



## Postęp i status produkcji podwojonych haploidów rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.)

Teresa Cegielska-Taras, Iwona Bartkowiak-Broda  
Zakład Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych, Instytut Hodowli  
i Aklimatyzacji Roślin, Poznań

### Progress and status of doubled haploids of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) production

#### Summary

A single microspore cultured *in vitro* can be reprogrammed from the development of pollen to divisions and production of a bipolar embryo. The final effect of androgenesis *in vitro* is conversion of each embryo derived from microspore of a heterozygous plant into a doubled haploid plant in such a way that a population of doubled haploids fully represents the genetic variability of the preceding meiosis.

DH lines have been already widely used in oilseed rape breeding. Doubled haploids are used by breeders in crossing programs in order to obtain desirable variability in progeny, and also as a part of conventional breeding. Moreover, doubled haploids in conjunction with molecular markers helped to develop the so called "molecular breeding".

#### Key words:

*Brassica napus*, doubled haploids, molecular breeding, molecular markers, hybrid breeding, genetic transformation, yellow seeds.

#### Adres do korespondencji

Teresa Cegielska-Taras,  
Zakład Genetyki i Hodowli  
Roślin Oleistych,  
Instytut Hodowli  
i Aklimatyzacji Roślin,  
ul. Strzeszyńska 36,  
60-479 Poznań;  
e-mail:  
tceg@nico.ihar.poznan.pl

### 1. Wstęp

Produkcja haploidów i podwojonych haploidów (DH) metodami biotechnologicznymi, takimi jak kultury pylników i kultury mikrospor *in vitro*, pozwala na przyspieszenie procesu hodowli odmian, jak również ułatwia prowadzenie badań podstawowych dotyczących tej rośliny. Najważniejszym atutem tej techniki jest

skrócenie do jednej generacji czasu uzyskiwania homozygotycznych linii, w porównaniu do metody chowu wsobnego, która wymaga pięciu, sześciu pokoleń, aby uzyskać ustaloną linię rzepaku, który jest rośliną częściowo auto-, częściowo allogamiczną.

W początkowej fazie rozwoju metody otrzymywania linii podwojonych haploidów rzepaku z kultury izolowanych mikrospor nie przypuszczano, że metoda ta stanie się nieocenioną także w innych badaniach biotechnologicznych oraz w rozwijających się nowych dyscyplinach nauki, jak genomika i proteomika. Linie DH znalazły na przykład szerokie zastosowanie jako materiał do mapowania genetycznego, poszukiwania markerów molekularnych cech jakościowych i ilościowych lub z nimi sprzężonych.

## 2. Metoda uzyskiwania linii DH rzepaku ozimego w kulturze izolowanych mikrospor

W latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku wykazano, że możliwe jest uzyskanie dużej liczby zarodków mikrosporowych poprzez kulturę izolowanych mikrospor rzepaku z ominięciem fazy proliferacji tkanki kalusowej (1) w płynnej pożywce NLN bez dodawania hormonów. W metodzie tej wydajna embriogeneza mikrospor indukowana jest stresem wysokiej temperatury (traktowaniem mikrospor zaraz po izolacji temperaturą 30-35°C). Wspomniane etapy uzyskiwania haploidów rzepaku przetrwały nie zmienione w wielu adaptacjach w różnych laboratoriach świata (2,3). Bez wątplenia dużym usprawnieniem tej podstawowej metody są dwie modyfikacje polegające na traktowaniu kolchicyną mikrospor zaraz po ich izolacji oraz indukowana niską temperaturą konwersja zarodków mikrosporowych w rośliny (3). Te dwie zmiany w metodyce przyczyniły się do skrócenia czasu uzyskiwania linii DH rzepaku ozimego. W tabelach 1 i 2 przedstawiono wyniki eksperymentów uzyskane z zastosowaniem wymienionych modyfikacji.

Tabela 1

**Ploidalność androgenicznych roślin rzepaku ozimego uzyskanych z izolowanych mikrospor po traktowaniu kolchicyną *in vitro* (2005 r.)**

Symbol mieszańca F <sub>1</sub>	Liczba roślin androgenicznych	Poidalność			
		(n)	(%)	(2n)	(%)
BK-1	36	6	16,7	30	<b>83,3</b>
BK-2	320	80	24,1	240	<b>75,9</b>
H-10	169	29	17,2	140	<b>82,8</b>
H-11	147	28	19,0	119	<b>81,0</b>
H-12	124	18	14,5	106	<b>85,5</b>
Razem	796	161	20,2	635	<b>79,8</b>

Tabela 2

**Wydajność konwersji zarodków mikrosporowych rzepaku ozimego w roślinę po stymulacji niską temperaturą (2005 r.)**

Symbol mieszańca F <sub>1</sub>	Liczba serii	Liczba wyłożonych zarodków	Liczba			Zakres wydajności konwersji (%)
			roślin	zarodków, które nie uległy konwersji	zarodków zamierających	
MA 1	4	410	198	125	87	27,8-68,0
MA 2	5	380	133	132	115	18,8-48,3
MA 3	2	180	103	58	19	52,5-61,0
MA 4	4	350	208	72	70	50,0-65,0
MA 5	3	160	88	56	16	52,0-56,7
BO 7	7	420	227	152	31	20,0-78,3
BO 8	2	200	91	73	36	40,0-49,2
BO 9	2	40	20	19	1	40,0-53,3
Z 13	2	190	67	80	43	31,0-51,1
Z 14	1	60	43	12	5	71,7

Metoda uzyskiwania linii podwojonych haploidów oferowana jako integralna część realizacji programów hodowlanych powinna charakteryzować się:

- a) powtarzalnością i wysoką wydajnością w masowym uzyskiwaniu podwojonych haploidów z różnych dawców mikrospor;
- b) możliwością łatwej adaptacji w warunkach wielu laboratoriów;
- c) niskim kosztem uzyskiwania jednej linii DH.

Jedynie ściśle przestrzeganie warunków kultury zapewnia dobrą wydajność indukcji androgenezy oraz otrzymywanie pożądanej liczby mikrosporowych zarodków i roślin DH z różnych dawców mikrospor. Efektem takiego postępowania jest obniżenie kosztów uzyskania jednej linii, co nie jest bez znaczenia przy masowej produkcji podwojonych haploidów i ciągle wzrastającym zapotrzebowaniu na linie homozygotyczne w hodowli (4). Należy nadmienić, że zmodyfikowana w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Poznaniu metoda (3) uzyskiwania linii DH rzepaku ozimego została wdrożona i jest wykorzystywana w Hodowli Roślin Strzelce Spółce z o.o. (5).

### 3. Haploidyzacja rzepaku w programach hodowlanych

Wartość rzepaku (*Brassica napus* L.) jako uprawnej rośliny rolniczej jest przede wszystkim determinowana zawartością tłuszczu w nasionach oraz jego składem kwasów tłuszczowych, a także wartością paszową śruty poekstrakcyjnej lub wytlóków. Metodami hodowli konwencjonalnej uzyskano odmiany rzepaku ozimego

podwójnie ulepszonych, w których wyeliminowano z oleju szkodliwy dla zdrowia człowieka kwas erukowy oraz zmniejszono zawartość w nasionach glukozylnianów, związków obniżających wartość paszową poekstrakcyjnej śruty rzepakowej. Olej otrzymany z rzepaku podwójnie ulepszanego charakteryzuje się doskonałym składem kwasów tłuszczowych, co stanowi o jego wysokiej wartości żywieniowej (6). Rzepak jest w dalszym ciągu modelowany genetycznie w celu wprowadzenia coraz to nowych cech jakościowych i także otrzymywania wysokoplennych odmian (7). Podyktowane to jest zapotrzebowaniem na olej i białko uzyskiwane z nasion rzepaku, na cele spożywcze, paszowe, techniczne i jako źródło energii odnawialnej.

Konwencjonalne metody hodowli roślin w połączeniu ze współczesną biotechnologią okazały się bardzo skuteczne w udoskonalaniu roślin uprawnych. Od czasu jak Lichter w 1982 r. po raz pierwszy opisał technikę uzyskiwania dużej liczby haploidalnych zarodków z izolowanych mikrospor, metoda ta wzbudziła zainteresowanie jako narzędzie dla usprawnienia hodowli. Metodę otrzymywania haploidów w kulturze izolowanych mikrospor rzepaku optymalizowano dla potrzeb rutynowego stosowania w hodowli (3,8). Obecnie haploidyżacja stanowi integralną część programów hodowlanych rzepaku. Podwojone haploidy wykorzystywane są w szerokim zakresie do wytwarzania materiałów wyjściowych dla hodowli nowych odmian zarówno populacyjnych jak i mieszańcowych (9,10). Dla potrzeb hodowli uzyskuje się linie podwojonych haploidów najczęściej z mieszańców  $F_1$  lub wybranych genotypów o pożądanym cechach. Otrzymane linie DH rzepaku testowane są w doświadczeniach polowych w celu selekcji genotypów o określonych cechach jakościowych i jednocześnie wysokoplennych. Z populacji podwojonych haploidów jednego dawcy mikrospor istnieje możliwość wyboru jednej dobrze plonującej linii DH z przeznaczeniem na odmianę (5). Na ogół jednak wytypowane linie DH krzyżuje się ponownie poddając haploidyżacji mieszańce w kolejnym cyklu, szczególnie wtedy gdy planowana jest introgresja nowej cechy (10,11). Wówczas selekcja jest o tyle prostsza, że wybrany zostaje jedynie genotyp posiadający daną cechę, na przykład wysoką czy niską zawartość jednego z kwasów tłuszczowych (9). Wybór pożądanego genotypu można przeprowadzać wcześniej, już na etapie zarodków mikrospory (12) lub w połączeniu z markerami molekularnymi na każdym etapie rozwoju rośliny otrzymanej populacji linii DH (13). Podobny tok postępowania często stosowany jest w przypadku selekcji linii odpornych na choroby. Stringam (14) otrzymał w ten sposób odmiany rzepaku jarego: Quantum oraz Q2 odporne na wirulentną formę *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces & De Not, jednego z najgroźniejszych patogenów, powodującego największe straty plonu u *Brassica napus*. Także odmiany rzepaku Armada (15), Conquest i inne (5) zostały wyhodowane przy wykorzystaniu kultury mikrospor.

Na początku wprowadzania metody haploidyżacji do hodowli selekcji podwojonych haploidów o pożądanym cechach dokonywano w połączeniu z markerami morfologicznymi, którymi była na przykład żółtonasiennność (3), czy wczesność (16). Przy wyborze określonych linii DH coraz częściej stosowane są markery izoenzymatyczne.

tyczne oparte na różnych formach allelicznych poszczególnych enzymów i markery molekularne wykorzystujące zmiany w sekwencji DNA, a powiązane z ważnymi cechami jakościowymi (17).

W hodowli odmian heterozyjnych rzepaku korzystne jest krzyżowanie homozygotycznych form rodzicielskich w celu uzyskania jak największego efektu heterozji w plonie nasion (9). Wsobne linie rzepaku można otrzymać w ciągu 5-6 pokoleń poprzez samozapylenie. Alternatywną drogą uzyskania linii homozygotycznych w jednej generacji jest produkcja linii podwojonych haploidów metodą kultury izolowanych mikrospor. Metoda ta znalazła zastosowanie na przykład w programie w selekcji homozygotycznych linii restorerów (*Rfo*) genowo-cytoplazmatycznej męskiej sterylności CMS *ogura* wykorzystywanej w hodowli odmian mieszańcowych rzepaku. Skuteczność selekcji wysokoplennych, o dobrych cechach jakościowych linii DH zawierających gen *Rfo* wspomaganą markerami molekularnymi sprzężonymi z genem restorerem potwierdzają wyniki badań Popławskiej i in. (18).

Od czasu jak wykazano, że rzepak żółtonasienny charakteryzuje się istotnie większą zawartością oleju i białka oraz mniejszą zawartością włókna paszowego niż rzepak czarnonasienny, stał się on celem wielu programów hodowlanych (19). U rzepaku żółtonasiennosc jest cechą recesywną (20). Ponadto istnieją różne źródła introgresji alleli kontrolujących kolor nasion *Brassica napus* i sposób dziedziczenia zależy od pochodzenia genetycznego tej cechy. Konsekwencją recesywnej natury żółtonasiennosci jest ekspresja tej cechy w małej frakcji populacji potomstwa. Ponadto okrywa nasienne rozwija się z tkanek rośliny matecznej (zależni). Dlatego kolor okrywy nasiennej nie wykazuje w pierwszym pokoleniu genotypu zarodka. Wydaje się, że podwojone haploidy w dużym stopniu uproszczą i usprawnią, dochodzenie do poznania sposobu dziedziczenia cechy żółtonasiennosci. Wykorzystanie linii DH dla tych celów może zatem znacząco ograniczyć liczbę roślin, którą należy przebadać, ponieważ: a) geny recesywne nie są maskowane; b) fenotyp nasion jest identyczny z genotypem zarodka.

#### **4. Wykorzystywanie linii podwojonych haploidów w poszukiwaniu markerów molekularnych ważnych rolniczo cech, konstruowaniu map genetycznych i detekcji QTL**

Rzepak *Brassica napus* (AACC) jest stosunkowo młodym gatunkiem powstałym z krzyżowania *Brassica rapa* (AA) i *Brassica oleracea* (CC). Ponadto zmienność genetyczna tego gatunku została zawężona poprzez hodowlę podwójnie ulepszonych odmian rzepaku (00). Genotypy tych odmian charakteryzują się brakiem kwasu erukowego w oleju i niską zawartością glukozyolanów w śrucie. Ciągłe trwają badania nad uzyskaniem nowej zmienności genetycznej. Dynamicznie rozwijająca się w ostatnich latach biologia molekularna stworzyła nowe sposoby analizowania zmienności genetycznej. Jednym z nich jest analiza polimorfizmu białek enzymatycznych oraz

DNA. Najnowsze techniki analityczne umożliwiają ocenę zróżnicowania genetycznego dowolnej populacji roślin.

Dla opracowania markerów molekularnych danej cechy wymagana jest populacja segregująca pod względem tej cechy (9,21,22). Największą korzyścią zastosowania do tego celu linii DH w porównaniu z segregującą populacją  $F_2$  jest fakt, że mogą być one łatwo reprodukowane poprzez samozapylenie, tak zatem można analizować różne, ale genetycznie jednakowe siewki (grupy roślin). Coraz powszechniejsza staje się selekcja wspomagana markerami molekularnymi (MAS, ang. *marker assisted selection*). Selekcja MAS wykorzystująca linie DH jest chętnie i z powodzeniem stosowana w hodowli nowych odmian rzepaku (9,17,18). Do tych celów służą opracowane markery DNA typu: AFLP, RAPD, SSR, SNP i inne powiązane głównie z cechami jakościowymi (8). Markery te służą także do określenia grup heterotycznych materiałów przydatnych w hodowli odmian mieszańcowych rzepaku ozimego (23).

Obecnie prowadzone są intensywne badania mające na celu wykorzystanie linii DH do poszukiwania markerów molekularnych powiązanych z różną zawartością poszczególnych kwasów tłuszczowych oleju z nasion rzepaku. Dla przykładu populacja linii DH z mieszańca  $F_1$  otrzymanego ze skrzyżowania rodu hodowlanego rzepaku ozimego z niskolinolenową odmianą jarą Apollo posłużyła do identyfikacji markerów molekularnych sprzężonych z niską zawartością kwasu linolenowego (13).

Populacje podwojonych haploidów rzepaku powszechnie wykorzystywane są do identyfikacji markerów powiązanych z cechami ilościowymi (QTL) oraz do konstrukcji map genetycznych (8,21,24-26).

## 5. Transformacje genetyczne androgenicznych form rzepaku ozimego

Wykorzystanie genetycznej transformacji dla transferu specyficznych, obcych genów do genomu jądrowego roślin uprawnych dałoby alternatywną drogę pozyskiwania genotypów rzepaku o nowych cechach jakościowych (27).

Zastosowanie haploidalnych komórek takich jak mikrospory znacznie usprawnia hodowlę transformantów, gdyż po wprowadzeniu transgeny do komórki haploidalnej (np. mikrospory) nowa cecha może zostać utrwalona w stanie homozygotycznym po podwojeniu liczby chromosomów przypuszczalnego transformanta. Potwierdzają to badania np. Fukuoka i in. (28), kiedy to uzyskano transgeniczne rośliny rzepaku poprzez wprowadzenie genu lucyferazy do izolowanych mikrospor. Otrzymane z nich haploidalne rośliny poddano kolchicynowaniu w celu podwojenia liczby chromosomów. Uzyskane nasiona poprzez samozapylenie rośliny wykazywały ekspresję wprowadzanego genu.

Obce geny wprowadzane są także do komórek innych struktur androgenicznych, jak zarodki mikrosporowe rzepaku (29,30), które wykazują duże zdolności regeneracyjne. Z kultury izolowanych mikrospor rzepaku jedynie 10% otrzymanych zarod-

ków ulega spontanicznemu podwojeniu liczby chromosomów, a pozostała część jest haploidalna, a zatem jest to wygodny materiał do transformacji. Przeprowadzono badania nad wykorzystaniem zarodków mikrosporowych rzepaku ozimego do transformacji genetycznych za pomocą *Agrobacterium tumefaciens*. W badaniach nad poznaniem systemu myrozynaza-glukozynolany (enzym myrozynaza w obecności wody rozkłada glukozynolany na izotiocyjaniany i winylooksaolidyntyony, które są związkami antyżywnościowymi w śrucie rzepakowej) obiektem transformacji były zarodki mikrosporowe rzepaku ozimego niskoglukozynolawego. Do skonstruowania wektorów binarnych, które przy udziale *Agrobacterium tumefaciens* wprowadzono do genomu rzepaku, posłużyły genomowe kopie genów myrozynazy (*TGG1* i *TGG2*) rzodkiewnika. Otrzymane wyniki wskazują na przydatność zarodków mikrosporowych w uzyskiwaniu roślin z różną aktywnością enzymu, a tym samym w badaniach funkcji systemu myrozynaza-glukozynolany u rzepaku (30). Innym przykładem wykorzystania zarodków mikrosporowych do transformacji genetycznych są badania nad uzyskaniem homozygotycznych roślin odpornych na herbicyd Basta. Do tego celu wykorzystano zarodki mikrosporowe rzepaku ozimego linii DH O120 oraz szczepy *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 i EHA 105 zawierające plazmid pP35SGIB z genem GUS i intronem pod promotorem 35S RNA CaV oraz genem *bar* jako markerem selekcyjnym. Na podstawie wyników przeprowadzonej analizy molekularnej wykazano, że potomstwo rośliny, u której wcześniej wykryto dwie kopie transgeny (linia DH-T39) jest w 100% transgeniczne. Na podstawie analizy wyizolowanego DNA z kilku roślin potomstwa transgenicznej linii DH T-39 po hybrydyzacji metodą Southerna potwierdzono integrację T-DNA z genomem rzepaku (31).

Uważa się, że metodyka produkcji DH u *Brassica napus* jest dobrze opracowana jakkolwiek istnieją jeszcze ciągle etapy, które można zoptymalizować dla zróżnicowanych genotypów rzepaku. Te innowacje metodyczne wynikają z potrzeby wykorzystania kultury mikrospor w inżynierii genetycznej, a przede wszystkim do uzyskiwania transgenicznych roślin z nowymi utrwalonymi cechami. Obszar inżynierii genetycznej zasługuje jeszcze na dalsze badania, tak aby można było stosować tę metodę na dużą skalę.

## **6. Zastosowanie podwojonych haploidów rzepaku w pracach z zakresu genetyki ilościowej**

U podwojonych haploidów wszystkie geny są w układzie homozygotycznym i dzięki temu następuje ekspresja wszystkich funkcjonalnych genów z pominięciem zjawiska dominacji, co czyni selekcję prostszą, a cechy recesywne roślin nie są maskowane przez cechy dominujące (3). Prawdopodobieństwo uzyskania linii DH o korzystnych cechach jakościowych jak i o cechach decydujących o wysokości plonu, zależy od genotypu dawcy mikrospor. Krzyżowanie linii DH rzepaku ozimego wartościowych pod względem cech rolniczo użytecznych, a następnie produkcja no-

wych podwojonych haploidów z uzyskanego mieszańca  $F_1$  jest metodą sprzyjającą nagromadzeniu wielu korzystnych alleli w jednej wysokopiennej linii DH. Ze względu na istnienie interakcji genotypowo-środowiskowej wyselekcjonowanie w warunkach polowych z uzyskanej populacji podwojonych haploidów, charakteryzujących się pożądanymi cechami linii DH, jest utrudnione. Prowadzane są zatem badania w celu wyjaśnienia modyfikującego wpływu środowiska na cechy struktury plonu oraz plonowanie linii homozygotycznych. Wykazano, że niektóre podwojone haploidy uzyskane z kultury izolowanych mikrospor mieszańca  $F_1$  rzepaku ozimego charakteryzowały się istotnie wyższym plonem od średniej badanych genotypów. Dla części podwojonych haploidów interakcja ze środowiskiem nie była istotna, co świadczy o stabilności ich plonowania. W wyniku przeprowadzonych badań wnioskowano, że linie homozygotyczne rzepaku ozimego charakteryzują się różną zdolnością adaptacyjną do warunków środowiska (32,33).

## 7. Podsumowanie

Opracowanie efektywnej metody uzyskiwania linii DH z mikrospor było ważnym przełomem w hodowli rzepaku będącego rośliną fakultatywną, ponieważ pozwoliło na skrócenie procesu hodowli i zwiększenie jego efektywności. Ponadto badania dotyczące sposobu determinacji genetycznej poszczególnych cech oraz poznawania genomu, prowadzone przy wykorzystaniu linii DH dają bardziej precyzyjne wyniki niż w przypadku zastosowania do tych celów linii wsobnych. Opracowanie metody pozyskiwania mikrosporowych zarodków usprawniło także metodę introgresji obcych genów do genotypu rzepaku poprzez transformacje genetyczne.

## Literatura

1. Lichter R., (1982), *Z. Pflanzenphysiol.*, 105, 427-434.
2. Fletcher R., Coventry J., Kott L. S., (1998), *Technical Bulletin OAC Publication*, University of Guelph, Guelph, 1-42.
3. Cegielska-Taras T., (2002), *Kultura izolowanych mikrospor w genetycznym ulepszaniu rzepaku ozimego Brassica napus L.*, Monografie i Rozprawy Naukowe IHAR, Radzików, 18, 7-107.
4. Möllers Ch., (2006), *Abstracts of The International Conference „Haploids in Higher Plants III”*, Wiedeń, Austria, 30.
5. Cichy H., Budzianowski G., Cegielska-Taras T., Szała L., (2005), *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXVI, 589-593.
6. Krzymański J., (2000), *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXI, 7-14.
7. *Rzepak ozimy*, (2006), pr. zb., red. T. Wałkowski, IHAR, Poznań.
8. Foster B. P., Thomas W. T. B., (2003), Eds. M. Maluszynski et al., *Doubled Haploid Production in Crop Plant*, 4.4, *Doubled haploids in genetics, mapping and genomics*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht/Boston/London, 367-390.
9. Bartkowiak-Broda I., Mikołajczyk K., Spasibionek S., Cegielska-Taras T., (2006), red. S. Jeżowski, M. K. Wojciechowicz, E. Zenkteler, *Alternative Plants for Sustainable Agriculture*, IGR PAN, Poznań, 129-139.



10. Foroughi-Wehr B., Wenzel G., (1990), *Theor. Appl. Genet.*, 80, 564-568.
11. Wenzel G., Frei U., Jahoor A., Graner A., Foroughi-Wehr B., (1995), Eds. M. Terzi i in., *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*, Kluwer Academic Publisher, Dodrecht/Boston/London, 127-135.
12. Cegielska-Taras T., Szała L., Nałęczyńska A., Kołodziej K. Ogrodowczyk M., (1999), *J. Appl. Genet.*, 40, 305-315.
13. Mikołajczyk K., Spasibonek S., Cegielska-Taras T., Nowakowska J., Bartkowiak-Broda I., (2004), red. P. Krajewski i in., *Genetyka w ulepszaniu roślin użytkowych*, Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań, 11, 111-116.
14. Stringam G. R., Degenhardt D. F., Thiagarajah M. R., Bansal V. K., (2001), *Can. J. Plant Sci.*, 81, 107-108.
15. Ferrie A., (2003), Eds. M. Maluszynski et al., *Doubled Haploid Production in Crop Plant.*, IAEA, 2.30, *Microspore culture of Brassica species*, Kluwer Academic Publisher, Dodrecht/Boston/London, 205-215.
16. Stringam G. R., (1999), *PBI Bulletin*, National Research Council Canada, (January), 22-24.
17. Thomas W. T. B., Forster B. P., Gertsson B., (2003), Eds. M. Maluszynski i in., IAEA, *Doubled Haploid Production in Crop Plant.*, 4.1, *Doubled haploids in breeding*, 337-349.
18. Popławska W., Szała L., Cegielska-Taras T., Bartkowiak-Broda I., (2006), red. Adamski T., Surma M., *Haploidy i linie podwojonych haploidów w genetyce i hodowli roślin*, Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań, 11, 151-157.
19. Piotrowska A., Krzymański J., Bartkowiak-Broda I., Krótka K., (2003), *Proceedings of 11<sup>th</sup> Int. Rapeseed Congress*, Kopenhaga, Dania, 1, 247-252.
20. Burbulis N., Kott L. S., (2005), *Can. J. Plant Sci.*, 85, 109-114.
21. Friedt W., Zarhloul K., (2005), Eds. C. E. Plamer, W. A. Keller, K. J. Kasha, *Haploids in Crop Improvement II*, 2. *Haploids in the Improvement of Crucifers*, 2, Springer, Verlag Berlin, Heidelberg, 191-213.
22. Javidfar F., Ripley V., Roslinsky V., Zeinali H., Abdmishani C., (2006), *Plant Breeding*, 125, 65-71.
23. Liersch A., (2005), *Wpływ zmienności genetycznej na efekt heterozji u rzepaku ozimego (Brassica napus L. var oleifera)*, praca doktorska, IHAR, Poznań, 3-170.
24. Uzunowa M., Ecke W., Weissleder K., Robbelen G., (1995), *Theor. Appl. Genet.*, 90, 194-204.
25. Matuszczak M., Cegielska-Taras T., Szała L., Krzymański J., (2001), *Abstracts of 15<sup>th</sup> the EUCARPIA Congress "Plant Breeding: Sustaining the Future"*, 10.
26. Matuszczak M., Krzymański J., Bartkowiak-Broda I., (2003), *Proceedings of 11<sup>th</sup> International Rapeseed Congress*, Kopenhaga, Dania, 1, 82-84.
27. Takahata Y., Fukuoka H., Wakui K., (2005), Eds. C. E. Plamer, W. A. Keller, K. J. Kasha, *Haploids in Crop Improvement II*, 1. *Utilization of Microspore-Derived Embryos*, Springer, Verlag Berlin, Heidelberg, 1, 153-169.
28. Fukuoka H., Ogawa T., Matsuoka M., Ohkawa Y., Yano H., (1998), *Plant Cell Rep.*, 17, 323-328.
29. Cegielska-Taras T., Pniewski T., Szała L., Miedzińska K., (2002), *Bulletin. GCIRC*, B18, 1-9, <http://195.101.21/publications/B18>, 1-9.
30. Troczyńska J., Drozdowska L., Cegielska-Taras T., (2003), *Proceedings of 11<sup>th</sup> International Rapeseed Congress*, Kopenhaga, Dania, 1, 175-177.
31. Cegielska-Taras T., Pniewski T., Szała L., (2007), *Proceedings of 12<sup>th</sup> International Rapeseed Congress*, (26-30 III. 2007), Wuhan, Chiny, (w druku).
32. Adamska E., Cegielska-Taras T., Kaczmarek Z., Szała L., (2004), *J. Appl. Genet.*, 45, 419-425.
33. Adamska E., Cegielska-Taras T., Szała L., (2004), red. P. Krajewski i in., *Genetyka w ulepszaniu roślin użytkowych*, Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań, 11, 251-260.