ genotypu na pojawianie się form z defektami chlorofilowymi np. Daniel (1993), który u genotypu Carokutrz otrzymał 100% albinosów.

Na tak licznie, występujące u żyta, defekty chlorofilowe mogą mieć wpływ również chimeryzm i czynniki fizjologiczne. Wskazywałaby na to praca Wenzela i Thomasa (1974), gdzie zaobserwowano regenerację zielonych i albinotycznych roślin z tego samego kalusa.

PODSUMOWANIE

Badania nad wykorzystaniem technik *in vitro* do otrzymania linii DH u gatunku *Secale cereale* L. prowadzi się od ponad dwudziestu lat. W tym czasie bardzo rozwinęły się stosowane metodyki oraz opracowano liczne protokoły dla kultur pylników żyta.

Tabela 3

Przegląd literatury dotyczącej androgenезы u żyta z uwzględnieniem materiału roślinnego, badanych czynników oraz przebiegu regeneracji

Review of literature on androgenesis in rye with consideration to the plant material tested, factors and regeneration process

Autor i rok Author and year	Materiał roślinny Plant material	Badane czynniki Tested factors	Przebieg regeneracji Regeneration process	
			kalus calli	rośliny plants
Wenzel i Thomas, 1974	<i>Secale cereale</i>	stadium rozwojowe mikrospor, skład pożywki microspore developmental stage, culture medium	+	—
Thomas i in., 1975	<i>Secale cereale</i> × <i>Secale vavilovii</i>	stan rośliny donorowej, stadium rozwojowe mikrospor, skład pożywki, genotyp state of donor plant, microspore developmental stage, culture medium, genotype	+	+
Wenzel i in., 1976	<i>Secale cereale</i> , <i>Secale cereale</i> × <i>Secale vavilovii</i>	genotyp genotype	+	+
Wenzel i in., 1977	<i>Secale cereale</i> , <i>Secale cereale</i> × <i>Secale vavilovii</i>	traktowanie wstępne kłosów, skład pożywki, genotyp spike pretreatment, culture medium, genotype	+	+
Orlikowska, 1977	<i>Secale cereale</i>	skład pożywki culture medium	+	—
Sharma i in., 1982	<i>Secale cereale</i>	traktowanie wstępne kłosów, skład pożywki, genotyp spike pretreatment, culture medium, genotype	+	—
Milewska-Pawliczuk, 1987	<i>Secale cereale</i>	skład pożywki, genotyp culture medium, genotype	+	—
Flehinghaus i in., 1991	<i>Secale cereale</i> , <i>Secale cereale</i> × <i>Secale vavilovii</i>	skład pożywki, genotyp culture medium, genotype	+	+
Daniel, 1993	<i>Secale cereale</i> , <i>Secale cereale</i> × <i>Secale vavilovii</i>	skład pożywki, genotyp culture medium, genotype	+	+
Flehinghaus-Roux i in., 1995	<i>Secale cereale</i> , <i>Secale cereale</i> × <i>Secale vavilovii</i>	genotyp genotype	+	+
Immonen i Anttila, 1996	<i>Secale cereale</i>	traktowanie wstępne kłosów, skład pożywki, genotyp spike pretreatment, culture medium, genotype	+	+
Rakoczy-Trojanowska i in., 1996	<i>Secale cereale</i>	traktowanie wstępne kłosów, prekultura mikrospor, skład pożywki, genotyp spike pretreatment, preculture of microspores, culture medium, genotype	+	—
Rakoczy-Trojanowska i in., 1996 a	<i>Secale cereale</i>	traktowanie wstępne kłosów, skład pożywki, genotyp spike pretreatment, culture medium, genotype	+	+
Rakoczy-Trojanowska i in., 1997	<i>Secale cereale</i>	skład pożywki, genotyp culture medium, genotype	+	+
Immonen, 1999	<i>Secale cereale</i>	traktowanie wstępne kłosów, genotyp spike pretreatment, genotype	+	+
Immonen i Anttila, 1999	<i>Secale cereale</i>	traktowanie wstępne kłosów spike pretreatment	+	+

Do najważniejszych czynników decydujących o przebiegu androgenezy należą: genotyp, warunki wzrostu roślin donorowych i traktowanie wstępne kłosów, stadium rozwojowe mikrospor, skład pożywki oraz warunki prowadzenia kultury. Warunkiem wykorzystania każdej techniki kultur *in vitro* w hodowli jest jej prostota, wysoka efektywność oraz niskie koszty. Już w pierwszych pracach dotyczących indukowania haploidów u żyta (*Secale cereale* L.) zaobserwowano niski odsetek regenerujących roślin, z których na dodatek liczne są albinotyczne np. Wenzel i wsp. (1976) z 84000 wyłożonych na pożywki pylników otrzymali 68 roślin, z czego 61 albinotycznych.

Czynnikami ograniczającymi wykorzystanie androgenezy i eliminacji chromosomów do uzyskiwania linii podwojonych haploidów żyta, a dalej w hodowli heterozyjnej, są przede wszystkim niska efektywność androgenezy, czas otrzymania linii DH (wynoszący minimum 18 miesięcy) oraz wysoki udział roślin z defektami chlorofilowymi. Powtarzalność wyników w poszczególnych eksperymentach jest niezadowalająca.

Publikacje dotyczące haploidyżacji żyta są nieliczne ze względu na jego regionalne znaczenie w porównaniu z gatunkami, takimi jak pszenica, jęczmień, rzepak itp. Większość prac dotyczących androgenezy u tego gatunku pochodzi z krajów, gdzie to zboże jest uprawiane jako źródło pożywienia dla ludzi. Najważniejsze prace z uwzględnieniem badanego materiału, czynników oraz otrzymanych wyników zestawiono w tabeli 3.

LITERATURA

- Bajaj Y. P. S. 1990. Biotechnology in agriculture and forestry: haploids in crop improvement I. Springer-Verlag, Berlin, Vol. 12: 18/20: 125 — 127.
- Broda Z., Mikołajczyk S. 2001. Próby indukowania haploidów żyta (*Secale cereale*) metodą kultur pylnikowych. Biotechnologia, 1/52: 148 — 152.
- Daniel G., 1993. Anther culture in rye: improved plant regeneration using modified MS-media. Plant Breeding, 110: 259 — 261.
- Deimling S., Flehminghaus-Roux T. 1997. Haploidy in rye. In: *In vitro* haploid production in higher plants. S. M. Jain, S. K. Sopory, Veilleux R. E. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: Vol. 4: 181 — 204.
- Deimling S., Geiger H. H. 1996. Anther culture in rye: Methodical improvements and genetic analysis. Vortr. Pflanzenzüchtg.: 35: 225 — 235.
- Deimling S., Flehminghaus-Roux T., Röber F., Schechert S., Roux R., Geiger H. H. 1994. Doubled haploid production — now reproducible in rye. In: Abstracts VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze, June 12–17, 1994: 95.
- Flehminghaus T., Deimling S., Geiger H. H. 1995. Anther-culture ability in *Secale cereale* L. Plant Breeding 114: 259 — 261.
- Flehminghaus-Roux T., Deimling S., Geiger H. H. 1991. Methodical improvements in rye anther culture. Plant Cell Reports 10: 397 — 400.
- Hörlein A. J. 1991. Methodische Untersuchungen zur Antherenkultur bei Roggen. Ph. D. Thesis, University of Hohenheim, Stuttgart.
- Immonen S., Anttila H. 1999. Cold pretreatment to enhance green plant regeneration from rye anther culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 57: 121 — 127.
- Immonen S. 1999. Androgenetic green plants from winter rye, *Secale cereale* L., of diverse origin. Plant Breeding 118: 319 — 322.
- Immonen S., Anttila H. 1996. Success in anther culture of rye. Vortr. Pflanzenzüchtg. 35: 237 — 244.
- Kasha K. J., Kao K. N. 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature 225: 874 — 876.

- Larsen E. T., Tuveson I. K. D., Andersen S. B. 1991. Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. Theor. Appl. Genet. 82: 417 — 420.
- Laurie D. A., Bennett M. D. 1988. The production of haploid wheat plants from wheat × maize crosses. Theor. Appl. Genet. 76: 393 — 397.
- Marsolais A. A., Seguin-Swartz G., Kasha K. J. 1984. The influence of anther cold pretreatments and donor plant genotypes on *in vitro* androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 3: 69 — 79.
- Milewska-Pawliczuk E. 1987. Induction of androgenesis *in vitro* in various genetic forms of *Secale cereale*. Biologia Plantarum 29/4: 295 — 298.
- Orlikowska T. 1977. Induction of androgenesis *in vitro* in *Secale cereale* and *Triticale*. Genet. Pol. 18/1: 51 — 58.
- Powell W. 1988. The influence of genotype and temperature pre-treatment on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 12: 291 — 297.
- Rakoczy-Trojanowska M., Kwaśniak A., Malepszy S. 1996. Factors influencing viability and sporophytic development *in vitro* of rye (*Secale cereale* L.) microspores. Vortr. Pflanzenzüchtg. 35: 256 — 257.
- Rakoczy-Trojanowska M., Śmiech M., Malepszy S. 1996 a. An evaluation of the factors influencing anther culture of rye (*Secale cereale* L.) Vortr. Pflanzenzüchtg. 35: 260 — 261.
- Rakoczy-Trojanowska M., Śmiech M., Malepszy S. 1997. The influence of genotype and medium on rye (*Secale cereale* L.) anther culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 48: 15 — 21.
- Sharma G. C., Wen Chung Wang, Sapra V. T. 1982. Effect of genotype, media and temperature pretreatment on calus initiation in triticale, wheat, and rye anther cultures. Cereal Res. Commun. 10 3/4: 143 — 150.
- Suenaga K. 1994. Doubled haploid system using the intergeneric crosses between wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*). Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resour. 9: 83 — 139.
- Szarejko I. 1994. Techniki otrzymywania podwojonych haploidów i ich wykorzystanie w hodowli roślin. Prace Ogrodu Botanicznego PAN 5/6: 39 — 53.
- Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A., Woźna J. 1999. Kultury pylnikowe, izolowane mikrospory i oddalone krzyżowanie w uzyskiwaniu haploidów żyta. I Krajowa Konferencja „Haploidy i linie podwojonych haploidów w genetyce i hodowli roślin”. Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań: 30.
- Thomas E., Hoffmann F., Wenzel G. 1975. Haploid plantlets from microspores of rye. Z. Pflanzenzüchtg. 75: 106 — 113.
- Tuveson I. K. D., Pedersen S., Andersen S. B. 1989. Nuclear genes affecting albinism in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. Theor. Appl. Genet. 78: 879 — 883.
- Wenzel G., Foroughi-Wehr B. 1990. Haploidenkultur. Agrarspectrum 17: 85 — 98.
- Wenzel G., Hoffmann F., Thomas E. 1976. Heterozygous microspore-derived plants in rye. Theor. Appl. Genet. 48: 205 — 208.
- Wenzel G., Hoffmann F., Thomas E. 1977. Increased induction and chromosome doubling of androgenetic haploid rye. Theor. Appl. Genet. 51: 81 — 86.
- Wenzel G., Thomas E. 1974. Observations on the growth in culture of anthers of *Secale cereale*. Z. Pflanzenzüchtg. 72: 89 — 94.
- Wędzony M., Marcińska I., Ponitka A., Ślusarkiewicz-Jarzina A., Woźna A. 1998. Production of doubled haploids in triticale (X *Triticosecale* Wittm.) by means of crosses with maize (*Zea mays* L.) using picloram and dicamba. Plant Breeding 117: 211 — 215.