

# EVALUACION DE DOS MEDIOS DE CULTIVO PARA MEJORAR LA ANDROGENESIS EN TRIGO<sup>1</sup>

## Evaluation of two anther culture media for androgenesis in wheat

Nicole Hewstone O.<sup>2</sup> y Carlos Muñoz S.<sup>2</sup>

### SUMMARY

Anther culture has limited use in wheat breeding because few doubled haploids can be obtained and the androgenic capacity is highly dependant on genotype. In order to evaluate the androgenic ability of 2 anther culture media, N<sub>6</sub> and Potato-4 media, were compared in their liquid or solid forms, and N<sub>6</sub> medium with or without the addition of Ficoll-400 to the medium. Besides, the androgenic capacity of 10 genotypes were compared in Potato-4 and N<sub>6</sub> media. Finally, 2 forms of colchicine treatment were also compared. Anthers were incubated at 25 ± 2 °C with 50 μE m<sup>-2</sup> seg<sup>-1</sup> irradiation and 16 hrs of light. After 1 month in these conditions, calli produced were transferred to a regenerative medium, and later on, acclimated in a greenhouse. For chromosomal doubling, colchicine (0.2% for 4 hr) was applied *in vivo* to acclimated plants previous to shoot elongation.

Results show that, in general, solid media are better in inducing calli than liquid media, that there was no difference in callus differentiation between the solid and liquid form of the Potato-4 medium, but that the N<sub>6</sub> medium in its liquid form is better for callus differentiation.

Addition of Ficoll-400 (100 g/L) to N<sub>6</sub> medium significantly increased plant production per anther, and callus differentiation, but had no effect on callus induction.

A significant interaction was detected between culture media and genotype, but for most genotype Potato-4 medium proved to be better for callus induction.

Finally, chromosome duplication using colchicine was better when treatment was given to fully acclimated plantlets.

**Key words:** androgenesis, anther culture, wheat, culture media.

### INTRODUCCION

La producción de plantas haploides de trigo a través del cultivo de anteras o de microesporas permite alcanzar rápidamente la homocigosis y la expresión de caracteres recesivos. Sin embargo, el rendimiento de esta técnica ha sido habitualmente bajo, 2 a 5 callos por 100 anteras y 20 a 40 plantas por 100 callos (Ouyang, 1986). Normalmente, se han utilizado medios de cultivo sólidos para la inducción de embriones, sin embargo, en los últimos años, se ha demostrado que medios líquidos permiten, no

sólo aumentar la androgénesis (Marsolais, Seguin-Swartz y Kasha, 1984; Kasha, Ziauddin y Cho, 1990; Zhou y Konzak, 1989), sino además, la habilidad para regenerar plantas y disminuir el porcentaje de plantas albinas (Jones y Petolino, 1988; Zhou y Konzak, 1989).

Dentro de los medios de cultivo que se han usado con más éxito en trigo están el N<sub>6</sub> (Shimada, 1981) y el Potato-2 (Hu, 1986). A partir de este último, se desarrolló el Potato-4, el cual permite obtener más de 100 embriones por 100 anteras sembradas (Zhou y Konzak, 1989).

<sup>1</sup>Recepción de originales: 26 de Junio de 1991.

Los autores agradecen la valiosa ayuda del Sr. Luis Barrales V., en el análisis estadístico de los datos.

Trabajo realizado con aporte del Convenio Arcal VII, entre el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y el Organismo Internacional de Energía Atómica (INIA/IAEA).

<sup>2</sup>Estación Experimental La Platina (INIA), Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.

Trabajos anteriores, realizados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Estación Experimental La Platina, donde se evaluaron los medios Potato-2 (Hu, 1986; Marburger, Sammons y Schaeffer, 1987), 85-D3 (Liang, Xu y Tang, 1987), Moraes-F (Moraes-Fernandes y Picard, 1983), N<sub>6</sub> (Shimada, 1981) y MS

(Murashige y Skoog, 1962) demostraron que el mejor medio para la androgénesis de líneas y variedades chilenas, fue el N<sub>6</sub> (Hewstone, Muñoz y Cortázar, 1990).

En el presente trabajo se compararon los medios Potato-4 y N<sub>6</sub>, en forma líquida y sólida, y además se utilizó el medio N<sub>6</sub> con Ficoll 400, ya que se ha determinado un efecto benéfico al utilizar este componente en los medios líquidos (Kao, 1985; Szarejko y Maluszynski, 1989; Zhou y Konzak, 1989). Además, se evaluó el efecto del medio Potato-4 sobre 10 genotipos chilenos de trigo.

## MATERIALES Y METODOS

### Ensayo I. Composición y tipo de medio de cultivo

Para este estudio se utilizó la línea F<sub>2</sub> de trigo 20060, proveniente de la cruzada Crim/Era \* 2//Buitre/Gall/3/F.78208-1/Tolbay, la cual, en ensayos preliminares, había mostrado una buena capacidad androgénica (datos no publicados). Esta línea fue sembrada en la Estación Experimental La Platina (INIA), en junio de 1990.

Las espigas se cosecharon cuando el polen estaba en el estado uninucleado. A las espigas cosechadas se les dio un pre-tratamiento de frío a una temperatura de 3 a 4 °C, por 2 a 3 días, después del cual las anteras fueron extraídas y sembradas en el medio base N<sub>6</sub> (Shimada, 1981), el cual estaba contenido en frascos de 40 ml de capacidad, que se llenaron con 10 ml de medio (Cuadro 1). Este mismo medio, se utilizó también en forma líquida, sembrando las anteras en placas Petri de 6 cm de diámetro, las que se llenaron con 2 ml de medio de cultivo. Por último, se utilizó este mismo medio, pero agregándole Ficoll 400 (100 g/L). El medio Potato-4, por su parte, fue suplementado con 1,5 mg/L de 2,4-D, 0,5 mg/L de kinetina y 90 g/L de sacarosa. Este medio también fue utilizado en forma líquida, sembrando las anteras en placas Petri de 6 cm de diámetro, y en forma sólida, suplementándolo con 3,5 g/L de agar.

Las anteras sembradas se incubaron en oscuridad a 32 °C por 4 a 5 días y luego a 25 °C hasta que se observó formación de callo. La frecuencia de inducción de callos se determinó contando el número de callos obtenidos por 100 anteras sembradas.

Cuando los callos alcanzaron más de 1 mm de diámetro fueron trasplantados al medio sólido 190-2 sin hormonas (Cuadro 1) (Zhuang y Xu, 1983), para la regeneración de plantas. Los callos fueron incubados a 25 °C con un fotoperíodo de 16 hr luz,

## CUADRO 1. Medios de cultivo utilizados en los ensayos

TABLE 1. Anther culture media used in the experiments

	N <sub>6</sub>	Potato 4	190-2
<b>Macronutrientes, mg/L</b>			
KNO <sub>3</sub>	2.830	1.150	1.000
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	185	125	200
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	400	200	300
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	463	100	200
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	166	-	166
CaNO <sub>3</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	-	100	-
KCl	-	35	40
<b>Micronutrientes, mg/L</b>			
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	4,4	-	8,0
ZnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,5	-	3,0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,6	-	3,0
KI	0,8	-	0,5
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O	37,3	37,3	37,3
<b>Vitaminas, mg/L</b>			
Ac. Nicotínico	0,5	-	0,5
Pyridoxina HCl	0,5	-	0,5
Thiamina HCl	1,0	1,0	1,0
Glicina	100	-	2,0
Serina	100	-	-
Glutamina	800	-	-
<b>Reguladores de crecimiento, mg/L</b>			
2,4-D	1,5	1,5	-
Kinetina	0,5	0,5	-
<b>Otros</b>			
Myo-Inositol, mg/L	2.000	-	100
Sacarosa, g/L	90	90	30
Extracto de papa, ml		100	
Ficoll 400 <sup>1</sup> , g/L	100		
Agar <sup>1</sup> , g/L	3,5	3,5	3,5

<sup>1</sup>El Ficoll-400 se agregó sólo al medio N<sub>6</sub> líquido, y el agar sólo en el caso de los medios sólidos.

hasta obtener la regeneración de plantas completas. Las plantas obtenidas fueron repicadas o divididas cuando habían formado macollo temprano, con el fin de obtener más de una planta por callo para utilizarlas en la duplicación de cromosomas con colchicina, ya que se ha visto una alta mortalidad de plantas con este tratamiento (De Buyser y Henry, 1986; Kleijer, Schmid y Winzeler, 1986). El tratamiento con colchicina, se realizó una vez que las plantas estaban bien aclimatadas en tierra, antes de la emergencia de la espiga. Para evaluar el ensayo, se contó el número de plantas obtenidas por 100 anteras sembradas y el número de plantas

producidas por 100 callos obtenidos. Se aplicaron modelos logarítmicos lineales (Habermann, 1978), para la confirmación estadística de los datos.

### Ensayo II. Efecto del genotipo en trigo

Con el objeto de determinar si el medio Potato-4 al estado sólido inducía una mayor formación de callos que el medio  $N_6$  en otras líneas, diferentes a la 20060, se realizó un ensayo adicional donde se evaluaron otras 10 líneas, cuya cruce y pedigree se presentan en el Cuadro 2.

#### CUADRO 2. Líneas utilizadas en el ensayo de comportamiento de genotipos en cuanto a capacidad androgénica en el medio Potato-4 y $N_6$

TABLE 2. Genotypes used for the evaluation of the androgenic ability of Potato-4 and  $N_6$  media

Línea	Cruza	Pedigree
3801	CMH80A.747/ Perquenco-INIA	T-42687
3802	CMH80A.747/ Temu 2028-88	T-42688
3803	CMH80A.747/ Temu 2046-88	T-42689
3804	CMH83.605/ Perquenco-INIA	T-42690
3806	Gen81/ Perquenco-INIA	T-42692
3807	Gen81/ Temu 2176-88	T-42693
3820	OSU 3863518/ Temu 136-87	T-42706
3839	Tibet Dwarf/ Temu 318-87	T-42725
3847	Tibet Dwarf/ Temu 2166-88	T-42733

Estas líneas fueron sembradas en el campo en la Estación Experimental Carillanca (INIA), en mayo de 1990.

La metodología utilizada en este ensayo fue exactamente igual a la metodología descrita para la línea 20060.

Para la evaluación de los datos se aplicó un análisis estadístico logarítmico lineal de acuerdo a Habermann (1978).

#### CUADRO 3. Comparación entre medios líquidos y sólidos para la inducción de callos de la línea 20060 de trigo

TABLE 3. Callus induction in liquid and solid media for wheat line 20060

Medios de inducción	Medio líquidos			Medios sólidos		
	Anteras sembradas $N^2$	Callos obtenidos $N^2$	Callos/ antera %	Anteras sembradas $N^2$	Callos obtenidos $N^2$	Callos/ antera %
$N_6$	1.580	84	5,31	1.103	208	18,85
Potato-4	445	16	3,59	1.529	343	22,43

### Ensayo III. Efecto de la colchicina sobre la supervivencia de las plantas tratadas

En este ensayo, la colchicina se aplicó a plantas bien desarrolladas y adaptadas a turba, antes de la emisión de la espiga. A las plantas se les cortó la raíz a una altura de 2 cm, para permitir la penetración de la colchicina al punto de crecimiento, antes del tratamiento. La colchicina se utilizó en una solución al 0,2%, con la adición de 2% de dimetilsulfóxido (DMSO), durante 4 horas a 25 °C. Luego, las plantas se lavaron durante toda la noche con agua corriente y, al día siguiente, se transplantaron a turba estéril.

En ensayos anteriores, al aplicar colchicina a las plantas haploides obtenidas a partir del cultivo de anteras, ocurrió una alta mortalidad de plantas, la que alcanzó hasta un 90% (datos no publicados). Esto concuerda con los resultados de otros autores, quienes han tenido un 50% (De Buyser y Henry, 1986) hasta un 25% de mortalidad en el mejor de los casos (Kleijer, Schmid y Winzeler, 1986). La colchicina mostró ser letal al aplicarla tanto a las plantas *in vitro*, como a las plantas al inicio del proceso de aclimatación. Esto limita seriamente la técnica del cultivo de anteras en trigo.

### RESULTADOS Y DISCUSION

#### Ensayo I. Efecto de la composición y tipo de medio de cultivo

Se obtuvieron callos derivados de las anteras sembradas en los siguientes medios: líquidos, sólidos, en medio  $N_6$  y en Potato-4 (Cuadro 3). Sin embargo, el porcentaje de anteras que produjeron callos, fue mayor en los medios sólidos que en los medios líquidos, lo cual es contrario a lo obtenido por otros autores (Jones y Petolino, 1988; Zhou y Konzak, 1989). Para los medios sólidos, las anteras establecidas en el medio Potato-4, produjeron mayor cantidad de callos que aquellas sembradas en el

medios, pero líquidos (Cuadro 3). Esto fue comprobado estadísticamente al aplicar el modelo logarítmico lineal de independencia completa, entre los medios de cultivo y la formación de callos, el cual resultó significativo, indicando ésto que hubo una gran diferencia entre los valores observados y esperados, debida al efecto de los medios de cultivo. En otras palabras, la probabilidad de obtener callos de anteras establecidas en medios sólidos, es mayor que en medios líquidos.

En cuanto a la obtención de plantas a partir de los callos generados, el Cuadro 4 muestra que no hubo diferencias significativas entre el medio Potato 4 líquido y sólido, obteniéndose, en ambos casos, 56 plantas por 100 callos sembrados. Sin embargo, sí hubo diferencias significativas para el medio N<sub>6</sub> líquido o sólido, de acuerdo al modelo de independencia completa entre formación de plantas y medio de cultivo, resultando los callos cultivados en el medio N<sub>6</sub> líquido con mayor capacidad de regeneración de plantas.

**Efecto de la agregación de Ficoll 400 al medio N<sub>6</sub> líquido.** En el medio N<sub>6</sub>, líquido suplementado con Ficoll-400, la regeneración alcanzó a 88 plantas por cada 100 callos repicados. Este porcentaje fue

mayor al que se obtuvo en el mismo medio, pero sin Ficoll-400 (Cuadro 5). Se ha determinado que la capacidad de regeneración de plantas se hereda en forma independiente de la capacidad de formación de callos (Lazar, Baenziger y Schaeffer, 1984; De Buyser y Henry, 1986; Kudirka, Schaeffer y Baenziger, 1986; Ouyang, 1986), por lo que se determinó sólo la regeneración de plantas por callos formados y no por el total de anteras sembradas. En un ensayo similar, realizado por Zhou y Konzak (1989), se determinó que el porcentaje de regeneración de plantas a partir de callos, aumentaba significativamente al usar el medio líquido con Ficoll 400, comparado con el mismo medio pero sólido. Sin embargo, ellos determinaron que se formaban menos plantas, y de peor calidad, cuando se utilizaban callos provenientes de anteras sembradas en medios líquidos, lo que es contrario a los resultados observados en el presente estudio.

#### Ensayo II. Efecto del genotipo en trigo

Al igual que en el ensayo anterior, se obtuvieron callos de todas las líneas en ambos medios de cultivo, con excepción de la línea 3820 donde sólo se formaron callos en el medio Potato-4. En general, este último medio resultó ser mucho más

**CUADRO 4. Porcentaje de regeneración de plantas de callos provenientes de anteras sembradas en medios líquidos o sólidos para la línea 20060 de trigo**

**TABLE 4. Percent of regenerated plantlets from callus of wheat line 20060 obtained in liquid or solid media**

Medios de inducción	Medio líquidos			Medios sólidos		
	Anteras sembradas Nº	Callos obtenidos Nº	Callos/ antera %	Anteras sembradas Nº	Callos obtenidos Nº	Callos/ antera %
N <sub>6</sub>	84	56	66,66	208	102	49,03
Potato-4	16	9	56,25	343	192	56,00

**CUADRO 5. Porcentaje de regeneración de plantas de callos provenientes de anteras sembradas en medios líquidos o sólidos para la línea 20060 de trigo**

**TABLE 5. Percent of regenerated plantlets from callus of wheat line 20060 obtained in liquid or solid media**

Medios de inducción	Anteras sembradas Nº	Callos obtenidos		Plantas obtenidas Nº	Plantas/ callos %
		Nº	%		
N <sub>6</sub> líquido sin Ficoll	1.580	84	5,32	56	66,66
N <sub>6</sub> líquido con Ficoll	1.109	59	5,32	52	88,13

eficiente para la formación de callos que el medio N<sub>6</sub> (Cuadro 6). Sin embargo, en las líneas 3806 y 3847, se obtuvo mayor cantidad de callos en el medio N<sub>6</sub>, indicando ésto que podría existir una interacción entre líneas y medios de cultivo. Esto fue comprobado estadísticamente al aplicar un análisis de independencia completa entre los medios y la formación de callos, el cual indicó que existe una interacción entre estos factores, vale decir, no son independientes. Sin embargo, en general, para la mayor parte de los genotipos, la probabilidad de obtener callos en el medio de cultivo Potato-4 es mayor que en el N<sub>6</sub>.

También, existen diferencias estadísticas entre las líneas para la formación de callos, resultando, en este caso, las líneas 3801 y 3820 muy superiores al resto, en cuanto a su capacidad para generar callos. Respecto a la formación de plantas, también se obtuvieron mejores resultados con el medio Potato-4, manteniéndose las dos excepciones ya mencionadas con el medio N<sub>6</sub> (Cuadro 7).

**CUADRO 6. Comparación entre dos medios de cultivo para la androgénesis en trigo**

**TABLE 6. Comparison of two anther culture media for androgenesis in wheat**

Línea de trigo	Medio Potato-4			Medio N <sub>6</sub>		
	Anteras sembradas Nº	Callos obtenidos Nº	Callos/ antera %	Anteras sembradas Nº	Callos obtenidos Nº	Callos/ antera %
3801	442	153	34,61	478	92	19,24
3802	558	57	10,21	209	3	1,42
3803	360	32	8,88	616	3	0,48
3804	672	33	4,91	399	1	0,25
3806	166	15	9,03	232	43	18,54
3807	286	38	11,89	318	9	2,83
3820	91	19	39,88	98	0	2,83
3838	557	40	7,18	569	11	1,93
3839	437	17	3,90	451	4	0,88
3847	292	5	1,71	734	69	9,40
Total	3.861	409	10,59	4.104	235	5,72

**CUADRO 7. Comparación entre dos medios de cultivo en la regeneración de plantas a partir de callos**

**TABLE 7. Plantlets regenerated from callus obtained from plated anthers in two culture media**

Línea de trigo	Medio Potato-4			Medio N <sub>6</sub>		
	Callos obtenidos Nº	Plantas obtenidas Nº	Plantas/ callos %	Callos obtenidos Nº	Planta obtenidas Nº	Plantas/ callos %
3801	153	82	53,59	92	65	70,65
3802	57	26	45,61	3	0	0,00
3803	32	0	0,00	3	0	0,00
3804	33	2	6,06	1	0	0,00
3806	15	13	86,66	43	19	44,18
3807	38	14	36,84	9	0	0,00
3820	19	19	100,00	0	0	0,00
3838	40	0	0,00	11	0	0,00
3839	17	6	35,29	4	0	0,00
3847	5	2	40,00	69	12	17,39
Total	403	164	40,69	235	96	40,85

### Ensayo III. Efecto de la duplicación de cromosomas con colchicina sobre la supervivencia de las plantas tratadas

El tratamiento con colchicina a las plantas bien aclimatadas en tierra, resultó mejor que al aplicarla inmediatamente después del trasplante, ya que la sobrevivencia de las plantas fue superior al obtenido en trabajos anteriores, pero sigue siendo muy baja. A pesar de los cuidados otorgados, el porcentaje de mortalidad fue alto, resultando un 83% de las

plantas totales, muertas (Cuadro 8). Además, el porcentaje de plantas dobles espontáneas que se obtuvo, fue muy bajo y correspondió sólo a plantas de tres líneas, 20060, 3801 y 3806, lo cual hace pensar que existe un efecto genético importante que influye sobre esto.

Una vez que estas plantas formen semilla, ésta será cosechada y sembrada en el campo para la posterior evaluación de su descendencia.

### CUADRO 8. Efecto de la colchicina sobre la mortalidad de plantas duplicadas de trigo desarrolladas a partir de anteras

TABLE 8. Effect of the colchicine treatment on the percent survival of plantlets of wheat after treatment

Líneas de trigo	Plantas obtenidas Nº	Plantas 2n vivas Nº	Plantas 2n espontáneas Nº	Supervivencia %
3801	147	39	4	26,53
3802	26	8	0	30,77
3803	0	0	0	0,00
3804	2	0	0	0,00
3806	32	6	2	18,75
Total	671	110	18	16,40

### RESUMEN

El cultivo de anteras tiene un uso limitado para el mejoramiento genético del trigo, debido a que se obtienen pocas plantas doblehaploides ya que la capacidad androgénica es muy dependiente del genotipo. Se evaluó la eficiencia de los medios de cultivo N<sub>6</sub> y Potato-4, tanto en forma líquida como sólida, y el medio N<sub>6</sub> con o sin la agregación de Ficoll 400, sobre la capacidad androgénica de 10 genotipos de trigo y se consideró un nuevo método para la duplicación de cromosomas de las plantas haploides. Para el cultivo de anteras, éstas se incubaron a 25 ± 2 °C con una irradiación de 50 µE m<sup>-2</sup> seg<sup>-1</sup> y 16 hr de luz al día. Luego de un mes en estas condiciones, los callos formados a partir de las anteras, fueron traspasados a un medio regenerativo, luego de lo cual las plantas obtenidas se aclimataron en invernadero. La duplicación de cromosomas en las plantas haploides se realizó con colchicina (0,2%), aplicada *in vitro*, previo a la aclimatación de las plantas, o bien *in vivo* antes de la elongación del tallo.

Los resultados demuestran que, en general, los medios sólidos son mejores en inducir la formación de callos que los medios líquidos, que no hay diferencias en la capacidad de diferenciación de plantas a partir del callo entre la forma líquida y sólida del medio Potato-4, pero que en este sentido, el medio N<sub>6</sub> es mejor en su forma líquida. Además, la adición de Ficoll 400 (100 g/L) al medio N<sub>6</sub> mejoró significativamente la diferenciación de plantas a partir de los callos, pero no afectó la inducción de callos.

Se determinó que existe interacción entre el medio de cultivo y el genotipo utilizado, sin embargo, el medio Potato-4 mostró una mayor capacidad androgénica para la mayoría de los genotipos, resultando en un mayor número de plantas finales.

**Palabras claves:** androgénesis, trigo, medios de cultivo, cultivo de anteras.

## LITERATURA CITADA

- DE BUYSER, J. and HENRY, Y. 1986. Wheat: production of haploids. Performance of doubled haploids, and yield trials. In: Y.P.S. Bajaj (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry. 2: Crops I*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. p.: 73-88.
- HABERMANN, S. 1978. *Analysis of Qualitative Data. Introductory Topics*. Academic Press INC (London). Volume 1. 368 p.
- HEWSTONE O., NICOLE; MUÑOZ S., CARLOS y CORTAZAR S., RENE. 1990. Método de cultivo de anteras y capacidad androgénica de germoplasma chileno de trigo. *Agricultura Técnica (Chile)* 50: 130.
- HU, H. 1986. Wheat: improvement through anther culture. In: Y.P.S. Bajaj (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. p.: 55-72.
- JONES, A.M. and PETOLINO, J.F. 1988. Effects of support medium on embryo and plant production from cultured anthers of soft-red winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 12: 253-261.
- KAO, K.N. 1985. *In vitro* culture in barley breeding. International Atomic Energy Agency. Final research co-ordination meeting on evaluation of semidwarf cereal mutants for cross-breeding. Viena, Austria. p.: 183-191.
- KASHA, K.J.; ZIAUDDIN, A. and CHO, U.H. 1990. Haploids in cereal improvement: anther and microspore culture. XIX Stadler Genetics Symp. Missouri. Revised MS sent Apr 5/89 (In Press).
- KLEIJER, G., SCHMID, J. and WINZELER, H. 1986. La culture d'anthers: possibilités et limites dans la sélection du blé et de l'épeautre. *Revue Suisse Agric.* 18 (6): 305-311.
- KUDIRKA, D.T., SCHAEFFER, G.W. and BAENZIGER, P.S. 1986. Wheat genetic variability through anther culture. In: Y.P.S. Bajaj (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry. 2: Crops I*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. p.: 41-54.
- LAZAR, M.D., BAENZIGER, P.S. and SCHAEFFER, G.W. 1984. Combining abilities and heritability of callus formation and plantlet regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anthers culture. *Theor. Appl. Genet.* 68: 131-134.
- LIANG, G., XU, A. and TANG, H. 1987. Direct Generation of Wheat Haploids via Anther Culture. *Cell Biology & Molecular Genetics. Crop Science* 27: 336-339.
- MARBURGER, J.E., SAMMONS, D.J. and SCHAEFFER, G.W. 1987. Effect of a modified potato medium on anther culture of wheat. *Crop Science* 27: 351-354.
- MARSOLAIS, A.A., SEGUIN-SWARTZ, G. and KASHA, K.J. 1984. The influence of anther cold pretreatments and donor plant genotypes on *in vitro* androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 3: 69-79.
- MORAES-FERNANDES, M.J. and PICARD, E. 1983. Viability of Haploid Production by Anther Culture using Brazilian Wheat Genotypes *Rev. Brasil. Genet.* VI. 2: 261-277.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-97.
- OUYANG, J. 1986. Induction of pollen plants in *Triticum aestivum*. In: Hu, H. and H. Yang (ed.). *Haploids of Higher Plants in vitro*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. p.: 26-41.
- SHIMADA, T. 1981. Haploid plants regenerated from the pollen callus of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Jpn. J. Genet.* 56: 581-588.
- SZAREJKO, I. and MALUSZYNSKI, M. 1989. Induction and evaluation of doubled haploids derived from barley anther culture. International Atomic Energy Agency. Progress report RC 4465/R1/RB. Viena, Austria.
- ZHOU, H. and KONZAK, C.F. 1989. Improvement of anther culture methods for haploid production in wheat. *Crop Sci.* 29: 817-821.
- ZHUANG, J.J. and XU, J. 1983. Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus. In: Hu, H. and M.R. Vega (ed.). *Cell and Tissue culture techniques for cereal crop improvement*. Science Press, Beijing, PRC. 431 p.