



Transformacja genetyczna *Rhododendron* sp.

Małgorzata Madej, Wojciech Czernicki, Maria Klein
Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa, Akademia Rolnicza
im. H. Kołłątaja, Kraków

Genetic transformation of *Rhododendron* sp.

Summary

The aim of our study is to review the results of genetic transformation of rhododendrons which has been published in scientific literature or presented during scientific conferences so far. Despite complicated and work-consuming protocol, genetic transformation has great potential to improve future ornamental plants. Rhododendrons of tomorrow could have desired morphological architecture and flower pigmentation, resistance to diseases, pests and harmful environmental conditions. Gene transfer experiments that were carried out so far, proved successful. More and more significant factors are discovered during each investigation. However, that study has to be worked out in order to optimize the efficiency of genetic transformation. Then, we can speculate that traditional rhododendron breeding will be hastened. Breeders will have exclusive plants whose genomes will be transformed in terms of desirable features.

Key words:

genetic transformation, *Rhododendron*, *Agrobacterium tumefaciens*, microprojectile bombardment.

Adres do korespondencji

Małgorzata Madej,
Katedra Genetyki, Hodowli
i Nasiennictwa,
Akademia Rolnicza
im. H. Kołłątaja,
Al. 29-go Listopada 54,
31-425 Kraków.

1. Wstęp

Różaneczniki należą do atrakcyjnych krzewów ozdobnych, które cieszą się coraz większym zainteresowaniem w ogrodnictwie. Istniejące odmiany, pomimo dużego zróżnicowania cech morfologicznych i fizjologicznych, nie spełniają jednak wszystkich oczekiwań konsumentów i są wciąż doskonalone. Dużą wagę obecnie przywiązuje się do cech warunkujących odporność roślin na niekorzystne czynniki środowiska, takie jak: niskie temperatury,

susza, zasolenie, a także odporność na choroby i szkodniki. Obecność tych cech pozwala na poszerzenie zasięgu uprawy, wpływa na jej ułatwienie, a tym samym zwiększa popularność różanecznika zarówno wśród wykwalifikowanych producentów jak i ogrodników-amatorów.

Tradycyjna hodowla nowych odmian (krzyżowanie międzyodmianowe, międzygatunkowe, selekcja wartościowych genotypów) jest trudna i długotrwała ze względu na wysoki poziom heterozygotyczności oraz występowanie barier przygotycznych i postzygotycznych. Wśród potomstwa występuje duże rozszczepienie cech, pojawiają się także niekorzystne kombinacje. Pożądane cechy (odporność na choroby, tolerancja na wysoką i niską temperaturę) często są sprzężone z niekorzystnymi właściwościami, tj. słabym rozmnażaniem, czy nieodpowiednim pokrojem roślin (1). Ponadto długi okres rozwoju roślin reprodukowanych drogą generatywną ogranicza szybki postęp hodowlany.

Rozwój genetyki molekularnej w ostatnich dwudziestu latach stworzył nowe możliwości modyfikowania roślin poprzez transformację genetyczną. Rośliny ozdobne, ze względu na swą specyficzną rolę, są bardzo dobrymi obiektami dla ulepszania za pomocą transformacji. Nie służą one jako pożywienie dla ludzi czy zwierząt, dlatego ich modyfikowanie nie budzi tylu kontrowersji (2). Zastosowanie transformacji genetycznej pozwala na ominięcie wielu barier krzyżowania i umożliwia włączenie do genomów roślinnych pojedynczych genów kodujących pożądane cechy. Metodę tę zastosowano już u szeregu gatunków roślin ozdobnych uzyskując interesujące wyniki. Uzyskano zmianę morfologii i pokroju roślin u róży (3), zmianę barwy kwiatów u chryzantemy (4), gerbery (5), róży (6), pelargonii (7) i petunii (8), zwiększenie produkcji składników zapachowych u pelargonii (9), poprawę trwałości kwiatów u goździków (10).

Prace nad transformacją różaneczników rozpoczęto w połowie lat dziewięćdziesiątych w kilku krajach, m.in. w Czechach, Niemczech i Japonii. Badania te wciąż znajdują się na etapie opracowania metodyki, która zapewniłaby uzyskanie odpowiednio licznej i stabilnej populacji zmienionych genetycznie roślin. Celem opracowania jest przegląd uzyskanych do tej pory wyników z zakresu transgenezy różaneczników prezentowanych na konferencjach naukowych i zamieszczonych w literaturze naukowej.

2. Geny stosowane w transformacji różanecznika

Geny, które wykorzystuje się w procesie transformacji mogą być wyizolowane z organizmów należących do różnych grup systematycznych, tj. bakterii, grzybów, roślin wyższych i zwierząt. Do tej pory brak jest informacji o genach różanecznika przenoszonych do innych gatunków i odmian tych roślin. W procesie transformacji wykorzystano wyłącznie z genów wyizolowanych z innych gatunków roślin uprawnych.

W pierwszych badaniach do genomu roślin należących do rodzaju *Rhododendron* wprowadzono geny selekcyjne i reporterowe, co służyło opracowaniu efektywnej meto-

dyki transformacji (tab.). Spośród genów selekcyjnych stosowano geny *npt II* i *hpt*, warunkujące oporność na antybiotyki. Ekspresja tych genów w tkankach i komórkach roślinnych umożliwia prowadzenie selekcji komórek, które uległy transformacji i są odporne na antybiotyki lub herbicydy zawarte w pożywce. Spośród genów reporterowych używany był gen *uidA* (*GUS*) kodujący enzym β -D-glukuronidazę, którego ekspresja pozwala zidentyfikować transformowane komórki w teście histochemicznym (11-21) i gen *gfp*, kodujący białko zielonej fluorescencji, pochodzący z *Aequorea victoria*, który powoduje świecenie transformowanych tkanek po wzbudzeniu światłem UV (20,22). Do identyfikacji transformantów w żywej tkance na poziomie makroskopowym zaproponowano także zastosowanie genów kodujących białka strukturalne antocyjanów (17).

Tabela

Wyniki badań nad transformacją różanecznika

Genotyp	Metoda transformacji	Transgeny	Eksplantat	Rodzaj i stężenie czynnika selekcyjnego	Efektywność transformacji	Literatura
1	2	3	4	5	6	7
<i>Rhododendron</i> : 'America', 'Catawbiense grandiflorum roseum', 'Madame Carvalho', 'Mars', 'Nova Zembla'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA 4404	<i>GUS</i> <i>nptIII</i> <i>cbs</i>	fragmenty łodygi	kanamycyna 20 mg/dm ³ 50 mg/dm ³ 100 mg/dm ³	zidentyfikowano obecność genu <i>GUS</i> u 27 roślin spośród 50 testowanych	(11,13,25)
<i>Rhododendron</i> 'Percy Wiseman'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA 4404	<i>GUS</i> <i>nptIII</i>	fragmenty liści, ogonków liściowych, łodyg	kanamycyna 100 mg/dm ³	zidentyfikowano obecność genu <i>GUS</i> u 6 roślin na 120 eksplantatów (5%)	(14)
<i>Rhododendron simsii</i> 'Hellmut Vogel'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGLO	<i>GUS</i> <i>nptIII</i>	fragmenty liści	kanamycyna 10 mg/dm ³ 20 mg/dm ³ wankomycyna 400 mg/dm ³	zidentyfikowano obecność genu <i>GUS</i> u ok. 3 roślin na 100 eksplantatów (2,9%)	(15,16)
<i>Rhododendron</i> 'Hino-crimson' 'Fuchsia'	mikrowstrzelianie	<i>GUS</i> <i>hpt</i>	fragmenty liści i łodyg, stożki wzrostu pędu	higromycyna 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 mg/dm ³	zidentyfikowano obecność genu <i>GUS</i> u 22,2% eksplantatów	(17)
<i>Rhododendron</i> ssp.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>GUS</i>	fragmenty liści, stożki wzrostu pędu	–	zidentyfikowano obecność genu <i>GUS</i> u 1-2 pędów na 100 eksplantatów	(23)

1	2	3	4	5	6	7
<i>Rhododendron</i> 'Catawbiense Album' L., 'America', 'Joe Paterno', 'Cunningham's White'	<i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> C58, B6 <i>Agrobacterium</i> <i>rhizogenes</i> E8/73	<i>nptII</i> <i>gfp</i>	fragmenty pędów	cefotaxime 300 mg/dm ³	zidentyfikowano obecność genu <i>gfp</i> w 3 eksplantatach	(22)
<i>Rhododendron</i> 'Catawbiense Album' L.	mikrowstrzeliwanie	<i>GUS</i> <i>nptIII</i> <i>hpt</i> <i>gfp</i>	fragmenty liści	kanamycyna 50 mg/dm ³ , 100 mg/dm ³ higromycyna 2,5 mg/dm ³ 5 mg/dm ³	uzyskano transge- niczne rośliny (brak danych ilo- ściowych)	(18-20)
<i>Rhododendron</i> 'Cunningham's White', Rh 10, Rh 33, Rh 37	<i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i>	<i>35SrolB</i> <i>rol ABC</i> <i>Fro2</i>	fragmenty liści	–	uzyskano 1-2% transgeniczných roślin	(12)
<i>Rhododendron</i> 'PJM Hybrid'	mikrowstrzeliwanie	<i>GUS</i>	fragmenty liści	–	zidentyfikowano obecność genu <i>GUS</i> w eksplanta- tach (brak danych ilościowych)	(21)

W dalszym etapie prac nad transformacją do genomu różaneczników wprowadzano geny użytkowe, odpowiedzialne za zmiany morfologii roślin, rozwój systemu korzeniowego, czy przyswajanie żelaza. Przykładem tych eksperymentów była transformacja roślin genami *rolC* pochodzących z *Agrobacterium rhizogenes*, w celu zmniejszenia dominacji szczytowej pędu i skrócenia długości międzywęźli (14) oraz *35S-rolB* i *rolABC*, odpowiedzialne za dobre ukorzenienie sadzonek i poprawę systemu korzeniowego rośliny (12,23). Autorzy otrzymali 14 transgeniczných linii różaneczników, z których 11 było transformowane genem *rolABC*, a 3 genem *35S-rolB*. Obserwowane zmiany (duże opóźnienie wzrostu, karłowaty wzrost, silnie rozwinięty system korzeniowy, mniejsze i/lub zdeformowane liście) mogłyby być interesujące dla hodowców zainteresowanych zmianą pokroju lub adaptacją roślin do gleb wapniowych (12,23). Do genomu różanecznika wprowadzono także gen *Fro2* (reduktazy chelatów żelaza), który pozwala na lepsze przyswajanie żelaza z gleby o niskiej zawartości tego pierwiastka. Na podstawie pomiarów aktywności reduktazy żelazowej u wielu linii tych transgeniczných różaneczników, hodowanych w kulturach wodnych o obniżonej zawartości żelaza, stwierdzono wzrost aktywności tego enzymu nawet o 50% (23).

Ważną cechą roślin ozdobnych jest barwa kwiatów, której zmiany mogą być także dokonywane poprzez blokowanie biosyntezy flawonoidów za pomocą genów sensowych i antysensowych (np. geny warunkujące syntezę antocyjanów: *chs*, *chi*, *dfr*) lub transfer nowych genów do genomów roślin (24). Pavingerova i wsp. otrzy-

mali sekwencje specyficzne dla regionu 3' genu *chs* u *Rhododendron* cv. *Catawbiense grandiflorum*, skonstruowali sekwencje antysensowego RNA i transformowali nimi rośliny różanecznika (badania kontynuowane) (25).

Planowane są prace nad transformacją różanecznika pod kątem uzyskania odporności na szkodniki, np. *Otiorrhynchus sulcatus* L. (opuchlak truskawkowiec) oraz choroby grzybowe, tj. mączniak prawdziwy, fytoftoroz, zgnilizna kwiatów czy plamistość liści (23). Według Knappa i wsp. wprowadzenie genów odporności na choroby grzybowe do różaneczników mogłoby ograniczyć stosowanie fungicydów podczas szkółkowania (19). Dla hodowców różaneczników interesujące byłoby także pozyskanie roślin z genami warunkującymi wczesne kwitnienie, powtarzanie kwitnienia latem lub jesienią, oryginalną budowę i zapach kwiatów oraz genami odporności na mróz, wysoką temperaturę i zasolenie gleby.

3. Metody transformacji

Różaneczniki transformowano głównie metodą pośrednią przez *Agrobacterium tumefaciens*. Do transformacji używano szczepów bakteryjnych: LBA4404 (11,13,14) i AGLO (15,16), choć stosowano też szczepy C58 i B6 oraz szczep E8/73 *Agrobacterium rhizogenes* (22). Mieszkańce różaneczników wykazywały różną podatność na infekcję. Mertens i wsp. wykazali, że różnice w efektywności transformacji przez szczep AGLO zależały od niesionego plazmidu. Największą efektywność transformacji obserwowano dla plazmidu pMOG410. Dzięki zastosowaniu tego właśnie plazmidu uzyskano transgeniczne azalie, w których wprowadzony gen *GUS* dziedziczył się zgodnie z prawami Mendla (15,16).

Transferu genów do różaneczników dokonywano także metodą bezpośrednią, poprzez mikrowstrzeliwanie – *microprojectile bombardment*. Hsia i Korban wykorzystali tę technikę do określania szczegółów metodycznych transformacji różnych mieszańców na podstawie chwilowej ekspresji wprowadzonych genów – *transient expression*. Badali oni efektywność transformacji dla różnych ciśnień gazu w komorze działa biobalistycznego PDS-1000/He (używanego do rozpędzania drobin wolframu) oraz różnych odległości między ekranem zatrzymującym gaz a bombardowaną tkanką (17). Moore i Tripepi na podstawie chwilowej ekspresji genu *GUS* oceniali wpływ warunków regeneracji *in vitro* na efektywność transformacji *Rhododendron* (21). Knapp i in. badali przydatność mikrowstrzeliwania u różaneczników pod kątem produkcji stabilnych transformantów. Histochemiczna analiza i metody molekularne potwierdziły obecność wprowadzonych genów u badanych roślin, ich integrację oraz stabilność w potomstwie rozmnażanym wegetatywnie (18-20) (tab.).

4. Czynniki wpływające na efektywność transformacji

Możliwości uzyskiwania transgenicznych różaneczników na masową skalę są ograniczone, ze względu na niską zdolność regeneracji oraz małą liczbę pędów uzyskiwanych na transformowanych eksplantatach.

Pavingerova i wsp., prowadzący badania nad transformacją różaneczników katawbijskich, stwierdzili, że zdolność regeneracyjna zależy od genotypu (13). Potwierdzono to w badaniach innych autorów dotyczących transformacji roślin z grupy *Rhododendron* 'Catawbiense-Hybridum'. Spośród badanych genotypów najlepiej regenerowały rośliny odmiany 'Cunningham's White' (22). Decydujący wpływ na przebieg regeneracji ma także rodzaj użytego eksplantatu (26). U *Rhododendron* sp. najczęściej transformowano: fragmenty liści, łodygi, ogonki liściowe oraz stożki wzrostu pędu (tab.). W badaniach *in vitro* dobre rezultaty uzyskano prowadząc regenerację z pąków kwiatowych (27), kultur załączków (28), kalusa (29) i fragmentów liści (30). Badacze niemieccy obserwowali regenerację kalusa z eksplantatów liściowych poddanych transformacji (wydajność 1-2%), ale nie uzyskali prawie w ogóle pędów, podczas gdy w doświadczeniu kontrolnym regeneracja kalusa i pędów z eksplantatów nietransformowanych wynosiła 90-100% (23). Inni badacze stosując eksplantaty liści różaneczników, uzyskali dla regeneracji posttransformacyjnej wydajność 2,9% (15,16). Po transformacji fragmentów pędu Pavingerova i wsp. zidentyfikowali obecność genu *GUS* u 27 roślin spośród 50 zregenerowanych roślin (11,13).

Kolejnym ważnym czynnikiem wpływającym na przebieg regeneracji posttransformacyjnej był skład pożywki. Do regeneracji transformowanych tkanek różaneczników stosowano najczęściej pożywkę Andersona z 1984 r. (14,15,17), pożywkę Andersona z 1980 r. z dodatkiem 2iP (6-dimetyloaliloaminopuryna), IAA (kwas indolilo-3-octowy) oraz PVP (poliwinylpirolidon), które redukowały negatywny wpływ związków fenolowych w czasie hodowli *in vitro* (11,13), pożywkę dla roślin drzewiastych WPM z dodatkiem 2iP (22). Moore i Tripepi zaobserwowali, że ekspresja genu *GUS* w eksplantatach różaneczników regenerowanych na pożywce z dodatkiem sacharozy była niższa niż na pożywce bez tego cukru. Zwiększoną ekspresję genu *GUS* stwierdzili w eksplantatach inkubowanych przed transformacją na pożywce regeneracyjnej przez 6-12 dni w ciemności (21). Skuteczność takiej prekultury potwierdzili także Dunemann i wsp., którzy regenerując eksplantaty liściowe przez 1-2 miesiące przed kokułtywacją z *Agrobacterium*, otrzymali 1-2% stabilnych transformantów (23).

Do najczęściej stosowanych antybiotyków selekcyjnych w pracach nad transformacją różaneczników należały: kanamycyna, higromycyna, wankomycyna i cefotaxime. Jednak stosowanie czynnika selekcyjnego bezpośrednio po zakończeniu kokułtywacji hamowało regenerację roślin. W dotychczas przeprowadzonych badaniach okres między zakażeniem a zastosowaniem pożywki selekcyjnej był różny: 24 godziny (11,13), 48 godzin (15), 4 dni (14), 6 tygodni (22).

Duży wpływ na regenerację transformowanych tkanek miało stężenie antybiotyków dodawanych do pożywki selekcyjnej. Niskie stężenie nie eliminowało wszystkich komó-

rek niestransformowanych („uciekiniery”) (31), podczas gdy wysokie hamowało regenerację. Hsia i Korban obserwowali zahamowanie regeneracji z fragmentów liści na pożywce z dodatkiem higromycyny o stężeniu powyżej 5 mg/dm³ (17). Pavingerova i in. określili optymalne stężenie kanamycyny jako 100 mg/dm³ (11).

5. Weryfikacja transgenicznego charakteru roślin

Proces tworzenia GMO nie kończy się wraz z uzyskaniem zregenerowanych roślin. Kolejnym ważnym etapem prac jest sprawdzenie obecności i integracji transgeny z genomem biorcy, ocena przebiegu transkrypcji i ewentualnej translacji. Dlatego wszystkie uzyskane w wyniku transformacji rośliny powinny być zbadane nie tylko metodą histochemiczną, ale również metodami molekularnymi.

Transformowane różaneczniki badano najczęściej metodą histochemiczną pozwalającą na ocenę ekspresji wprowadzanego genu *GUS*. Metodę tę stosowano wyłącznie do oceny chwilowej ekspresji w warunkach niesprzyjających regeneracji, w celu szybkiego określenia efektywności transformacji (17,21). W celu wykrycia wprowadzonego transgeny poza metodą histochemiczną w pozostałych badaniach stosowano również techniki PCR oraz *Southern blotting* (11,13,14,18,19). Do oceny przebiegu transkrypcji genów markerowych i selekcyjnych Mertens i wsp. stosowali metodę *Northern blotting* (16).

Transgeniczne różaneczniki wykazywały różny poziom ekspresji wprowadzonych genów. Bardzo wysoka była ekspresja genu *GUS* wśród eksplantatów badanych wkrótce po transformacji (70-100%) (23), podczas gdy po regeneracji uzyskiwano od 1 do 5% stabilnych transformantów (tab.). Pavingerova i wsp. wytłumaczyli to zjawisko powstawaniem tworów chimerycznych, które początkowo wykazują ekspresję transgeny, ale rozmnażane wegetatywnie „tracą” wbudowane geny. Ten niekorzystny efekt można przezwyciężyć poprzez transformowanie pojedynczych komórek roślinnych lub stosowanie wyższych stężeń antybiotyku (11).

6. Podsumowanie

Transformacja rodzaju *Rhododendron* niesie ze sobą bardzo duże szanse uzyskania w przyszłości różaneczników o pożądanym pokroju i barwie kwiatów, odpornych na choroby, szkodniki i niekorzystną temperaturę. Obecnie głównym czynnikiem ograniczającym zastosowanie tej metody w hodowli różaneczników jest niska wydajność procesu transformacji i regeneracji. Ich zoptymalizowanie może znacznie przyspieszyć tradycyjną hodowlę, która będzie wówczas dysponować elitarnymi roślinami o pożądanym cechach.

Literatura

1. Williams E. G., Rouse J. L., Palser B. F., Knox R. B., (1990), *Horticultural Reviews*, 12, 1-67.
2. Orlikowska T., Nowak E., (1996), *Hodowla i Nasiennictwo*, 3, 39-45.
3. Souo F., Coutos-Thevenot P., Yean H., Delbard G., Barbe J. P., Boulay M., (1995), *Abstracts of the 2nd Intern. Rose Symposium*, Antibes, VI-C1.
4. Lemieux C. S., Firoozabady E., Robinson K. E. P., (1990), *Integration of In Vitro Techniques in Ornamental Plant Breeding. Proceedings of the Eucarpia Symposium*, Wageningen, 150-155.
5. Elomaa P., Honkanen J., Puska R., Seppanen P., Helarjutta Y., Mehto M., Kotilainen M., Nevalainen L., Teeri T., (1993), *Bio/Technology*, 11, 508-511.
6. Holton T. A., Tanaka Y., (1994), *Trends in Biotechnol.*, 12, 40-42.
7. Boase M. R., Smith J. L., (1994), *Abstracts of the 8th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*, Firenze, 144.
8. Oud J. S. N., Schneiders H., Kool A. J., van Grinsven M. Q. J. M., (1995), *Euphytica*, 85, 403-409.
9. Pellegrineschi A., Damon J. P., Valtorta N., Paillard N., Tepfer D., (1994), *Bio/Technology*, 12, 64-68.
10. Robinson K. E. P., Firoozabady E., (1993), *Scientia Horticulturae*, 55, 83-99.
11. Pavingerova D., Briza J., Kodytek K., Niedermeierova H., (1997), *Plant Science*, 122, 165-171.
12. Dunemann F., Illgner R., Stange I., (2002), *Acta Horticulturae*, 572, 113-120.
13. Pavingerova D., Biskova R., Niedermeierova H., Kodytek K., (1995), *Acta Hort.*, 420, 89-91.
14. Ueno K., Fukunaga Y., Arisumi K., (1996), *Plant Cell Reports*, 16, 38-41.
15. Mertens M., Heursel J., de Loose M., (1997), *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische*, 64, 1483-1485.
16. Mertens M., Heursel J., van Bockstaele E., de Loose M., (2000), *Acta Horticulturae*, 521, 127-132.
17. Hsia C., Korban S. S., (1998), *Journal of American Rhododendron Society*, 52, 187-191.
18. Knapp J. E., Brand M. H., (1999), *Hort Science*, 34(3), 456.
19. Knapp J. E., Kausch A. P., Auer C., Brand M. H., (2000), *Northeast Section of American Society of Plant Physiologists*, (April 7-8).
20. Knapp J. E., Kausch A. P., Auer C., Brand M., (2001), *Plant Cell Rep.*, 20(8), 749-754.
21. Moore C. R., Tripepi R. R., (2003), *Acta Hort.*, 625, 363-369.
22. Tripepi R. R., George M. W., Sripo T., Johnsen S. A., Caplan A. B., (1999), *Hort Science*, 34, 455.
23. Dunemann F., Illgner R., Stange I., (1999), *Rhododendron und immergrüne Laubgehölze Jahrbuch*, 86-95.
24. Pavingerova D., (2000), *Rostlinna Vyroba*, 46(6), 284-288.
25. Pavingerová, D., Matoušek, J., Bříza, J., Niedermeierová, H., Novák, P., (2001), *Book of Abstracts from 20th International Eucarpia Symposium, Section Ornamentals - Strategies for New Ornamentals*, Melle, Belgium, (3-6 July), 68-69.
26. Iapichino G., Chen T. H. H., Fuchigami L. H., (1991), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27, 37-43.
27. Meyer M. M., (1982), *Hort Science*, 17, 891-892.
28. Dai C., Lamberth V. N., Taven R., Mertz D., (1987), *HortScience*, 22, 491-493.
29. Economou A. S., Read P. E., Spanoudaki M. J., (1988), *Acta Hort.*, 226, 209-216.
30. Iapichino G., McCulloch S., Chen T. H. H., (1992), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 30, 237-241.
31. Orlikowska T., (1999), *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej w Krakowie*, 318, 99-110.