

BARBARA SIEMIONOW  
*Akademia Rolnicza w Poznaniu*

## HODOWLA TKANEK ROŚLINNYCH I MOŻLIWOŚCI ICH PRAKTYCZNEGO ZASTOSOWANIA W WARZYWNICTWIE

Teoretycznie każda komórka somatyczna lub grupa takich komórek jest zdolna do wykształcenia dojrzałego organizmu po wyizolowaniu z rośliny i umieszczeniu we właściwym środowisku. Na środowisko to składa się zespół ściśle określonych czynników fizykochemicznych, które warunkują określony efekt morfogenetyczny. Jest również konieczne zapewnienie sterylnych warunków uniemożliwiających infekcję grzybami, czy bakteriami. Pierwsze próby izolowania komórek roślinnych zapoczątkowane w 1898 r. przez Haberlandta rozwinęły się w uniwersalną technikę zwaną powszechnie „hodowlą tkanek roślinnych *in vitro*”. Termin ten stosuje się powszechnie dla określenia wszystkich typów sterylnych hodowli roślin i obejmuje [22]:

- hodowle siewek lub większych roślin,
- hodowle wyizolowanych dojrzałych lub niedojrzałych zarodków,
- hodowle organów roślinnych,
- hodowle tkanek,
- hodowle rozproszone izolowanych komórek lub niewielkich ich zespołów,
- hodowle nagich protoplastów.

Technika kultur tkankowych ma wiele zalet dzięki dużej żywotności izolowanych komórek, tkanek czy organów, dokładnej kontroli czynników zewnętrznych oraz zastosowaniu sterylnych warunków, które wykluczają możliwość biologicznego zakażenia.

*Dotychczasowe osiągnięcia i możliwości praktycznego zastosowania metody kultur tkankowych w warzywnictwie*

Prowadzone w ciągu ostatnich lat badania związane z regeneracją roślin metodą kultur tkankowych są pomocne w rozmnażaniu klonalnym, zwalczaniu chorób wirusowych, otrzymywaniu homozygotycznych linii szeregu roślin uprawnych.

Rozmnażanie klonalne tą metodą znalazło już szerokie praktyczne zastosowanie w produkcji roślin ozdobnych znanych z powolnego rozwoju m. in. storczyków, bromelii, dracen oraz zwiększono ich współczynnik rozmnażania. Storczyki otrzymywane z merystemów wierzchołkowych wchodzą w okres kwitnienia o kilka lat wcześniej niż otrzymywane z nasion. Zwiększenie współczynnika rozmnażania w warunkach *in vitro* uzyskuje się przez cięcie na fragmenty roślin uzyskanych z merystemów lub regeneracji pąków z kultur kalusa. Na tej drodze z jednego merystemu wierzchołkowego goździka uzyskuje się po 3 miesiącach 20—30 pąków, a z jednego merystemu wierzchołkowego chryzantemy nawet 9 milionów [8].

Ważną rolę spełnia też metoda regeneracji roślin z merystemów stożków wzrostu, która w połączeniu z termo- i chemoterapią, pozwala na otrzymanie roślin wolnych od chorób wirusowych. I tak na przykład na drodze kultur merystemów opracowano szczegółowe metody wolnych od wirusów roślin [10]:

- ziemniaka — wolne od wirusa A, S, X i Y, wirusa parakędzierzawki, wirusa wrzecionowatości bulw,
- chmielu — wolne od wirusa nekrozy pierścieniowej, wirusa utajonego chmielu,
- truskawki — wolne od wirusa żółto-brzeźności łagodnej liści, kędzierzawki, smugotowatości pospolitej, wirusa utajonego A, chlorozy nerwów,
- agrestu — wolne od wirusa smugotowatości pospolitej,
- rabarbaru — wolne od wirusa liściozwoju i mozaikowatości,
- chryzantemy — wolne od wirusa B chryzantem, mozaiki wstęgowej, zielenienia kwiatów,
- goździka — wolne od mozaikowatości goździków, plamistości pierścieniowej, mozaikowatości utajonej.

Nowe wyniki badań umożliwiają w coraz większym zakresie opanowanie chorób wirusowych ważnych ekonomicznie roślin. W stacji hodowli ziemniaka Pawłowska (ZSRR) obok polowej kolekcji odmian, której zagraża stałe wirusowe wyradzanie się, założono kolekcję kultur merystemów wierzchołkowych, która stanowi stałą rezerwę wolnego od wirusów materiału roślinnego dla kolekcji polowej. Kłopotliwą częstotliwość pasażowania zmniejszono przez zubożenie pożywki i zastosowanie dodatku retardanta CCC (chlorek chlorocholiny) [24]. Inne badania dotyczące merystemów ziemniaka podają, że przez trzykrotne pasażowanie można otrzymać z jednego merystemu 300 zregenerowanych roślin [15].

Przy coraz większej intensyfikacji upraw warzywnych wprowadzenie, w niektórych przypadkach, metody kultur tkankowych mogłoby być opłacalne lub gospodarczo uzasadnione.

Celem rozmnażania wegetatywnego jest uzyskanie jednolitego materiału roślinnego o ustalonym genotypie. Rozmnażanie wegetatywne stosuje się zwykle, gdy jest pewne, że rośliny uzyskane z nasion nie powtórzą cech rodzicielskich. Rozmnażanie techniką kultur tkankowych może być tu częściowo pomocne, gdy zostanie włączone do programu hodowli roślin. Miszke i Skucińska [14] wskazują na przydatność opracowanej przez nie metody wegetatywnego rozmnażania kapusty w hodowli odmian mieszańcowych przy otrzymywaniu linii wsobnych.

Przez zastąpienie tradycyjnych metod rozmnażania wegetatywnego techniką kultur tkankowych można uzyskać dużą liczbę rozmnożeń zajmujących stosunkowo małą powierzchnię, co trudno jest uzyskać tradycyjnymi metodami. Pena-Iglesias i Ayuso [13] podają, że z jednego mezystemu wierzchołkowego czosnku po 3—4 latach hodowli można otrzymać miliony cebul. Jest to liczba niebagatelna, pomijając już ten ważny fakt, że uzyskany materiał jest wolny od wirusów.

W szczególnych przypadkach, zwłaszcza przy wysokim współczynniku rozmnażania, rozmnażanie wegetatywne techniką kultur tkankowych może się okazać korzystniejsze od stosowanego rozmnażania generatywnego.

Tabela 1

Zestawienie wybranych roślin warzywnych i miejsca pobrania eksplantatu, z którego uzyskano zregenerowane rośliny metodą kultur tkankowych

Rodzina i gatunek	Miejsce pobrania eksplantatu	Pozycja literaturowa
Chenopodiaceae <i>Beta vulgaris</i> L. ssp. <i>esculenta</i>	hypokotyl	[30]
Compositae <i>Lastuca sativa</i> L.	liścień, hypokotyl, korzeń	[4]
Cruciferae <i>Brassica napus</i> L. <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>botrytis</i>	łodyga	[12]
<i>Brassica</i> var. <i>capitata</i>	kwiatostan	[27]
<i>Brassica</i> var. <i>gongylodes</i>	łodyga, liść, ogonek liściowy	[13, 14]
<i>Rhaphanus sativus</i> L. var. <i>niger</i>	bulwiasto zgrubiała	[30]
<i>Sinapsis alba</i> L.	szyja korzeniowa	[30]
<i>Cucurbita pepo</i> L.	hypokotyl, korzeń	[2]
Liliaceae <i>Allium cepa</i> L.	hypokotyl	[11]
<i>Allium sativum</i> L.	liścień, hypokotyl	[5]
<i>Asparagus officinalis</i> L.	łuska cebuli	[17]
Papilionaceae <i>Pisum sativum</i> L.	wierzchołek pędu	[1, 6, 16, 29]
Solanaceae <i>Solanum tuberosum</i> L.	gałęziak, wierzchołek pędu, zarodek	[3]
Umbelliferae <i>Apium graveolens</i> L.	zarodek	[15, 24]
<i>Daucus carota</i> L.	bulwa, wierzchołek pędu	[30]
<i>Petroselinum hortense</i> Hoffm.	pęd, hypokotyl, korzeń	[7]
	korzeń, ogonek liściowy	[26]
	ogonek liściowy	

Walkey i Wolfitt [27] opracowali metodę klonalnego rozmnażania kalafiora, która pozwala na uzyskanie w ciągu jednego roku nieograniczonej liczby zregenerowanych roślin z jednego eksplantatu. Metoda ta ma duże znaczenie ekonomiczne, gdyż brytyjskie warunki klimatyczne nie pozwalają na uprawę kalafiorów nasiennych. Tak więc klonalne rozmnażanie mogłoby też stanowić drogę uniezależnienia się od importu nasion pewnych gatunków.

Oprócz tego metoda kultur tkankowych może być użyta do reprodukcji szczególnie cennego materiału roślinnego posiadanego w niewielkiej ilości.

W tabeli 1 zestawiono gatunki niektórych roślin warzywnych, dla których opracowano metody rozmnażania na drodze kultur tkankowych. Nowe badania stwarzają coraz większe możliwości, które pozostają jeszcze nie w pełni wykorzystane. Należy jednak zaznaczyć, że wdrożenie metody kultur tkankowych do masowej produkcji, w każdym przypadku powinno być poprzedzone przeprowadzeniem szczegółowej analizy ekonomicznej.

### *Technika kultur tkankowych*

Rozmnażanie roślin na drodze kultur tkankowych obejmuje kilka kolejnych faz, przy czym nie ma ogólnych reguł, co do postępowania w poszczególnych fazach. Można wyróżnić trzy zasadnicze fazy [17]:

- uzyskanie sterylnej hodowli,
- rozmnożenie,
- przygotowanie do przeniesienia do gleby.

Wyeliminowanie zakażenia grzybowego, czy bakteryjnego nie nastrocza trudności dzięki stosowaniu aseptycznych metod. Również dzięki temu, że pewne wirusy nie zakażają merystemów wierzchołkowych możliwe jest uzyskanie roślin wolnych od wirusów na drodze kultur merystemów [1, 17, 15, 8, 10]. Sterylizację pożywki i sprzętu przeprowadza się przez autoklawowanie najczęściej przy 1,5 atm (121°C) przez 15 min. [22]. Parametry te mogą być podwyższone, gdy sterylizuje się większą ilość pożywki w jednym naczyniu. Narzędzia do przeszczepień umieszcza się w naczyniach z etanolem i przed każdorazowym użyciem opala nad palnikiem. Prace związane z założeniem hodowli przeprowadza się w pomieszczeniach wysterylizowanych parą wodną lub bakteriobójczymi lampami UV [21]. Do sterylizacji materiału roślinnego stosuje się wiele różnych środków chemicznych. Wybór środka i czas traktowania nim zależy od materiału, który ma być sterylizowany. Często sterylizacja przeprowadzona w niewłaściwy sposób niszczy nie tylko mikroorganizmy, ale i zabija materiał roślinny. Ważne jest więc określenie optymalnych warunków dla każdego materiału. Efektywność chemicznej sterylizacji zwiększa się przez dodanie niewielkiej ilości (0,05%) detergentu do roztworu środka

sterylizującego. W tabeli 2 zebrano kilka zwykle stosowanych środków [25]. Należy jednak zaznaczyć, że stosowanie antybiotyków wiąże się z możliwością modyfikacji wzrostu tkanki.

Tabela 2

Zestawienie kilku środków najczęściej stosowanych do sterylizacji materiału roślinnego, ich stężeń oraz czasu traktowania tymi środkami [25]

Środek sterylizujący	Stężenie (‰)	Czas traktowania (min)
Podchloryn wapnia	9—10	5—30
Podchloryn sodu	2	5—30
Nadtlenek wodoru	10—12	5—15
Woda bromowa	1—2	2—10
Azotan srebra	1	5—30
Chlorek rtęci	0,1—1	2—10
Antybiotyki	0,0004—0,005	30—60

### Wybór materiału roślinnego

W pobraniu eksplantatu decydujące są [17]:

- wybór organu, który ma być użyty jako dawca eksplantatu,
- fizjologiczny lub antogeniczny wiek organu,
- termin, w którym eksplantat zostanie pobrany,
- wielkość organu,
- ogólny stan rośliny matecznej.

Teoretycznie każdy organ może posłużyć jako dawca eksplantatu, jednak stopień powodzenia może być różnorodny. Również nie bez znaczenia jest wiek organu, z którego ma być pobrany eksplantat. Pierik [19] zaobserwował u *Lunaria annua*, że każda para liści posiada swoje optimum regeneracji korzeni, które uzależnione jest od wieku rośliny matecznej. Liścienie korzenia się optymalnie, gdy roślina mateczna ma 4—5 tygodni, pierwsza para liści, gdy roślina mateczna ma 6—7 tygodni, a druga para liści, gdy roślina mateczna ma 8 tygodni.

Termin pobrania eksplantatu jest związany z przystosowaniem faz wzrostu wegetatywnego rośliny do klimatu. Szczelkunowa [23] w badaniach nad sezonową regeneracją maliny z izolowanych stożków wzrostu pędów podziemnych wykazała, że optymalny okres pobierania eksplantatów przypada od marca do czerwca.

Wielkość eksplantatu jest wprost proporcjonalna do jego zdolności przeżyciowej, a odwrotnie proporcjonalna do prawdopodobieństwa izolacji eksplantatu wolnego od biologicznego zakażenia.

Minimalna wielkość eksplantatu jest określona średnią wielkością komórek pobieranej tkanki. Na przykład minimalny eksplantat pobrany z wtórnego floemu korzenia marchwi zawierający 25 000 komórek ma masę o połowę mniejszą od minimalnego eksplantatu bulwy karczocha zawierającego 20 000 komórek. Mniejszy od podanego eksplantat karczocha posiadałby mniejszą zdolność przeżyciową wskutek uszkodzeń powstałych w czasie izolacji [25].

Początkowy rozwój eksplantatu jest zgodny z całokształtem fizjologicznych przejawów życia rośliny matecznej. Różnica w zachowaniu *in vitro* może być wynikiem pobrania zdrowego eksplantatu z chorej rośliny [17].

### Pożywka

Pożywka dla kultur tkankowych powinna być odpowiednio dobrana, przy czym nie ma ogólnych reguł co do jej składu. Związki wchodzące w skład pożywek można podzielić na trzy grupy:

- sole mineralne,
- związki organiczne,
- naturalne związki kompleksowe.

Zapotrzebowanie tkanek rosnących w kulturach na sole mineralne nie jest zróżnicowane i zazwyczaj wystarczające jest zastosowanie jednej z ogólnie stosowanych receptur. Do związków organicznych dodawanych do pożywek należą [17]:

- węglowodany (glukoza, sacharoza),
- witaminy (tiamina, myoinozytol, kwas nikotynowy, pirydoksyna, kwas askorbinowy),
- aminokwasy i amidy (arginina, kwas asparaginowy, asparagina, kwas glutaminowy, glutamina, tyrozyna),
- regulatory wzrostu,
- auksyny IAA (kwas indolilo-3-octowy) NAA (kwas naftaleno-octowy) IBA (kwas indolilo-3-masłowy) 2,4-D (kwas 2,4-dwuchlorofenoksyoctowy) CPA (kwas 4-chlorofenoksyoctowy),
- cytokininy BA ( $N_6$  — benzyloadenina), kinetyna ( $N_6$  — furfuryloadenina), 2 i P ( $N_6$  — izopentenyloadenina),
- gibereliny  $GA_3$  (kwas giberelowy).

Oprócz tego bardzo często w indywidualnych badaniach stosuje się naturalne związki kompleksowe, takie jak mleko kokosowe, hydrolizat drożdżowy, czy kazeinowy, sok pomarańczowy, czy pepton sojowy [17].

Zapotrzebowanie na węglowodany jest zaspakajane przez dodanie do pożywki 2—3% sacharozy. Glukoza znajduje zastosowanie tylko w nielicznych przypadkach. Na przykład w kulturach tkanek ogórka glukoza jest efektywniejsza od sacharozy [11].

Aminokwasy i amidy dają korzystne efekty w pożywkach przy rozmnażaniu organów z tym, że przydatne są tylko L-izomery [17].

Ustalenie optymalnego poziomu auksyn i cytokinin dla kultur tkankowych nastęrcza największej trudności. Te dwie grupy substancji należy rozpatrywać zarówno pod względem ich rodzaju i stężenia, jak i wzajemnego oddziaływania między nimi, gdyż ich wzajemny stosunek decyduje o przebiegu organogenezy. W badaniach Mariachiny i Butenko [13] nad regeneracją izolowanych tkanek kapusty przy stężeniu kinetyny 3 mg/l pożywki bez dodatku egzogennych auksyn następowała inicjacja pąków, przy stężeniu kinetyny 2 mg/l obfite tworzenie kalusa, a przy stężeniu 1 mg/l następowała rizogeneza.

Efektywność poszczególnych auksyn nie jest równa. Fridborg [5] w swoich pracach nad rizogenezą cebuli stwierdził, że spośród trzech badanych auksyn — 2,4-D, IAA i NAA w kombinacji z 2iP — 2,4-D i IAA są wprawdzie efektywne w tworzeniu kalusa, natomiast działają inhibicyjnie na procesy rizogenezy, szczególnie 2,4-D. Natomiast Miszke i Skucińska [14] stwierdziły, że kalus kapusty nie wykazywał rizogenezy na pożywce zawierającej 2,4-D, natomiast IAA stymulowało inicjację korzeni.

Z trzech stosowanych cytokinin najbardziej aktywna jest 2iP. Tkaneczka kalusa cebuli [5] umieszczona na pożywce zawierającej 2iP w stężeniu  $5 \times 10^{-7}$  i  $5 \times 10^{-6}$  M wykazała inicjację pąków i korzeni.

Gibreliny są na ogół inhibitorami procesów rizogenezy, jednak w ciemności w odpowiedniej kombinacji z auksynami mogą stymulować rizogenezę [17].

Naturalne związki kompleksowe znajdują zastosowanie wtedy, gdy wszystkie próby użycia związków syntetycznych nie dają wymaganego efektu lub, gdy konieczne jest zastosowanie dodatkowej stymulacji.

### *Czynniki fizyczne*

Również duży wpływ na rozwój tkanki mają czynniki fizyczne takie, jak światło, temperatura, wilgotność powietrza, konsystencja i pH pożywki oraz warunki tlenowe.

Światło w kulturach tkankowych nie odgrywa tej samej roli, co w rozwoju nienaruszonych roślin. W hodowlach tkanek procesów fotosyntezy nie jest konieczny, niemniej światło jest potrzebne dla regulacji pewnych procesów morfogenezy. Oświetlenie hodowli powinno być określone co do intensywności, czasu ekspozycji i składu światła. Stosowana intensywność światła bywa różna i tak np. Jelaska [11] dla kultur tkankowych ogórka stosowała światło białe o intensywności  $485 \pm 15$  luksów, a Morozowa i Mielnik [15] dla kultur ziemniaka światło o intensywności 4000 luksów. Doświadczenia Fridborga [5] dotyczące organogenezy tkanek cebuli

wskazują, że lepszy wzrost tkanek następuje przy świetle czerwonym niż przy niebieskim lub białym.

Dla określonych kultur tkankowych istnieje pewne optimum temperaturowe i temperatura odbiegająca o kilka stopni od tego optimum jest dla hodowli szkodliwa. Najczęściej stosuje się stałe temperatury w granicach od 24—30°C lub zróżnicowane temperatury w ciągu dnia i nocy.

Wilgotność powietrza jest na ogół wystarczająca i tylko w skrajnie suchych warunkach mikroklimatu musi być regulowana.

Nie jest też obojętne dla hodowli, czy zastosowana zostanie pożywka zestalona czy płynna. Konsystencja pożywki może decydować o przebiegu organogenezy. Tkanka kalusowa cebuli na pożywce płynnej wytwarza korzenie, natomiast pąki liściowe tworzą się tylko na pożywce zestalonej agarom [5]. Przypuszczalnie wiąże się to ze stopniem natlenienia pożywki. Wczesne badania White'a [28] sugerują, że warunki tlenowe mogą decydować o regulacji organogenezy.

### *Organogeneza w kulturach in vitro*

Uzyskiwanie zregenerowanej rośliny z eksplantatu może nastąpić dwiema drogami. Pierwsza z nich, bardziej rozpowszechniona, polega na tym, że wyizolowane komórki eksplantatu ulegają odróżnicowaniu nabierając charakteru merystematycznego. W taki sposób powstaje tkanka kalusowa, w której następnie wykształcają się grupy komórek merystematycznych, a z nich różnicują się primordia pędów, korzeni, a niekiedy nawet kwiatów. Druga droga uzyskiwania rośliny z eksplantatu jest bardziej pożądana, ale trudniejsza. Polega ona na bezpośrednim pobudzeniu somatycznych komórek eksplantatu do embriogenezy prowadzącej do powstania normalnych dwubiegunowych zarodków [20].

### *Przygotowanie zregenerowanych roślin do przeniesienia do gleby*

Faza hodowli mająca na celu przygotowanie roślin do przeniesienia do gleby bywa często pomijana w opracowaniach literaturowych. O praktycznym zastosowaniu metod kultur tkankowych decyduje uzyskanie jak największej ilości pełnowartościowych roślin, które będą się normalnie rozwijać w warunkach naturalnych. Tak więc faza ta powinna obejmować czynności mające na celu przystosowanie roślin do nowych warunków wilgotnościowych, świetlnych, uodpornienia roślin na pewne patogeny oraz inne czynniki zewnętrzne.

Wybrane rośliny wysadza się do doniczek wypełnionych sterylizowanym przez autoklawowanie podłożem, którym może być perlit, wermikulit, torf lub gleba [12, 14, 29]. Wysadzone rośliny umieszcza się w szklarni

pod osłoną, stąd po pewnym czasie prawidłowo rozwijające się rośliny przenosi się na miejsce stałe.

### Perspektywy zastosowania techniki kultur tkankowych

Zarówno obecnie, jak i w najbliższej przyszłości istnieje możliwość zastosowanie kultur tkankowych do genetycznego ulepszania roślin uprawnych, do uzyskiwania wolnych od chorób klonów, do szybkiego uzyskiwania wegetatywnych rozmnożeń selekcyjowanych odmian oraz do zachowania cennego, z punktu widzenia genetycznego materiału roślinnego.

Istnieje możliwość utworzenia banku kultur tkankowych o wysokich wartościach genetycznych poprzez przechowywanie w temperaturze ciekłego azotu ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), z którego możnaby korzystać w nieograniczonym czasie [31].

Zainteresowanie możliwościami, jakie daje technika kultur tkankowych wzrasta. We wrześniu 1976 r. podczas obrad metodycznej konferencji RWPg w Ołomuńcu (Czechosłowacja) opracowano program międzynarodowej współpracy na temat „Zastosowanie kultur *in vitro* w genetyce i hodowli roślin gospodarczo ważnych”. Przy Instytucie Botaniki Eksperymentalnej w Ołomuńcu planuje się założenie Międzynarodowego Centrum Kultur Tkankowych [9].

Wszystko wskazuje więc na to, że dzięki pełnemu wykorzystaniu możliwości zastosowania kultur tkankowych stanie się ona w ciągu najbliższych lat powszechną metodą ulepszania plonów.

### LITERATURA

1. Andreassen D.C., Ellisen J.H.: Root Initiation of Stem Tip Cuttings from Mature Asparagus Plants. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 90, 158—162, 1967.
2. Bajaj Y.S.P., Bopp M.: Growth and Organ Formation in *Sinapsis alba* Tissue Cultures. Z. Pflanzenphysiol. 66: 378—381, 1971.
3. Devreux M.: Regeneration of numerous shoots by *in vitro* culture of young pea embryos. Pisum News Lettes 2, 12, 1970.
4. Doerschug M.R., Miller C.O.: Chemical control of adventitious organ formation in *Lactuca sativa* explants. Am. J. Bot. 54, 410—413, 1967.
5. Fridborg G.: Growth and organogenesis in tissue cultures of *Allium cepa* var. *proliferum*. Physiol. Plant 25, 436—440, 1971.
6. Gorter C.J.: Vegetative propagation of *Asparagus officinalis* by cutting. J. Hort. Sci. 40, 177—179, 1965.
7. Grambow H.J., Nao K.N., Miller R.A., Gamborg O.L.: Cell division and plant development from protoplasts of carrot cell suspension cultures. Planta 103, 348—355, 1972.
8. Hauzińska E.: Mikrorozmnażanie *in vitro* goździków i chryzantem. Ogrodnictwo 6, 171—174, 1975.
9. Hauzińska E.: Zastosowanie kultur tkankowych w hodowli roślin. Ogrodnictwo 1, 24—26, 1977.
10. Ingram D.S.: Growth of Plant Parasites in Tissue Culture. W: Plant Tissue and Cell Culture. Wyd. Street H.E. Berkeley — Los Angeles 392—421, 1973.

11. Jelaska S.: Embryoid Formation by Fragments of Cotyledons and Hypocotyls in *Cucurbita pepo*. *Planta* 103, 278—280, 1972.
12. Kartha K.K., Gamborg O.L., Constabel F.: *In vitro* plant formation from stem explants of rape (*Brassica napus* cv. Zephyr). *Physiol. Plant.* 31, 217—220, 1974.
13. Mariachina I.J., Butenko R.G.: Kultura izolowanych tkanek kapusty, genetyczeskaja charakteristika i poluczenie rastienij regenerantow. *Sielsk. Biol. t. IX*, 2, 216—227, 1974.
14. Miszke W., Skucińska B.: *In vitro* Vegetative Propagation of *Brassica oleracea* v. *capitata* L. f. *alba*. *Z. Pflanzenzücht.* 76, 81—83, 1976.
15. Morozowa S.E., Mielik-Sarkisow O.S.: Indukcja stieblieobrazowania u eksplantatow kartofielia pri kultiwirowanii na židkoj sredie. *Dokł. Wsies. Akad. Sielkch. Nauk.* 5, 14—15, 1977.
16. Murashige T., Shabde M.N., Hasegawa P.M., Takatori F.H., Jones J.B.: Propagation of Asparagus Through Shoot Apex Culture. I Nutrient Medium for Formation of Plantlets. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97, 158—161, 1972.
17. Murashige T.: Plant Propagation through Tissue Cultures. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25; 135—166, 1974.
18. Pena-Iglesias A., Ayuso P.: Meristem — tip culture of garlic: Elimination of viruses from infected bulbs and rapid multiplication of virus-free clones. W: *Pro. XIX Intern. Hort. Congr. Warszawa* 62, 1974.
19. Pierik R.L.: Regeneration, vernalization and flowering in *Lunaria annua* L. *in vitro* and *in vivo*. *Mededelingen Landb. Wageningen, Nederland* 67; 6, 1967.
20. Reinert J.: Aspects of Organization-Organogenesis and Embriogenesis. W: *Plant Tissue and Cell Culture*, Wyd. Street H.E. Berkeley — Los Angeles: 338—356, 1973.
21. Rogozińska J.H.: Hodowla tkanek roślinnych i jej przydatność. *Kosmos A.* 1 (108), 39—48
22. Steet H.E.: Introduction. W: *Plant Tissue and Cell Culture*. Wyd. Street H.E. Berkeley — Los Angeles 1—11, 1973.
23. Szczełkunowa S.E.: Szezonnaja pieriodicznost regeneracji rostienij iz mieristematiczieskich wierchuszek maliny. *Fizj. Rast.* 21, 1; 69—74, 1974.
24. Truskinow.: 1976. Ozdorowlenie kartofielia ot virusnych boliezniej mietodom kultury mieristiennych tkanek. *Sielskoch. Biol. t. XI*, 2, 250—255, 1976.
25. Yeoman M.M.: Tissue (Callus) Cultures-Techniques. W: *Plant Tissue and Cell Culture*. Wyd. Street H.E. Berkeley — Los Angeles 31—59, 1973.
26. Vasil I.K., Hildebrandt A.C.: Variations of morphogenetic behavior in plant tissue cultures. II *Petrocelinum hortense*. *Am. J. Bot.* 52; 869—874, 1966.
27. Walkey D.G.A., Wolfit J.M.G.: 1970 Rapid clonal multiplication of cauliflower by shake culture. *J. Hort. Sci.* 45; 205—206, 1970.
28. White P.R.: Controlled differentiation in a plant tissue culture. *Bull. Torrey Bot. Club.* 66; 507—513, 1939.
29. Wilmar C., Hellendoorn M.: Growth and Morphogenesis of Asparagus Cells Cultured *in vitro*. *Nature* 217: 369—370, 1968.
30. Wurm G.: Vergleichende Untersuchungen über Wachstum und Organbildung an Segmenten pflanzlicher Speicherorgane bei Kultur *in vitro*. *Flora* 149; 43—76, 1960.
31. Zenkteler M.: Konferencja w Leeds na temat „Metody aseptycznych kultur w hodowli roślin”. *Post. Nauk Roln.* 3; 138—144, 1974.