

M. ZENKTELER, I. GUZOWSKA

O NIEKTÓRYCH ZAGADNIENIACH EKSPERYMENTALNEJ EMBRIOLOGII ROŚLIN

CZĘŚĆ II. ZAPYLANIE SŁUPKÓW I ZAPŁADNIANIE ZALĄŻKÓW *IN VITRO*

WSTĘP

Odkrycie podwójnego zapłodnienia u roślin przez Nawaszina w 1898 r. oraz znajomość praw Mendla pozwoliły na przeprowadzenie wielu prac nad otrzymaniem coraz to bardziej pożytecznych i doskonałych odmian i gatunków. Próbowano wprowadzać różne sposoby dla przewyciężenia barier w procesie zapłodnienia, ażeby otrzymać zarodki mieszańców między odmianami, gatunkami i rodzajami. Wiele krzyżówek nadal jeszcze nie udaje się i nie dochodzi do wykształcenia się żywotnych nasion z różnych przyczyn. Oto niektóre z nich:

- 1) Niezdolność ziarn pyłków do kiełkowania na obcym znamieniu.
- 2) Zbyt krótkie łagiewki pyłkowe nie dochodzące do zalążków.
- 3) Słaby i powolny wzrost łagiewek.
- 4) Pęknięcie łagiewek.
- 5) Wczesne odpadanie kwiatów, zanim jeszcze łagiewka dojdzie do zalążka.
- 6) Niewykształcanie się zarodków w zalążkach.

Chcąc zapobiec degeneracji zarodków próbuje się wyizolować je we wczesnych stadiach rozwojowych i hodować na pożywkach, co natrafia z kolei na duże przeszkody. Związane są one przede wszystkim z trudnością wyizolowania w stanie nieuszkodzonym tak małych obiektów, jak również ze stosowaniem niewłaściwych pożywek, co jest spowodowane nieznanymi wymaganiami odżywczych badanego materiału. Trudności te choć częściowo starano się pominąć przez hodowanie całych zalążków lub zalążni, zamiast izolowania prazarodków.

Technika hodowli zalążni *in vitro* została wprowadzona przez La Rue (1942), Jansena i Bonnera (1949) oraz Nitscha (1949). Zwykle jednak owoce nie wykształcały żywotnych nasion i były mniejsze od wytwarzanych w naturze. Zapyłone zalążnie niektórych gatunków roślin hodowali: Maheshwari i Lal (1961 a, b); Johri i Guha (1963); Nitsch (1963); Melnick i in. (1964). Niektóre z tych doświadczeń

okazały się bardzo interesujące. W wypadku np. hodowli załązni *Allium cepa* i *Iberis amara* owoce były tak samo duże, a nawet czasem większe od wytwarzanych przez rośliny uprawne w polu.

W podanych wyżej przykładach wzrost i rozwój zarodków odbywał się tylko w tych załązniach, które zostały zapłodnione w warunkach naturalnych. Wykonano również kilka udanych prób zapylenia i zapłodnienia *in vitro* poprzez zapylenie słupków w próbówce, przez wprowadzenie pyłków bezpośrednio do wnętrza załązni lub też przez umieszczenie pyłków na wyizolowanych załążkach, które hoduje się na specjalnie dobranych pożywkach.

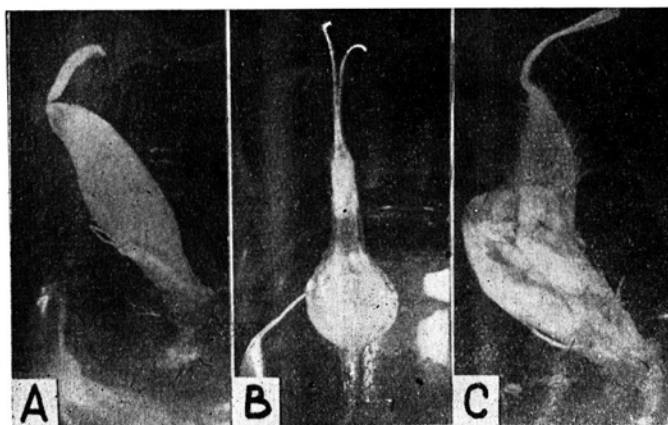
Zapylenie słupków. Istnieje jeszcze mało prac dotyczących zapylenia załązni i słupków *in vitro*. Dulieu (1963, 1966) wyszczepiał niezapylone słupki *Nicotiana tabacum* na pożywki zawierające makroelementy wg Haberlandta, mikroelementy wg Hellera, witaminy z grupy B, sacharozę, mleko kokosowe i różne aminokwasy. Słupki zapyłano w dniu wyszczepienia, albo następnego dnia. Zapłodnienie zachodziło u 25% załążków, jednak w załązni wykształcało się tylko 10—15 nasion. Nasiona te kiełkowały *in situ* albo po przeniesieniu na świeżą pożywkę; w obu wypadkach rozwijały się prawidłowo wykształcone rośliny.

Shivanna (1965) wyszczepiał słupki *Petunia violacea* na pożywkę mineralnej Nitscha i zapyłał je w dniu wyszczepienia lub następnego dnia. Słupki wycinano wraz z krótką szypułką, całość sterylizowano wodą chlorową, płukano kilka razy w wodzie sterylnej i przenoszono na pożywkę. W niektórych przypadkach słupki hodowano razem z kielichem, lecz płatki i pręciki zawsze usuwano. Okazało się, że zachowany kielich wpływa korzystnie na embriogenezę w warunkach hodowli *in vitro*. Analiza histologiczna doświadczalnego materiału wykazała, iż zapylenie, zapłodnienie i rozwój zarodka przebiegały prawidłowo i w każdej załązni znajdowano od 150—200 nasion z dojrzałymi zarodkami zdolnymi do kiełkowania po przeniesieniu na świeżą pożywkę. Podobnie udało się otrzymać nasiona przy zapyleniu słupków hodowlanych *in vitro* u *Antirrhinum majus* (Usha 1965) i u *Nicotiana rustica* (Rao 1965). U *Nicotiana* nasiona kiełkowały w załązni zanim jeszcze przeniesiono je na świeżą pożywkę i wtedy korzenie przebijały ścianę załązni kierując się w stronę pożywki.

Zenkter (praca nie opublikowana) również przeprowadził doświadczenia nad zapyleniem słupków w hodowli *in vitro* u *Lathyrus odoratus*, *Pisum sativum* i *Saponaria sp.* (Ryc. 1). U dwóch pierwszych roślin obserwowano proces zapylenia, zapłodnienia i rozwój prazarodka aż do pojawienia się zaczątków liści. Nigdy jednak nie dochodziło do wykształcenia się dojrzałych zarodków. U *Saponaria* natomiast embriogeneza przebiegała do końca, jakkolwiek u bardzo niewielkiej liczby załążków (znajdowało zaledwie od 1—3 nasion w każdej załązni).

Pobudzenie pyłków do kiełkowania na znamieniu na ogół nie natrafia na duże trudności. Wydaje się, że warunki do kiełkowania na znamieniu są mniej lub bardziej jednolite i pyłki mogą kiełkować nawet na znamionach roślin oddalonych pod względem systematycznym (np. pyłki *Lathyrus* na znamionach *Convallaria*). Czasami jednak pyłki nie kiełkują z powodu braku boru lub auksyn lub też na skutek

występowania grubej kutykuli pokrywającej brodawki znamion. Obydwie przeszkody w pewnym stopniu można usunąć, gdyż np. bor i auksyny o określonym stężeniu można rozpylić na znamieniu, a kutykulę rozpuścić przy użyciu kutynazy albo poprostu delikatnie rozgnieść. Praktykuje się także odcięcie znamienia i założenie sztucznego, sporządzonego z cukru, żelatyny i innych substancji. Duża trudność leży we wroście łagiewki pyłkowej i przejściu jej przez szyjkę słupka. Może to być spowodowane albo tym, że łagiewka jest za krótka i nie dojdzie do załączka, albo tkanka szyjki słupka, przez którą przebija się łagiewka, jest niedostosowana do typu łagiewki i przez to hamuje lub uniemożliwia jej wzrost.



Ryc. 1. Zapylenie *in vitro* słupków

A — *Pisum sativum*; B — *Saponaria* sp.; C — *Lathyrus odoratus*. Fotografie wykonane 2 tygodnie po zapyleniu (Zenkeler, niepubl.)

Stale jeszcze posiadamy mało wiadomości na temat zmian jakie dokonują się na znamieniu i w szyjce słupka w okresie od zapylenia do zapłodnienia. Badania morfologiczne i anatomiczne w połączeniu ze śledzeniem zmian biochemicznych w komórkach oraz sposób wzrostu łagiewki mogą okazać się bardzo owocne dla badań nad sterylnością u roślin.

Zapylenie wewnątrzzałążniowe. Strasburger (1886) należał przypuszczalnie do pierwszych botaników opracowujących technikę wewnątrzzałążniowego zapylenia. Dahlgrenowi (1962) udało się doprowadzić do zapłodnienia załączki u *Codonopsis ovata* poprzez odcięcie szyjki słupka i umieszczenie pyłków na szczycie załączki. Podobne doświadczenia przeprowadzili Cappelletti (1937) u *Digitalis purpurea* i Bosio (1940) u *Helleborus* i *Paeonia*.

Ostatnio badania nad wewnątrzzałążniowym zapyleniem zostały bardzo starannie i skutecznie przeprowadzone u przedstawicieli rodziny *Papaveraceae* (Kanta 1960; Maheshwari i Kanta 1962, 1964; Kanta i in. 1962; Kanta i Maheshwari 1963). Zanim przystąpiono do doświadczeń, ustalono czas otwierania się kwiatów, wysypywania pyłków i zapylenia, opracowano technikę zbierania pyłków

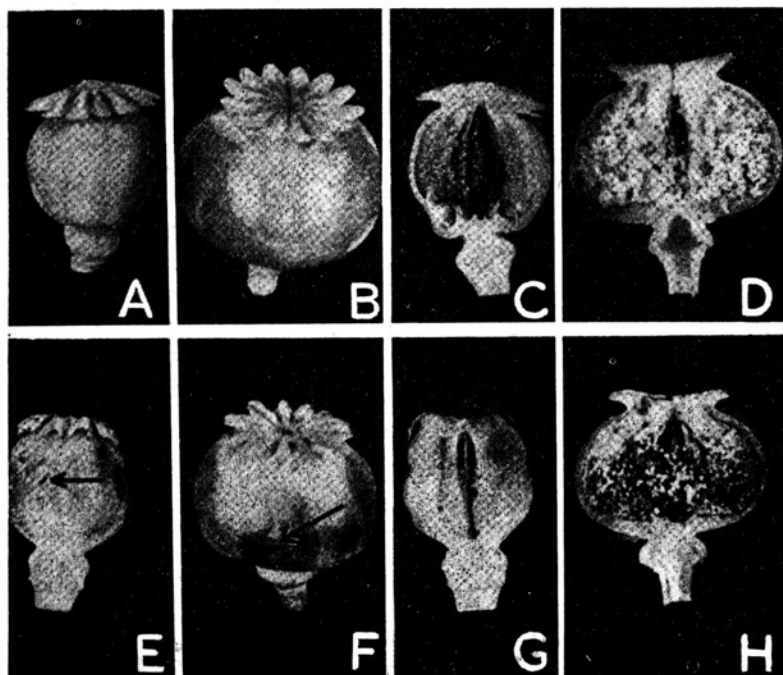
w warunkach sterylnych oraz opracowano metodę wstrzykiwania pyłków do zalążni. Na podstawie wstępnych wyników wybrano do doświadczeń następujące gatunki: *Papaver rhoeas* L., *P. somniferum* L., *Eschscholzia californica* Chem., *Argemone mexicana* L., *A. ochroleuca* Sweet. Dla hodowli pyłków posługiwano się metodą kropli wiszącej. Używano wody wodociągowej i podwójnie destylowanej z dodatkiem sacharozy i kwasu borneyo w różnych koncentracjach. Największy procent wykiełkowanych pyłków i najdłuższe łagiewki pyłkowe otrzymano hodując pyłki w podwójnie destylowanej wodzie z dodatkiem 100 mg/l kwasu borneyo. Jedna kropla takiego roztworu zawierała od 100—300 ziarn pyłkowych. Celem zabezpieczenia słupek przed zapyleniem na 24 lub 48 godz. przed doświadczeniem z wyselekcjonowanych pąków kwiatowych wycinano pylniki i następnie pąki obwiązywano celofanowym kapturkiem. Przed samym doświadczeniem, tzn. w dniu, kiedy kwiat otwierał się, albo jeden dzień później, zalążnie wycierano wata namoczoną w etanolu i przekłuwano ścianę zalążni w 2 miejscach. Jeden otwór służył do wprowadzenia pyłków, a drugi po przeciwnej stronie do wydostania się powietrza na zewnątrz. Roztwór z pyłkami wstrzykiwano przy użyciu 1 ml strzykawki (przed „zastrzykiem“ wstrząsano strzykawką, ażeby równomiernie rozprowadzić pyłki w roztworze). Po wprowadzeniu roztworu do zalążni obydwa roztwory zalepiano specjalną wazeliną — *petroleum jelly*. Doświadczenie przeprowadzono w pięciu wariantach: 1. Zalążnie nakłuwano, ale nie wprowadzano pyłków i kwiaty z powrotem obwiązywano kapturkiem. 2 i 3. Wstrzykiwano pyłki w roztworze kwasu borneyo o stężeniu 100 i 200 mg/l według metody opisanej powyżej. 4. Roztwór z pyłkami wprowadzono do zalążni przez nacięcie w ścianie lub przez otwór otrzymany po odcięciu znamienia. 5. W podobny sposób wprowadzono „pyłki suche“. Jako kontrole służyły rośliny zapylane w warunkach naturalnych.

Celem przesłedzenia zapłodnienia oraz rozwoju nasienia materiał utrwalono w odstępach 3-dniowych, następnie zatapiano w parafinie, krojono na mikrotomie i przeprowadzano obserwacje mikroskopowe.

W kwiatach kontrolnych *Papaver* pyłki kiełkowały na znamieniu i po 24 godzinach łagiewki dochodziły do mikropyle. Podwójne zapłodnienie następowało w ciągu 3 dni od zapylenia i po następnych 3 dniach w woreczkach zalążkowych spotykano 2—5 komórkowe prazarodki z bielmem jądrowym. Po 15 dniach od momentu zapylenia w nasionach występowały już dojrzałe zarodki i ok. 4000 nasion wypełniało torebkę. U *Eschscholzia* i *Argemone* procesy te przebiegały w podobny sposób.

W pierwszym wariacie doświadczalnym, tj. w wypadku, kiedy zalążnie nakłuwano bez wprowadzenia pyłków, zalążnie powiększały się nieco, jednak wkrótce potem wysychały nie wytwarzając nigdy żywotnych nasion.

Pyłki wprowadzone do komory zalążni metodą wstrzykiwania kiełkowały i niektóre łagiewki wnikały przez mikropyle do zalążków. Zapłodnienie miało miejsce po 2—4 dniach. Rozwój zarodka i bielma przebiegał w podobny sposób jak u roślin kontrolnych, jakkolwiek torebki były nieco mniejsze (Ryc. 2, 3). U *Papaver somniferum* największa liczba nasion powstawała w tych przypadkach, kiedy pyłki wprowadzono do zalążni przez otwór powstały po usunięciu znamienia.



Ryc. 2. *Papaver somniferum*. A — D zalążnie kontrolnie zapylane w warunkach naturalnych. A — zalążnia w dniu otwarcia kwiatu; B — owoc 24 dni po otwarciu kwiatu; C — D przekroje podłużne zalążni A i B; E — H zalążnie po wewnątrzzałazniowym zapyleniu pyłkami zawieszonymi w roztworze 100mg/l kwasu bornego; strzałki wskazują miejsca nakłucia; E — zalążnia w dniu wprowadzenia pyłków; F — owoc po 27 dniach hodowli; G — H podłużne przekroje zalążni E i F (Wg Kanta 1963)

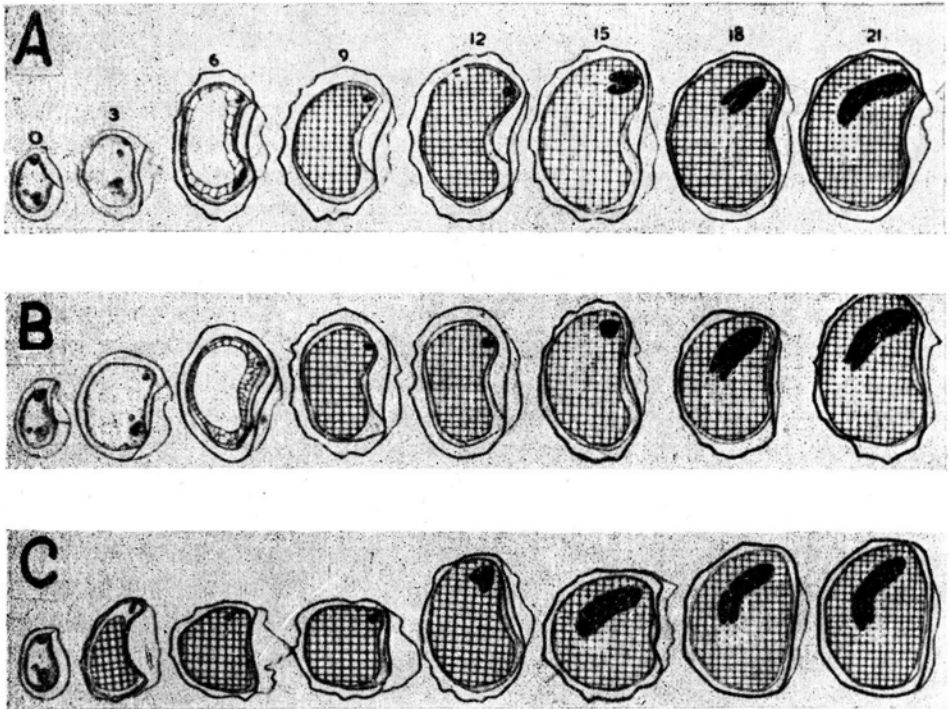
U *Eschscholzia* najlepsze wyniki otrzymano gdy wstrzykiwano pyłki w roztworze kwasu bornego o stężeniu 200 mg/l. Owoce dojrzewały w tym samym czasie co kontrolne, jednak przeciętnie ilość nasion w puszkach wynosiła tylko 25% w porównaniu do kontrolnych. U *Argemone* nie otrzymano nasion w ogóle, jeżeli do zalążni wstrzykiwano pyłki w postaci zawiesiny. Natomiast kiedy przecinano ścianę zalążni i wprowadzano pyłki w postaci suchej, otrzymano dużą liczbę zdrowych nasion.

Równocześnie robiono doświadczenia nad krzyżówką pomiędzy *Argemone mexicana* i *A. ochroleuca*. *A. mexicana* jest diploidem o $n = 14$, a *A. ochroleuca* jest tetraploidem o $n = 28$. Krzyżówki w naturze zachodzą rzadko i z tego względu próbowano zastosować zapylenie wewnątrzzałazniowe. W krzyżówce *A. ochroleuca* (♀) × *A. mexicana* (♂) nasiona nie zawiązywały się, kiedy wstrzykiwano zawiesinę pyłków; przy wprowadzeniu „suchych“ pyłków poprzez nacięcie w ścianie zalążni, pewna liczba pyłków kiełkowała, łagiewki wnikały do mikropyle i w tych przypadkach rozwijały się normalne zarodki i bielmo. Przeciętnie otrzymano 10 żywotnych nasion, choć w pewnych przypadkach znajdowano ich aż 30 i więcej.

W krzyżówce odwrotnej *A. mexicana* (♀) × *A. ochroleuca* (♂) — pyłki pocho-

dzące tym razem z roślin tetraploidalnych — kiełkowały o wiele lepiej. Również przeciętna liczba nasion w torebce była większa i wynosiła od 30—50. Nasiona otrzymane w wyniku obydwu doświadczeń wysiewano w glebie, gdzie kiełkowały dając prawidłowo rozwinięte, zdrowe rośliny.

Zapłodnianie zalążków. Zapłodnianie zalążków na pożywkach należy do wyjątkowo trudnych zadań. Jak dotychczas, tylko u kilku roślin udało się otrzymać nasiona w wyniku zapłodniania zalążków *in vitro*, mimo że przeprowadzono szereg doświadczeń nad wieloma gatunkami. W pracach tych albo hoduje się na pożywce pojedyncze nagie zalążki, albo wyszczepia się zalążki wraz z łożyskiem. W obydwu przypadkach na zalążki wysypuje się ziarna pyłków, które albo kiełkują na pożywce (tak jak w przypadku pierwszym, kiedy hoduje się nagie zalążki), albo też kiełkują na zalążkach przyrośniętych do łożyska i wtedy mogą nie pozostawać w bezpośrednim kontakcie z pożywką.



Ryc. 3. *Papaver somniferum*. Wzrost i rozwój nasion po zapyleniu i zapłodnieniu w warunkach naturalnych i sztucznych. A — zapylenie i zapłodnienie w warunkach naturalnych; B — wewnątrzzałożniowe zapylenie i zapłodnienie; C — zapylenie i zapłodnienie izolowanych zalążków w próbówce. O — 21 liczba dni od otwarcia pąka kwiatowego. Obszar zakreskowany — bielmo; zakropkowany — obielmo; czarny — zarodek

Istotną rolę odgrywa tu dobór właściwej pożywki. Powinna ona być na tyle uniwersalna, ażeby umożliwiła hodowlę zalążka, kiełkowanie pyłku i równocześnie dostarczała potrzebnych związków dla rozwijającego się prazarodka, zarodka

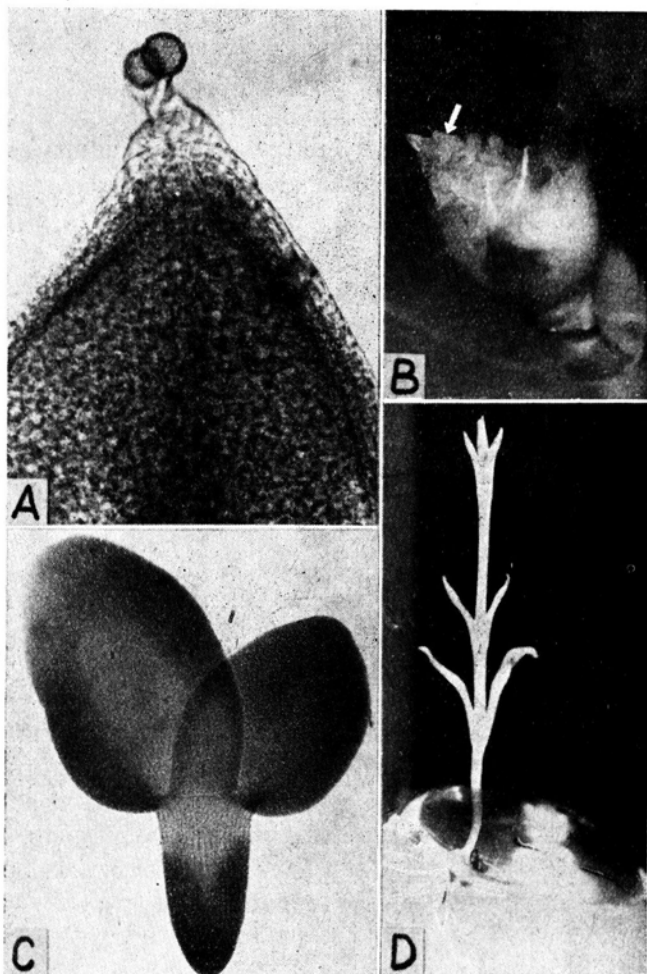
i bielma. Dużą trudność stanowi izolacja zalążków w stanie nieuszkodzonym oraz zachowanie pełnej sterylności. Uniknięcie zakażeń nie jest łatwe, ponieważ do doświadczeń używa się olbrzymiej liczby pyłków pochodzących z niewysterylizowanych pylników. Z tych to powodów w pracach nad zapładnianiem zalążków należy posługiwać się ogromną ilością materiału wyjściowego, gdyż z góry trzeba założyć, że wysoki procent doświadczalnego materiału zdegeneruje, lub zostanie zakażony już na samym wstępie.

Kanta i Maheshwari (1964) przeprowadzili udane doświadczenia u 5 gatunków roślin: *Papaver somniferum* L., *Argemone mexicana* L., *Eschscholzia californica* Cham., *Nicotiana rustica* i *N. tabacum*. Z szeregu próbnych pożywek wybrano jedną dla wszystkich gatunków roślin. Była to pożywka mineralna Nitscha z kompletem witamin i glicyną według Rangaswamy, sacharozą w stężeniu 5% i agarem 0,7%. W niektórych przypadkach dodawano do pożywki hydrolizat kazeiny w stężeniu 500 ppm. Kwiaty, z których pobierano zalążki do hodowli, były kastrowane jeszcze w stadium pąka i obowiązywane torebką z celofanu, ażeby zapobiec ewentualnemu zapyleniu. W dniu otwarcia kwiatów słupki izolowano, sterylizowano 10—15 min. w wodzie chlorowej i w warunkach aseptycznych wycinano zalążki. Część pąków kwiatowych, z których nie wycinano pylników, 24 godziny przed otwarciem kwiatów i pyleniem także obwiązywano torebkami celem uchronienia pyłków od zakażeń z zewnątrz. Następnego dnia w warunkach sterylnych przenoszono pyłek na zalążki. Sporządzono 4 grupy kultur:

1. Zalążki bez pyłków.
2. Zalążki wraz z łożyskiem i też bez pyłków.
3. Zalążki razem z pyłkami.
4. Zalążki wraz z łożyskiem i pyłkami.

Zalążki wycięte wraz z łożyskiem, lecz niezapylone, zamierały już po kilku dniach hodowli; podobnie szybko ginęły niezapylone zalążki nagie. Natomiast w przypadkach, kiedy zalążki hodowano razem z pyłkami, ziarna pyłków kiełkowały już po około 15 min. i łagiewki kierowały się w stronę mikropyle. Zapłodnione zalążki powiększały się silnie i po tygodniu przypominały zalążki kontrolne w naturze. Wczesne stadia rozwoju bielma i zarodka przebiegały podobnie jak u kontrolnych, a nawet często szybciej. W ciągu dalszych dni hodowli wykształcały się w pełni rozwinięte zarodki, które po przeniesieniu na świeżą pożywkę kiełkowały dając zdrowe i prawidłowo rozwinięte rośliny. Tak więc stan spoczynku nasion, normalnie obserwowany w nasionach wytwarzanych w naturze, został tu pominięty. U wszystkich pięciu gatunków roślin największa liczba nasion powstała wtedy, gdy zapylano zalążki przyrośnięte do łożyska. U *Eschscholzia californica* zarodek rozwijał się prawidłowo, jakkolwiek bielmo było bardzo ubogie i wczesnie degenerowało. Zarodki jednak po przeniesieniu na świeżą pożywkę rozwijały się w normalnie wykształcone rośliny. Ciekawie zachowywała się czasem część hypokotylarna takiej rośliny. Mianowicie hypokotyl silnie poroliferował i z kalusa po przeniesieniu na pożywkę wyrastały utwory przypominające zarodki, z których następnie powstawały siewki.

Ostatnio Zenkteler (1965) prowadził doświadczenia nad niektórymi przedstawicielami z rodziny *Caryophyllaceae*. Dodatkowo wyniki otrzymano w hodowli zalążków wraz z łożyskiem u *Dianthus caryophyllus* Linn. Przy wyszczepianiu zalążków razem z łożyskiem zachowywano także krótką szypułkę i część kielicha, dzięki czemu w pożywce znajdowała się tylko szypułka, a łożysko wraz z zalążkami



Ryc. 4. Zapłodnienie zalążków u *Dianthus caryophyllus*. A — dwie łagiewki pyłkowe wnikają do mikropyle zalążka; B — hodowle 8-dniowe; rozwijające się zalążki umieszczone są na łożysku; C — zarodek wyizolowany z zalążka 12 dni po zapłodnieniu; D — siewka rozwinięta z nasienia otrzymanego w wyniku zapłodnienia zalążka *in vitro* (Wg Zenktelera 1965)

wystawało kilka mm ponad pożywką. Technika pracy oraz skład pożywek były podobne jak w pracach opisanych poprzednio. U *Dianthus caryophyllus* zapłodnienie i embriogeneza przebiegały w bardzo krótkim czasie, gdyż już po 12 dniach

od momentu zapylenia otrzymano dojrzałe zarodki, które kiełkowały po przeniesieniu na świeżą pożywkę. W ciągu następnych pięciu tygodni hodowli rozwinęły się normalnie wykształcone młode rośliny (Ryc. 4).

PODSUMOWANIE

Metodę zapylenia zalążni i zapładniania zalążków *in vitro* użyto jak dotychczas z powodzeniem tylko w kilku doświadczeniach, pomimo że próbowano stosować ją u różnych gatunków roślin 2-liściennych. Pozytywne rezultaty dotyczyły takich roślin, które w warunkach naturalnych przechodzą cały cykl reprodukcji wytwarzając płodne nasiona. Były to rośliny z rodziny *Papaveraceae*, *Caryophyllaceae* i *Solanaceae*, które stanowią wyjątkowo korzystny materiał ze względu na dużą zalążnię z licznymi zalążkami. Do wnętrza takiej zalążni można łatwo wprowadzić pyłki przy użyciu strzykawki lub nacięcia ściany. Pomimo że zalążnia zostaje zraniona i nawet część zalążków ulega zniszczeniu, nadal jednak zalążnia jako całość rozwija się i w niektórych zalążkach wykształcają się normalne zarodki. Duże łożysko z licznymi zalążkami stanowi pewny i wygodny materiał doświadczalny. Materiał taki łatwo jest sterylizować, izolacja w warunkach sterylnych jest stosunkowo szybka i nie wymaga użycia binokularu, co tym samym zmniejsza procent zakażeń. Poza tym wyszczepienie dużej liczby zalążków na jednym łożysku daje większą szansę przeżycia i dalszego rozwoju choćby kilku z nich, niż w przypadku wyszczepienia tylko jednego zalążka z ubogim łożyskiem, który po długotrwałej manipulacji i cięciu skalpelem ulega zwykle częściowemu lub całkowitemu zniszczeniu.

Robiono próby zapładniania na pożywkach zalążków m. in. u przedstawicieli z rodziny *Papilionaceae* i *Cruciferae*, jednak jak narazie doświadczenia te nie powiodły się. U niektórych roślin krzyżowych natrafia się na trudności w pobudzeniu pyłków do kiełkowania. Poza tym zalążki po przeniesieniu na pożywkę wcześniej zamierają, co wskazywałoby, że albo skład pożywki jest nieodpowiedni, albo sama izolacja powoduje na tyle poważne zaburzenia w komórkach zalążka, że w konsekwencji po przeniesieniu na pożywkę następuje ich śmierć. U niektórych roślin motylkowych np. *Pisum* i *Lathyrus* pyłki łatwo kiełkują na różnych pożywkach, jednak zwykle nie dochodzi do zapłodnienia, kiedy umieści się pyłki na wyizolowanych zalążkach.

Pomimo — jak na razie — niewielu udanych jeszcze eksperymentów, należy spodziewać się, że dalsze prace potrafią przełamać przeszkody, na jakie obecnie natrafia się przy zapładnianiu zalążków *in vitro*. Umiejętne wykorzystanie warunków sztucznych dla przeprowadzenia cyklu reprodukcyjnego roślin, które w warunkach naturalnych są sterylne, albo których nie można krzyżować, stanowi cel, którego osiągnięcie będzie dla eksperymentalnej embriologii roślin sukcesem o ogromnym znaczeniu.

LITERATURA

- Bosio M. G., Ricerche sulla fecondazione intraovarica in *Helleborus* e *Paeonia*, *Nuovo G. bot. ital.* 47: 591—598. *
- Butenko R. G., Jakovleva S. M., 1962. Controlled organogenesis and regeneration of a whole plant in a culture of non-differentiated plant tissue, *Izv. Akad. Nauk SSSR. Biol. Ser.* 2: 230—241.
- Cappelletti C., 1937. Ricerche preliminari sulla fecondazione intraovarica in *Digitalis purpurea* L., *Nuovo G. bot. ital.* 44: 613. *
- Curtis J. T., Nichol M. A., 1948. Culturing of proliferating orchid embryos in vitro, *Bull. Torrey bot. Cl.* 75: 358.
- Czajkowska-Hoffmanowa A., 1956. O hodowli zarodków roślinnych in vitro, *Kosmos, seria A, rok V*: 539—551.
- Dahlgren K. V. O., 1926. Anormal pollination, *Svensk bot. Tidskr.* 20, 97.
- Dulieu H. L., 1963. Sur la fécondation in vitro chez le *Nicotiana tabacum* L., *C. R. Acad. Sci. Paris* 256: 3344—3346.
- Dulieu H. L., 1966. Pollination of Excised Ovaries and Culture of Ovules of *Nicotiana Tabacum* L., *Phytomorphology*, w druku.
- Earle E. D., Torrey J. G., 1965. Morphogenesis in cell colonies grown from *Convolvulus* cell suspensions plated on synthetic media, *Amer. Jour. Bot.* 52: 891—899.
- Fitting H., 1909. Die Beeinflussung der Orchideenblüten durch die Bestäubung und durch andere Umstände, *Zeitschr. Bot.* 1: 1—86.
- Gärtner K. F., 1849. Versuche und Beobachtungen über die Bastard—zeugung im Pflanzenreich, Stuttgart. *
- Guha S., Maheshwari S. C., 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*, *Nature*, 204, 4957, 497.
- Haccius B., 1955. Experimentally induced twinning in plants, *Nature* 176: 355—356.
- Haccius B., 1965. Wie reagieren Pflanzen-Embryonen auf Strahlenschäden? *Umschau*, 65: 295—298.
- Haccius B., Lakshmanan K., 1965. Adventive embryonen aus *Nicotiana-Kallus* der bei hohen Lichtintensitäten kultiviert wurde, *Planta*, 65: 102—104.
- Halperin W., 1964. Morfogenetic studies with partially synchronized cultures of carrot embryos, *Science*, 146, 3642: 408—410.
- Halperin W., Wetherell D. F., 1964. Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*, *Amer. Jour. Bot.* 51: 274—283.
- Jansen L. L., Bonner J., 1949. Development of fruits from excised flowers in sterile culture, *Amer. Jour. Bot.* 36, 826.
- Jaranowski J., 1965. O żywotności ziarn pyłków w warunkach naturalnych i przy ich sztucznym przechowywaniu, *Wiad. Bot.* 9: 295—304.
- Joffe M. D., Żhukowa G. J., 1965. Kultura izolowanych zarodyszej pokrytosiemiannych rastienii na iskustwiennoj sredie, *Bot. Żurnal*, 50, 8.
- Johri B. M., Vasil I. K., 1961. Physiology of pollen, *Bot. Review*, 27: 325—381.
- Johri B. M., Bajaj Y. P., 1963. In vitro response of the embryo of *Dendrophthoe falcata* (L.f.) Ettings. *Plant Tissue and Organ Culture — A Symposium. Delhi.* (ed Maheshwari P., Rangaswamy N. S.) 292—301.
- Johri B. M., Guha S., 1963. The technique of in vitro culture in the study of physiology of reproduction, *Jour. Indian Bot. Soc.* 42A: 58—73.
- Johri B. M., Sehgal C. B., 1963a. Chemical induction of polyembryony in *Anethum graveolens* L., *Naturwissenschaften*, 50: 47—48.
- Johri B. M., Sehgal C. B., 1963b. Growth of ovaries of *Anethum graveolens* Linn., *Plant Tissue and Organ Culture — A Symposium* (ed. Maheshwari P., Rangaswamy N. S.): 253—264.
- Johri B. M., Sehgal C. B., 1965. In vitro production of neomorphs in *Anethum graveolens* L., *Nature*, 205, 4978, 1337.

* Publikacja nie przeczytana w oryginale.

- Joshi P. C., 1962. In vitro growth of cotton ovules, *Plant Embryology — A Symposium*, New Delhi: 199—204.
- Kanta K. 1960. Intraovarian pollination in *Papaver rhoeas* L., *Nature* 188: 683—684.
- Kanta K., Rangaswamy N. S., 1962. Test-tube fertilization in a flowering plant, *Nature*, 194: 1214—1217.
- Kanta K., Maheshwari P., 1963. Intraovarian Pollination in some *Papaveraceae* *Phytomorphology*, 13: 215—229.
- Kanta K., Maheshwari P., 1964. Test-tube fertilization in some *Angiosperms*, *Phytomorphology*, 13: 230—237.
- Kohlenbach H. W., 1965. Über Organisierte Bildungen Aus *Macleaya cordata* Kallus, *Planta*, 64: 37—40.
- Konar R. N., Nataraja K., 1964. In vitro control of floral morphogenesis in *Ranunculus sceleratus*, *Phytomorphology*, 14: 558—563.
- Konar R. N., Nataraja K., 1965a. Experimental studies in *Ranunculus sceleratus* L. Development of embryos from the stem epidermis, *Phytomorphology*: 132—137.
- Konar R. N., Nataraja K., 1965b. Differentiation of embryoids in tissue cultures of floral buds of *Ranunculus sceleratus* L., *Naturwissenschaften*, 52: 140—141.
- Konar R. N., Nataraja K., 1965c. Production of embryoids from the anthers of *Ranunculus sceleratus*, *Phytomorphology*, 15, 245—248.
- Konar R. N., Oberoi Y. P., 1965. In vitro development of embryoids on the cotyledons of *Biota orientalis*, *Phytomorphology*, 15: 137—140.
- LaRue C. D., 1942. The rooting of flower in sterile culture, *Bull. Torrey bot. Club*, 69: 332—341.
- Maheshwari N., Lal M., 1961a. In vitro culture of excised ovules of *Papaver somniferum* L., *Phytomorphology*, 11: 307—314.
- Maheshwari N., Lal M., 1961b. In vitro culture of ovaries of *Iberis amara* L., *Phytomorphology*, 11: 17—23.
- Maheshwari P., Baldev B., 1962. In vitro induction of adventive buds from embryos of *Cuscuta reflexa* Roxb. *Plant Embryology — A Symposium*, New Delhi: 129—138.
- Maheshwari P., Kanta K., 1962. Intraovarian pollination in *Eschscholzia californica* Cham. and *Papaver rhoeas* L., *Plant Embryology: A Symposium*, New Delhi: 146—156.
- Maheshwari P., Sachar R. C., 1963. Polyembryony, *Recent Advances in the Embryology of Angiosperms*, ed. Maheshwari, P., Delhi: 265—296.
- Maheshwari P., Kanta K., 1964. Control of fertilization, *Pollen physiology and fertilization*, Amsterdam, (ed. Linskens H. F.), 187—193.
- Maheshwari S. C., Gupta G., Guha S., 1965. In vitro production of buds from leaves of *Nicotiana tabacum*, *Naturwissenschaften*, 52: 623—624.
- Massart J., Sur la pollination sans fecondation, *Bull. Jard. Bot.*, 1: 89—95. *
- Melnick V. L., Holm L., Struckmeyer B. E., 1964. Physiological studies on fruit development by means of ovule transplantation in vivo, *Science*, 145: 609—611.
- Muir W. H., Hildebrandt A. C., Riker A. J., 1958. The preparation, isolation and growth in culture of single cells from higher plants, *Amer. Jour. Bot.* 45: 589—597.
- Narayanaswami S., Norstog K., 1964. *Plant embryo culture*, *Bot. Review*, 30: 587—628.
- Nitsch J. P., 1949. Culture of fruits in vitro, *Science*, 110, 499.
- Nitsch J. P., 1963. The in vitro culture of flowers and fruits, *Plant tissue and organ culture — A Symposium* (ed. Maheshwari P., Rangaswamy N. S.) Delhi: 198—214.
- Nitsch J. P., 1963. Fruit development, *Recent Advances in the Embryology of Angiosperms*, (ed. Maheshwari P.), Delhi: 361—394.
- Norstog K., 1965. Induction of apogamy in megagametophytes of *Zamia integrifolia*, *Amer. Jour. Bot.*, 52: 993—999.
- Raghavan V., 1966. Nutrition, growth and morphogenesis of plant embryos, *Biol. Review*, 41: 1—58.
- Rangaswamy N. S., 1958. Culture of nucellar tissue of *Citrus* in vitro, *Experientia* 14: 111.

- Rangaswamy N. S., 1959. In vitro studies on the ovules of *Citrus microcarpa* Bunge., Ph. D. thesis, Univ. Delhi, India.
- Rangaswamy N. S., 1961. Experimental studies on female reproductive structures of *Citrus microcarpa* Bunge., *Phytomorphology*, 11: 109—127.
- Rao P. S., 1965. In vitro fertilization and seed formation in *Nicotiana rustica* L., *Phyton* (Argentina), 22: 165—167.
- Reinert J., 1959. Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten, *Planta* 53: 318—333.,
- Riker A. J., Hildebrandt A. C., 1962. The problem of single cell manipulation as applied to plant sciences, *Jour. Cellular Comp. Physiol., Suppl. 1*, 60: 173—182.
- Shivanna K. R., 1965. In vitro fertilization and seed formation in *Petunia violacea* Lindl., *Phytomorphology*, 15: 183—185.
- Steward F. C., 1958. Growth and organized development of cultured cells II. Interpretation of the growth from free cell to carrot plant. *Amer. Jour. Bot.*, 45: 709—713.
- Steward F. C., 1963. Totipotency and variation in cultured cells: some metabolic and morphogenetic manifestations, *Plant tissue and organ culture — A Symposium* (ed. Maheshwari P., Rangaswamy N.S.), Delhi: 1—25.
- Steward F. C., Mapes M., Smith J., 1958. Growth and organized development of cultured cells. I Growth and division of freely suspended cells, *Amer. Jour. Bot.* 45: 693—703.
- Steward F. C., Mapes M., 1963. The totipotency of cultured carrot cells: evidence and interpretations from successive cycles of growth from phloem cells, *Jour. Indian Bot. Soc.*, 42: 237—247.
- Strasburger E., 1886. Über fremdartige Bestäubung, *Jb. wiss. Bot.* 17: 50—98. *
- Szweykowska A., 1961. Z zagadnień morfogenezy u roślin. Nowsze wyniki badań metodą hodowli in vitro, *Wiad. Bot.* 5: 271—280.
- Usha S. V., 1965. In vitro pollination in *Antirrhinum majus* L., *Curr. Sci.* 34: 511—513.
- Vasil V., 1963. In vitro culture of embryos of *Gnetum ula* Brongn. *Plant tissue and organ culture — A Symposium* (ed. Maheshwari P., Rangaswamy N. S), Delhi: 278—280.
- Vasil V., 1965. Differentiation of tobacco plants from single isolated cells in microcultures, *Science*, 150: 889—892.
- Wetherell D. F., Halperin W., 1963. Embryos derived from callus tissue cultures of wildcarrot, *Nature*, 200, 4913.
- Zenkter M., 1965. Test tube fertilization in *Dianthus caryophyllus* Linn., *Naturwissenschaften*, 23: 645—646.
- Zenkter M., 1966. Multiple shoot formation from the embryonal mass of *Fagopyrum sagittatum* Gilib., *Curr. Sci.* 35: 18—19.