

# ADEQUAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA DE ANTERAS E TESTES DE GENÓTIPOS DE TRIGO <sup>(1)</sup>

LUIS CARLOS DA SILVA RAMOS <sup>(2,4)</sup>, ÉRICA YUMI YOKOO <sup>(2,4)</sup>  
e CARLOS EDUARDO DE OLIVEIRA CAMARGO <sup>(3,4)</sup>

## RESUMO

Realizaram-se dois experimentos, o primeiro visando conhecer a capacidade androgênica de variedades de trigo e identificar as melhores condições para alcançar aquele objetivo, em termos de meios de cultura e microclima. No segundo, estudou-se maior número de variedades. No primeiro experimento, foram testadas as seguintes: PF 853031 e IAC 24, a primeira, usada como padrão; dois meios de cultura básicos, batata-2 e N6; duas auxinas, IAA e 2,4-D, nas doses de 3, 9 e 27  $\mu\text{mol/L}$ , e cinetina, nas doses de 2, 6, 12 e 24  $\mu\text{mol/L}$ . As anteras plaqueadas foram acondicionadas em sala fotoperiódica: (a) com 14 h de luz, 60  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (3.200 lux), à temperatura de 25°C, e (b) submetidas a pré-tratamento por quatro dias a 6°C e, em seguida, retornadas à condição a. Notou-se que a melhor combinação de tratamentos para a variedade IAC 24 foi o meio batata-2, 2,4-D a 27  $\mu\text{mol/L}$  e cinetina 2 a 6  $\mu\text{mol/L}$ , por promover maior indução de estruturas androgênicas. Já para a variedade PF 853031, a mesma combinação de tratamentos, exceto 2,4-D a 9  $\mu\text{mol/L}$ , promoveu também maior indução de estruturas androgênicas. Por outro lado, o pré-tratamento de quatro dias de frio causou maior indução de estruturas androgênicas em ambas as variedades. No segundo experimento, foram estudadas cinco variedades: PF 853048, usada como padrão, IAC 21, BH 1146, IAC 60 e Anahuac; dois meios de cultura básicos: batata-2 e N6; duas combinações hormonais: CH1 (10  $\mu\text{mol/L}$  IAA e 30  $\mu\text{mol/L}$  de cinetina), e CH2 (10  $\mu\text{mol/L}$  de 2,4-D e 3,0  $\mu\text{mol/L}$  de cinetina). Observou-se maior indução de estruturas androgênicas para a 'PF 853048', seguida da 'Anahuac'. Todavia, somente foram obtidas plantas para a primeira. Essa constatação sugere que a capacidade androgênica seja controlada geneticamente no trigo. Na combinação hormonal 10  $\mu\text{mol/L}$  de 2,4-D e 3  $\mu\text{mol/L}$  de cinetina houve maior formação de estruturas androgênicas. Transplantaram-se as plantas regeneradas para vasos contendo solo, alocando-as em casa de vegetação para aclimação, crescimento e florescimento. As plantas mostraram-se inférteis, mas produziram sementes após a duplicação pela técnica da colchicina.

**Termos de indexação:** trigo, *Triticum aestivum* L., cultura de anteras, diaplóide, variedades, reguladores do crescimento.

---

<sup>(1)</sup> Trabalho parcialmente financiado com recursos da Cooperativa dos Produtores de Trigo do Vale do Paranapanema. Recebido para publicação em 24 de fevereiro e aceito em 27 de outubro de 1994.

<sup>(2)</sup> Seção de Genética, Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Caixa Postal 28, 13001-970 Campinas (SP).

<sup>(3)</sup> Seção de Arroz e Cereais de Inverno, IAC.

<sup>(4)</sup> Com bolsa do CNPq.

## ABSTRACT

### CULTURE MEDIUM, MICROENVIRONMENT AND GENOTYPE EFFECTS ON WHEAT ANTHHER CULTURE

Experiments were carried out to establish conditions and to access varietal effects for wheat androgenesis. The varieties PF 853031, a standard known for androgenic capacity, and the IAC 24 of high agronomic value, were tested in two culture mediums, potato-2 and N6, including two auxins, IAA and 2.4-D, at 3, 9 and 27  $\mu\text{mol/L}$ , and kinetin, at 2, 6, 12 and 24  $\mu\text{mol/L}$ . The experiment was installed in factorial design with six blocks and 20 anthers per plate (a block). About 5,760 anthers were plated per variety. The experiment was left in a photoperiodic room with (a) 14 h of cool fluorescent light, 60  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (3,200 lux), at temperature of 25°C, and (b) pretreated in dark at 6°C for four days, then backed to a. The variety IAC 24 showed higher androgenic capacity than the PF 853031 variety, in medium potato-2, 2.4-D at 27  $\mu\text{mol/L}$  and kinetin from 2 to 6  $\mu\text{mol/L}$ . Cold treatment for four days was beneficial in improving androgenesis to both varieties. Five other varieties were studied, PF 853048, as a androgenic control, IAC 21, BH 1146, IAC 60 and Anahuac; two culture mediums, potato-2 and N6, along with two hormonal combinations, CH1 (IAA 10  $\mu\text{mol/L}$  and kinetin 30  $\mu\text{mol/L}$ ) and CH2 (2.4-D 10  $\mu\text{mol/L}$  and kin 3  $\mu\text{mol/L}$ ) in the condition as (b) above. The standard variety PF 853048 ranked first and Anahuac, the second in terms of androgenic response. However, plants were only obtained from PF 853048. It is likely that the androgenic effect is under genotype control in wheat. The hormonal combination 10  $\mu\text{mol/L}$  of 2.4-D and 3  $\mu\text{mol/L}$  of kinetin were observed to induce higher androgenic response. Regenerated plants were potted and left to flower. All of them showed to be infertile, but produced seeds after colchicine treatment.

**Index terms:** wheat, *Triticum aestivum* L., anther culture, dihaploids, varieties, growth regulators.

## 1. INTRODUÇÃO

O trigo é uma cultura alimentar de grande valor econômico para o Brasil, haja vista a quantidade consumida e o grande volume importado de grãos. Apesar de longos anos de pesquisa nacional, a produtividade agrícola média brasileira ainda é baixa, cerca de 1.000 kg/ha. Esse quadro demonstra a necessidade de novas opções na área de pesquisa básica com trigo.

Um dos principais obstáculos para a liberação de cultivares com características desejáveis é o tempo gasto para sua produção. O trigo é uma planta quase 100% autógama; assim sendo, a maioria dos métodos de melhoramento limita-se a hibridações, ou retrocruzamentos, seguidos de seleção para uniformidade das características desejadas. Normalmente, são feitas sete a oito gerações de autofecundação e três a cinco anos de avaliação das linha-

gens em experimentação regional, o que totaliza dez a treze anos, desde o início do programa até a produção de nova variedade.

Com a introdução de técnicas para a indução de androgênese pela cultura de anteras (Moraes-Fernandes & Picard, 1983; Schaeffer et al., 1979), ficou demonstrado que esse método poderia reduzir consideravelmente o tempo despendido na produção de genótipos 100% homozigotos para uso em programas de melhoramento genético do trigo.

A cultura de anteras "in vitro" foi iniciada em 1988 na Seção de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), com o intuito de testar meios de cultura quanto à capacidade androgênica de genótipos de interesse do programa de melhoramento do trigo do IAC, e produzir plantas diaplóides, usando-se colchicina. Já é sabido que a resposta androgênica é condicionada por fatores genéticos

(Moraes-Fernandes & Picard, 1983), ambientais (Ouyang et al., 1983) e composição do meio de cultura (Ching-Li & Kung-Hung, 1978). Este trabalho teve o intuito de acessar esses tipos de variáveis para cultivares de trigo do IAC.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram usadas plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) da coleção da Seção de Arroz e Cereais de Inverno do Centro Experimental de Campinas, crescidas em vasos a pleno sol e protegidas com telado de arame, para evitar ataques de pássaros. As diferentes etapas do método utilizado são descritas a seguir:

### 2.1 Inoculação das anteras

**a) Coleta das espigas** - As espigas foram coletadas no estádio de pré-antese, visando obter anteras com grãos de pólen na fase uninucleada, propensos à androgênese. A coleta foi feita quando ainda faltavam 2 a 3 cm para a espiga atingir a inserção da folha com a bainha.

**b) Descontaminação das espigas** - As espigas ainda protegidas pela bainha foram pré-lavadas com detergente comercial a 2% (v/v) para remover as impurezas da superfície externa da bainha, seguindo-se de enxágües com água destilada deionizada. As espigas foram descontaminadas em câmara asséptica, com solução 2% (v/v) de hipoclorito de sódio por 30 minutos e enxaguadas três vezes com água destilada deionizada estéril.

**c) Extração e plaqueamento das anteras** - As anteras foram extraídas assepticamente das espigas em câmara de fluxo laminar e colocadas na superfície do meio de cultura, para indução de estruturas androgênicas. Após a inoculação, as placas foram vedadas com filme de PVC (Omnifilm).

**d) Tratamentos físicos empregados** - Após o plaqueamento, as anteras foram submetidas a tratamentos térmicos e ambientais, visando aumentar a formação de estruturas embrionárias viáveis. Os tratamentos usados foram adaptados de Moraes-Fernandes & Picard (1983):

1) Temperatura de 6°C em geladeira, por três dias;

2) Sala escura por três dias;

3) Sala fotoperiódica (60  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  por 14 h) a 25°C, até a formação de estruturas androgênicas visíveis.

**e) Transferência das estruturas androgênicas para meio fresco** - Imediatamente após o crescimento de calos - ou estruturas androgênicas - transferiram-nas para o meio de regeneração até a diferenciação em plântulas, aguardando-se o desenvolvimento para aclimação em solo.

### 2.2 Experimento 1

Foram utilizadas duas variedades, a IAC 24, e outra como controle, PF 853031, de conhecida capacidade androgênica; dois meios de cultura, batata-2 modificado (Moraes Fernandes & Picard, 1983) e N6 (Chih-Ching, 1978); duas auxinas, IAA (ácido indolacético) e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) nas doses 3, 9 e 27  $\mu\text{mol/L}$  e cinetina (Kin), nas doses 2, 6, 12 e 24  $\mu\text{mol/L}$ .

Os tratamentos foram combinados fatorialmente, sendo usados 6 blocos e 20 anteras por parcela, sendo plaqueadas 5.760 anteras para cada genótipo. Os blocos foram distribuídos de forma a verificar-se também o efeito ambiental. Usou-se iluminação de luz branca fluorescente com 60  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (3.200 lux), fotoperíodo de 14 h, e temperatura de 25°C. Todavia, três blocos foram alocados em geladeira por quatro dias (6°C) antes de serem removidos para sala clara com os demais blocos.

As anteras foram plaqueadas no período de 10-25/8/88 para IAC 24 e de 24-29/8/88 para PF 853031. Após seu aparecimento, as estruturas androgênicas foram transferidas para meio de regeneração, quando foram avaliadas quanto à capacidade androgênica.

### 2.3 Experimento 2

Foram utilizadas cinco variedades do programa de melhoramento de trigo do IAC e dois meios de cultura. As variedades empregadas foram: PF

853048, IAC 21, BH 1146, IAC 60 e Anahuac; os meios de cultura foram batata-2 e N6, associados a duas combinações hormonais, 10  $\mu\text{mol/L}$  IAA com 30  $\mu\text{mol/L}$  Kin (CH1), e 10  $\mu\text{mol/L}$  2,4-D com 3,0  $\mu\text{mol/L}$  Kin (CH2).

Os tratamentos foram combinados fatorialmente e alocados em blocos ao acaso, com 32 repetições, sendo usadas 20 anteras por placa. As culturas foram mantidas inicialmente em geladeira por quatro dias a 6°C e, posteriormente, em sala fotoperiódica, como descrito no item 2.2.

## 2.4 Aclimação das plantas haplóides e duplicação cromossômica

Plantas verdes, com aspecto vigoroso da parte aérea e sistema radicular, de altura até 10 cm, foram transplantadas, preferencialmente em dias nublados e com alta umidade relativa, para saquinhos de polietileno com 5 L de solo e imediatamente irrigados. Os vasos foram deixados à sombra por três dias e depois ao relento, sendo submetidos a regas normais e tratamentos de praxe contra doenças.

As plantas foram induzidas a perfilhar para aumento da população, e verificou-se a fertilização na época do florescimento, pois plantas haplóides não produzem sementes. A duplicação do número de cromossomos das plantas estéreis foi feita usando-se colchicina, cuja solução foi preparada diluindo-se 2,5 g em 20 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), completando-se o volume final com água destilada a 1 L, para ter concentração final de 0,25%, sendo o pH da solução ajustado a 5,5.

Após o tratamento com colchicina, as plantas foram enxaguadas em água corrente e plantadas de volta aos saquinhos, que foram molhados com solução tampão fosfato. A solução tampão foi feita com 3,40 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (50  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{PO}_4$ ), pH final 7,0. Dessa solução, tomou-se uma alíquota de 50 ml que foi diluída em 12 L de água. Cada saquinho foi, então, molhado com cerca de 100 ml dessa solução final, protegido com um saco plástico transparente para evitar perda excessiva de água, e colocado em estufa coberta com "Sombrite" 50%, por 30 dias aproximadamente.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de duas a três semanas de cultura, observou-se a formação de pequenas estruturas brancas nas anteras, aparentemente não diferenciadas, e de tamanho aproximado de 1 mm, com aspecto de calo, às quais convencionou-se denominar "estruturas androgênicas".

As primeiras dessas estruturas foram observadas aos 20 dias, em média, para a variedade IAC 24. Os resultados mostraram maior formação das estruturas no meio batata-2 (Quadro 1), definido originalmente por Chia-Chun et al. (1978). O 2,4-D foi mais eficiente que o IAA, notadamente na maior dose empregada, 27  $\mu\text{mol/L}$ , enquanto as diferentes doses de cinetina não mostraram efeito acentuado. Dessa forma, a combinação meio batata-2, 27

Quadro 1. Número de estruturas androgênicas formadas por tratamento para o genótipo IAC 24

Auxina	$\mu\text{mol/L}$	Meio batata-2				Total
		Kin ( $\mu\text{mol/L}$ )				
		2	6	12	24	
IAA	3	0	2	1	3	6
	9	2	1	5	0	8
	27	2	2	1	1	6
Total		4	5	7	4	20
2,4-D	3	2	2	0	5	9
	9	3	2	0	3	8
	27	6	6	3	2	17
Total		11	10	3	10	34
Subtotal		15	15	10	14	54

  

Auxina	$\mu\text{mol/L}$	Meio N6				Total
		Kin ( $\mu\text{mol/L}$ )				
		2	6	12	24	
IAA	3	0	0	1	1	2
	9	0	0	0	0	0
	27	0	0	0	0	0
Total		0	0	1	1	2
2,4-D	3	2	0	0	0	2
	9	0	0	1	1	2
	27	0	0	0	0	0
Total		2	0	1	1	4
Total		2	0	2	2	6

$\mu\text{mol/L}$  de 2,4-D e 2 a 6  $\mu\text{mol/L}$  de cinetina promoveu maior indução de estruturas androgênicas para a variedade IAC 24.

Para a 'PF 853031', observaram-se as primeiras estruturas androgênicas, em média, após 30 dias de cultura. Assim, a combinação de tratamentos, meio batata-2, 9  $\mu\text{mol/L}$  de 2,4-D, e 2 a 6  $\mu\text{mol/L}$  de cinetina, promoveu maior indução de estruturas androgênicas (Quadro 2). Também se observou para ambos os genótipos, IAC 24 e PF 853031, que as anteras pré-tratadas por quatro dias em geladeira a 6°C apresentaram uma resposta superior em formação de estruturas androgênicas (Quadro 3).

A frequência de regeneração de plantas e calos foi diferente para as duas variedades. Das 5.760 anteras inoculadas para ambas as variedades, ob-

Quadro 2. Número de estruturas androgênicas formadas por tratamento para o genótipo PF 853031

Auxina	$\mu\text{mol/L}$	Meio batata-2				Total
		Kin ( $\mu\text{mol/L}$ )				
		2	6	12	24	
IAA	3	0	4	4	0	8
	9	8	4	3	0	15
	27	1	1	1	0	3
Total		9	9	8	0	26
2,4-D	3	4	3	3	2	12
	9	5	7	3	3	18
	27	2	5	0	0	7
Total		11	15	6	5	37
Subtotal		20	24	14	5	63

  

Auxina	$\mu\text{mol/L}$	Meio N6				Total
		Kin ( $\mu\text{mol/L}$ )				
		2	6	12	24	
IAA	3	1	3	1	0	5
	9	2	6	3	3	14
	27	4	0	3	3	10
Total		7	9	7	6	29
2,4-D	3	1	3	2	4	10
	9	0	0	2	4	6
	27	2	3	5	0	10
Total		3	6	9	8	26
Total		10	15	16	26	55

teve-se 1,04% de estruturas androgênicas para IAC 24 e 2,06% para PF 853031. Todavia, obteve-se 0,31% de plantas para a primeira e 0,20% para a segunda. Esses dados mostram que a porcentagem de plantas a partir de calos foi de 30,0% para IAC 24 e 9,32% para PF 853031.

No quadro 4 são mostrados os resultados quanto ao número de estruturas androgênicas formadas em função dos tratamentos para as cinco variedades de trigo (experimento 2). Para a variedade PF 853048, observou-se melhor resultado em meio de cultura N6, 10  $\mu\text{mol/L}$  de IAA e 30  $\mu\text{mol/L}$  de cinetina, que também propiciou maior formação de estruturas.

Não foi observada a formação de estruturas androgênicas para a 'IAC 21', e sua porcentagem foi muito baixa nas variedades BH 1146 e IAC 60.

Embora a formação de estruturas androgênicas tenha sido de 2,5%, não se observou regeneração de plantas para a variedade Anahuac (Quadro 5), nem diferenças entre os dois meios de cultura; obteve-se, porém, melhor resultado na combinação hormonal CH2 (10  $\mu\text{mol/L}$  de 2,4-D e 3  $\mu\text{mol/L}$  de cinetina).

Quadro 3. Número de estruturas androgênicas formadas na ausência e na presença de tratamento de frio

Bloco	Sem tratamento	
	IAC 24	PF 853031
1	14	21
3	6	18
5	6	8
Total	26	47

  

Bloco	Com tratamento de frio	
	IAC 24	PF 853031
2	18	39
4	9	27
6	7	5
Total	34	71

Quadro 4. Número de estruturas androgênicas formadas em função de variedade, meio de cultura (N6 e BT: batata-2) e combinação hormonal (CH)

Tratamento	Variedade					Total	
	PF-853048	IAC 21	BH 1146	IAC 60	Anahuac		
N6	CH1 <sup>(1)</sup>	8	0	1	0	0	9
	CH2	6	0	2	2	4	14
BT	CH1	6	0	1	1	1	9
	CH2	3	0	0	1	3	7
<hr/>							
	N6 <sup>(2)</sup>	14	0	3	2	4	23
	BT	9	0	1	2	4	16
	CH1 <sup>(3)</sup>	14	0	2	1	1	18
	CH2	9	0	2	3	7	21
<hr/>							
Total		23	0	4	4	8	39

(<sup>1</sup>) CH1: 10 µmol/L IAA + 30 µmol/L Kin; CH2: 10 µmol/L 2,4-D + 3,0 µmol/L Kin. (<sup>2</sup>) Total de estruturas formadas, desprezando-se o efeito CH. (<sup>3</sup>) Idem, desprezando-se o efeito de meio-base.

Após a repicagem das estruturas androgênicas para o meio de regeneração (Moraes-Fernandes & Picard, 1983), obteve-se apenas 0,15% de plantas para a variedade PF 853048 (Quadro 5), valor similar ao obtido por aqueles autores. Esse número pode ser considerado como relativamente baixo, levando-se em conta que a regeneração de plantas por esse método não ultrapassa 1 a 2%, para variedades de trigo estudadas em meio sólido (Chia-Chun et al., 1978; Moraes Fernandes & Picard, 1983; Zhou & Konzak, 1989; Masojc et al., 1993). Não foram obtidas plantas androgênicas para os demais cultivares.

Todavia, existe grande variabilidade para a capacidade de regeneração, conforme os genótipos empregados (Deaton et al., 1987; Jones & Petolino, 1987; Masojc et al., 1993). Além do mais, existe interação genótipo/meio de cultura, indicando que meios adequados devem ser desenvolvidos para variedades específicas. Como genótipos distintos, podem dar respostas variadas em diferentes condições ambientais (Bjorstad et al., 1989; Lazar et al., 1990), é possível que outras condições de cultivo ou de meios permitam obter haplóides a partir de

genótipos recalcitrantes (Trottier et al., 1993). Para estudos de androgênese, o crescimento de plantas em temperaturas de 12 a 15°C estimula a regeneração de plantas haplóides, em relação ao crescimento em temperaturas de 15 a 21°C (Bjorstad et al., 1989). As plantas usadas neste trabalho cresceram sob temperaturas e luminosidade superiores, o que pode ter reduzido a taxa de androgênese.

Quadro 5. Porcentagem de estruturas androgênicas (EA) e plantas regeneradas (P), bem como EA formadas no tratamento que favoreceu um máximo de androgênese (EATMA)

Variedade	EA	Plantas	%	
			P/EA	EATMA
PF 853048	3,8	0,15	4,2	5,0
IAC 21	0,0	0,0	0,0	0,0
BH 1146	0,6	0,0	0,0	1,2
IAC 60	0,6	0,0	0,0	2,5
Anahuac	1,2	0,0	0,0	2,5

As plantas regeneradas foram transplantadas para vasos com terra e não se mostraram férteis após o florescimento, mas produziram sementes depois de tratadas com colchicina. A fase de aclimação é um período crítico na cultura de anteras, pois, caso não se consiga um número substancial de plantas sobreviventes, a variabilidade genética recuperada a partir de uma planta heterozigota poderá ser pequena, diminuindo-se as chances de encontrar genótipos desejados. Uma aclimação favorável pode ser conseguida em condições de temperatura ao redor de 10°C e com alta luminosidade, pois promove abundante perfilhamento.

#### 4. CONCLUSÕES

1. Observou-se o efeito de genótipo, bem como do tipo de meio de cultura e do pré-tratamento a frio na androgênese.
2. A variedade IAC 24 apresentou capacidade androgênica ligeiramente superior ao controle usado.
3. No meio de cultura batata-2 foi observada resposta superior, em termos de androgênese, ao meio N6, sendo o 2,4-D superior ao IAA.
4. O método empregado pode ser usado para a obtenção de plantas diaplóides em trigo.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Dr.<sup>a</sup> Maria Irene B. de Moraes-Fernandes, do CNPT-EMBRAPA, Passo Fundo (RS), o fornecimento de sementes das variedades PF 853031 (atualmente, cultivar BR 43) e PF 853048, bem como as valiosas sugestões na fase inicial dos trabalhos.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BJORSTAD, A.; OPSAHL-FERSTAD, H-G. & AASMO, A. Effect of donor plant environment and light during incubation on anther cultures of some spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, **17**:27-37, 1989.
- CHIA-CHUN, C.; TSUN-WEN, O.; HSU, C.; SHU-MIN, C. & CHIEN-KANG, C.A. Set of potato media for wheat anther culture. *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture*. Peking, Science Press, 1978. p.51-56.
- CHIH-CHING, CHU. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture*. Peking, Science Press, 1978. p.43-50.
- CHING-LI, PAN & KUNG-HUNG, KAO. The production of pollen embryo and the influence of some factors on its frequency of induction. *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture*. Peking, Science Press, 1978. p.132-142.
- DEATON, W.R.; METZ, S.G.; ARMSTRONG, T.A. & MASCIA, P.N. Genetic analysis of the anther-culture response of three spring wheat crosses. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, **74**:334-338, 1987.
- JONES, A.M. & PETOLINO, J.F. Effects of donor plant genotype and growth environment on anther culture of softred winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, Dordrecht, **8**:215-223, 1987.
- LAZAR, M.D.; SCHAEFFER, G.W. & BAEZINGER, P.S. The effects of interactions of culture environment with genotype on wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture response. *Plant Cell Reports*, Heidelberg, **8**:525-529, 1990.
- MASOJC, P.; LUKOW, O.M.; MCKENZIE & HOMES, N.K. Responsiveness to anther culture in cultivars and F1 crosses of spring wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, **73**:777-783, 1993.
- MORAES-FERNANDES, M.I.B. & PICARD, E. Viability of haploid production by anther culture using Brazilian wheat genotypes. *Brazilian Journal of Genetics*, Ribeirão Preto, **6**(2):261-277, 1983.
- OUYANG, J.W.; ZHOU, S.M. & JIA, S.E. The response of anther culture to culture temperature in *Triticum aestivum*. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, **66**:101-109, 1983.
- SCHAEFFER, G.W.; BAENZINGER, P.S. & WORLEY, J. Haploid plant development from anthers and in vitro culture of wheat. *Crop Science*, Madison, **19**:697-702, 1979.
- TROTTIER, M.; COLLIN, J. & COMEAU, A. Comparison of media for their aptitude in wheat anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, **35**:59-67, 1993.
- ZHOU, H. & KONZAK, C.F. Improvement of anther culture methods for haploid production in wheat. *Crop Science*, Madison, **29**:817-821, 1989.