

## Metodutveckling för produktion av fördubblade haploider i stråsäd

### Bakgrund

För att det svenska lantbruket ska få tillgång till nya sorter med aktuella egenskaper lika snabbt som sina europeiska konkurrenter är det viktigt att förädlingsmetoder, som förkortar tiden från upptäckt av egenskap i lämplig källa eller från det att ett behov uppstår, fram till färdig sort, utvecklas. Att producera fördubblade haploider (DH) är ett snabbt sätt att skapa homozygota linjer i olika växtslag. Det innebär att tiden från införande av en ny egenskap i en gröda fram till färdig sort kan minskas och det är viktigt både odlingstekniskt och konkurrensmässigt.

Cell- och vävnadsodling av enhjärtbladiga växtarter (t.ex. stråsäd och gräs) är betydligt svårare än cellodling av tvåhjärtbladiga arter (Steward, 1983). Detta gäller också vid produktion av fördubblade haploider. Bildandet av albinoplantor är ett problem vid produktion i stråsäd, men också dålig respons när det gäller embryobildning och skottregeneration i många genotyper av framför allt vete (Careda & Clément, 1999).

I en stor del av vetets genpool kan fortfarande inte ståndar- eller mikrosporodling användas för produktion av fördubblade haploider eftersom flertalet genotyper saknar responsivitet med befintliga metoder. Ett alternativ för att ändå kunna producera fördubblade haploider av dessa genotyper är att göra pollineringar med andra arter, t.ex. majs som inte bildar hybrider med vete. Efter pollineringen elimineras de främmande kromosomerna och kvar blir ett embryo med haploid vetekromosomuppsättning (Laurie & Bennett, 1986).

För att framställa fördubblade haploider i höstvet på Svalöf Weibull har ståndarodling använts under drygt 10 år. Den begränsande faktorn för användning av ståndarodling vid produktion av fördubblade haploider i stor skala är att metoden endast fungerar med en mindre andel av de önskvärda linjerna. Då mikrosporodling i korn har visat sig ge fler gröna plantor än ståndarodling med samma genotyper, är förhoppningen att samma förhållanden ska gälla för vete. Utveckling av en bra metod för mikrosporodling av höstvet är det viktigaste målet för projektet. Som en del i arbetet har även screening av höstvetegenotyper med ståndarodling utförts.

Odling av isolerade mikrosporer för framställning av fördubblade haploider fungerar betydligt bättre i höstkorn än i vårkorn. Ett mål för projektet var att försöka effektivisera DH-produktionen i vårkorn med odling av isolerade mikrosporer.

Vid val av metod för framställning av DH i vårkorn har odling av isolerade mikrosporer den största potentialen. Metoden är tekniskt komplicerad och responsiviteten hos olika genotyper av vårkorn är mycket varierande vilket för närvarande begränsar användningen. Under 2005 har ett grundprotokoll enligt Kasha et al. (2003) valts och en serie modifieringar provats.

Modifieringarna representerar avgörande steg i mikrosporkulturförloppet, odling av donatorplantor, själva mikrosporisoleringen, sammansättningen av induktionsmedium, behovet av differentieringsmedium, och sammansättningen av regenerationsmedium. Om inget annat angetts har försöken utförts med vårkorgenotypen "Lina" som utmärks av god responsivitet för mikrosporodling.

Havre är en viktig gröda för SW och Sverige och produktion av DH-linjer även i denna art är önskvärt. Ett nytt protokoll från Finland har testats och utvärderats (Kiviharju et al., 2005).

## **Material och metoder**

### ***Vete***

Tidigare arbete i detta projekts föregångare visade att en metod publicerad av Holme et al. (1999) som har vidareutvecklats, har varit den effektivaste för odling av isolerade mikrosporer i nordeuropeiska höstveten. Som en fortsättning av det arbetet har ATP-behandling av mikrosporer lagts till, för ett försöka minska albinofrekvensen. Tre olika ATP-koncentrationer, 0,5, 1 och 5 mM samt en kontroll utan ATP har jämförts. Fyra olika genotyper, valda för sin olikhet i responsivitet, har använts i detta arbete och resultaten redovisade här bygger på 167 mikrosporisoleringar.

Inom projektets ram har drygt 50 höstvetelinjer testats för sin responsivitet i ståndarodling.

### ***Korn***

I vårkorn har behandling med colchicin i av de isolerade mikrosporer testats för att se om samma positiva resultat som tidigare erhållits i höstvete när det gäller produktion av gröna plantor, skulle kunna erhållas även i denna gröda. Colchicin i koncentrationerna 100, 300, 500 och 3000  $\mu\text{M}$  samt en kontroll utan colchicin jämfördes tillsammans med en metod huvudsakligen framtagen av Kasha et al. (2003). Arbetet har utförts som ett examensarbete i utbildningen till biomedicinsk analytiker.

### ***Odlingsbetingelser***

Två olika jämförelser har gjorts av odlingsbetingelser för donatorplantor. Tre typer av odlingsrum ingår i jämförelserna: odlingskammare utan dagsljus, klimatstyrt växthus vid SW laboratoriet i Svalöv, och klimatstyrt växthus vid Biotronen i Alnarp. I jämförelsen mellan klimatstyrda växthus ingick fyra genotyper av vårkorn.

Donatorplantorna odlades under vinterhalvåret. För odlingsbetingelserna var specifikationen: Plantor odlas i 3 l krukor med 1-3 plantor per kruka. Odlingssubstratet är Kronmulls fullgödslad Krukväxtjord Exklusiv med tillsats av 2,3 g/planta av Plantacote långtidsverkande gödning. För tilläggsbelysning används OSRAM 400W metallhalogenlampor och ljusintensiteten är 300-400  $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Temperaturer för vårkorn är 16°C dag/15°C natt. Relativ luftfuktighet är 65%.

### ***Mikrosporodlingsmetod***

I mikrosporkultur enligt Kasha et al. (2003) placeras isolerade mikrosporer på filterpapper på ytan av Gelrite (3,5 g/l) -stabiliserad FHG i en 6 cm petriskål för induktion av androgenes och fuktas därefter med jämna mellanrum med ett par droppar FHG. Som alternativ provades att placera en mikrosporkultur ovanpå FHG stabiliserad med agaros. Två koncentrationer av agaros provades, 2 g/l respektive 3 g/l. Efter isolering och 2 tvättar i 0,3 M mannitol slammas mikrosporer upp i 1 ml FHG. Mikrosporer fördelas på två skålar och läggs med pipett i en utbredd stor droppe på FHG-agarosplattan. Under två veckor tillsätts FHG medium tre gånger försiktigt med pipett så att mikrosporsuspensionen utvidgas i takt med att embryona växer.

Efter 14 dagar överförs suspensionen med sked till 9 cm skålar med Gelrite-stabiliserat FHG-induktionsmedium eftersom den mindre petriskålen inte längre räcker till. En månad efter

isoleringen flyttas embryona med sked till Gelrite-stabiliserat differentieringsmedium, och efter ytterligare 14 dagar till Gelrite-stabiliserat regenerationsmedium i odlingsburkar.

#### *Induktionsmedium*

För att inducera androgenes hos isolerade mikrosporer utsätts de för temperatur- och näringsstress, varefter de odlas på särskilt (FHG) induktionsmedium. I den aktuella metoden är induktionsmediet stabiliserat med 3,5 g/l Gelrite. Mikrosporererna odlas på ett filterpapper som lagts på FHG-mediumets yta. En alternativ metod är att odla mikrosporererna i en droppe FHG medium på ytan av agaros-stabiliserat FHG induktionsmedium. Två försök gjordes, det första med olika agaroskoncentrationer och det andra med fler genotyper och i två olika odlingsbetingelser för donatorplantorna.

Då olika modifieringar av induktionsmediet FHG förekommer i litteraturen gjordes en jämförelse av tillsatser av tillväxtregulatorer. I detta fall användes BAP på nivån 1,0 mg/l i samtliga isoleringar medan hälften dessutom innehöll 10 mg/l PAA. Tre genotyper av vårkorn, Lina, Annabell och Simba användes.

#### *Differentieringsmedium*

I ett försök att förenkla protokollet Kasha et al. (2003), provades att utesluta steget med differentieringsmedium.

#### *Regenerationsmedium*

Regenerationsmediet enligt Kasha et al. (2003) baseras på (Murashige & Skoog, 1962) med tillsats av hormoner; IAA 1,0 mg/l och kinetin 1,0 mg/l. Detta jämfördes med Murashige & Skoog medium enligt Duchefa utan tillsats av hormoner. Tio ax av Lina vårkorn poolades i en mikrosporisolering efter att ha förbehandlats i 0,3 M mannitol vid 4°C i 5 dagar. De isolerade mikrosporererna placerades på ett fuktat filterpapper ovanpå Gelrite-stabiliserat FHG induktionsmedium i 6 cm petriskål. Tre droppar flytande FHG medium tillfördes 1 gång per vecka. Embryotillväxten bedömdes efter 6 veckor enligt en skala 0-5, där 5 motsvarar >200 embryon. Embryon flyttades därefter till differentieringsmedium och fördelades på fyra stycken 9 cm petriskålar. Efter 14 dagar på differentieringsmedium flyttades embryona till de två olika regenerationsmedium. Avläsning av antal regenererade gröna och vita skott gjordes för respektive medium efter 30 dagar. Dessutom gjordes en bedömning av plantornas tillväxt och rotningsförmåga.

#### *Havre*

I havre har ett nytt protokoll för DH-produktion med ståndarodling, publicerat av Kiviharju et al. (2005), testats med tre olika havresorter, Lisbeth, Aslak och Belinda.

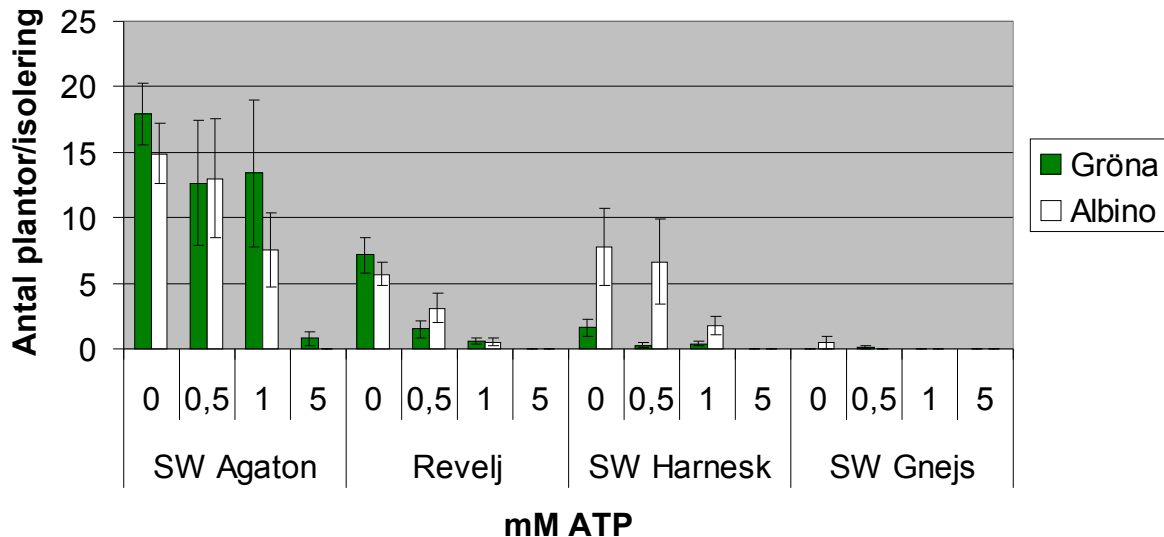
## **Resultat**

#### *Vete*

Resultaten av behandlingen med olika koncentration adenosintrifosfat (ATP) baseras på totalt 167 mikrosporisoleringar. En responsiv sort (SW Agaton), en sort med sämre responsivitet (Revelj), en sort med dålig responsivitet (SW Harnesk) och en sort utan responsivitet (SW Gnejs) har ingått i studien. Metoden som har använts vid isoleringarna är ursprungligen utvecklad på KVL (Holme et al. 1999) och senare modifierad av Jensen (2002). Metoden är den som visat sig fungera bäst på nordeuropeiska genotyper i jämförelse med andra metoder (Touraev et al., 1996, Kumlehn, pers. medd. 1999, Kasha & Simion, 2001, Konzak et al., 2001). Försök har tidigare gjorts med lustgas-, syrgas- och lustgas- i kombination med colchicinbehandling. Lustgas- i kombination med colchicinbehandling är den metod som varit

mest framgångsrik för att erhålla maximalt antal gröna plantor och detta har nu testats med tillsats av ATP för att minska andelen producerade albinoplantor. Albinofrekvensen minskar med ökande ATP-koncentration men skillnaderna är inte signifikanta. Även mängden producerade gröna plantor påverkas negativt av ökande ATP-koncentration.

## Mikrosporodling i höstvet



Figur 1. Medelvärden och standardfel för antal producerade gröna och albinoplantor per mikrosporodling i sorterna SW Agaton, Revelj, SW Harnesk och SW Gnejs med mikrosporodlingsmetod enl. Jensen (2002) kompletterad med lustgas- och colchicinbehandling kombinerat med behandling med olika koncentrationer adenosintrifosfat (0mM, 0,5mM, 1mM resp. 5mM ATP).

Vid screening av responsivitet i ståndarodling av ett femtiotal vetelinjer gav 52% inga gröna plantor och 48% mellan 0,1 och 3 gröna plantor per ax.

### **Korn**

Behandling av mikrosporer med 100  $\mu$ M colchicin gav högre antal gröna plantor per isolering (371 jmf med 276), men lägre frekvens gröna plantor (69,2%) än obehandlade mikrosporer (73,2%). Övriga behandlingar gav sämre resultat än kontrollen.

*Två odlingsbetingelser för donatorplantor; SW-kammare nr 5 och klimatstyrt växthus Rönneberga 2.*

För donatorplantor odlade under vintern blev resultatet till förmån för material som odlats i klimatstyrt växthus. Längre fram på våren förbättrades utfallet ytterligare räknat som antal regenererade gröna plantor per använt donatorplantax.

Växtplats för donatorplantor	Datum för sådd	Antal mikrospor-isoleringar	Gröna plantor	Albina plantor	Gröna plantor/donatorax	Frekv. gröna plantor
SW5	2004-12-08	2	452	90	20,5	0,8
Rb2	2004-12-21	3	749	189	22,7	0,8
Rb2	2005-01-05	2	331	78	15,8	0,8
Rb2	2005-03-24	3	1705	722	47,4	0,7

Tabell 1. Resultat av mikrosporkultur från donatorplantor odlade i två odlingsbetingelser med samma specifikation men olika tekniska förutsättningar. SW5: Odlingskammare. Rb2: Klimatstyrt växthus

*Två odlingsplatser för donatorplantor; Biotronen i Alnarp och Rönnebergsväxthuset på SW laboratoriet okt 2005 – febr 2006.*

I jämförelsen mellan två olika klimatstyrda växthussystem erhöles positiv effekt i frekvens gröna haploida plantor per använt donatorplantax i Biotronen jämfört med det mindre avancerade anläggningen vid SW laboratoriet. För den icke-responsiva genotypen Sebastian erhöles ingen förbättring.

Växthus	Sort	Donator-plantax	Gröna plantor	Frekv. gröna/donator-plantax	Albina plantor	Frekv. albina plantor
Biotron	DH Lina	24	611	25,5	131	0,18
Biotron	Sebastian		0		0	
Biotron	Annabell	33	29	0,9	36	0,55
Biotron	Scandium	25	2	0,1	72	0,97
SWlab	DH Lina	36	587	16,3	34	0,05
SWlab	Sebastian		0		0	
SWlab	Annabell	25	21	0,8	24	0,53
SWlab	Scandium	26	1	0,04	57	0,98

Tabell 2. Resultat av mikrosporodling från fyra genotyper donatorplantor odlade i två typer av klimatstyrda rum med samma specifikation av odlingsbetingelser.

*Metodjämförelse mellan induktion av androgenes med mikrosporkultur på agarosstabiliserat FHG induktionsmedium och mikrosporkultur på filterpapper på ytan av Gelrite-stabiliserat FHG-medium.*

Effekten av att använda agarosstabiliserat induktionsmedium var stor. Frekvensen regenererade gröna haploida plantor ökade från 22,7 per använt donatorplantax till 179,3 vid 3,0 g/l agaros. 5-12 ax användes för varje mikrosporisolering. Frekvensen albina plantor ökade också, men inte så att det påverkade resultatet negativt.

<b>FHG induktionsmedium</b>	<b>Antal isoleringar</b>	<b>Medelvärde gröna haploider</b>	<b>Medelvärde albina haploider</b>	<b>Frekv. gröna haploider/donatorax</b>	<b>Frekv. albina haploider/donatorax</b>
Gelrite 3,5 g/l	3	249,7	63,0	22,7	5,7
Agaros 2,0 g/l	3	873,3	104,7	170,7	20,6
Agaros 3,0 g/l	3	930,0	114,0	179,3	22,4

Tabell 3. Induktion av haploida plantor vid in vitro odling av isolerade mikrosporer på FHG induktionsmedium stabiliserat med 3,5 g/l Gelrite och två koncentrationer av agaros.

Ett andra försök, med tre genotyper odlade i klimatstyrkt växthus i Alnarp gav liknande resultat med förbättring av frekvensen regenererade plantor efter embryoiduktion på agarosstabiliserat medium.

<b>Växthus</b>	<b>Sort</b>	<b>Donatorplantax</b>	<b>Stabiliserings av FHG induktionsmedium</b>	<b>Gröna plantor</b>	<b>Frekv. gröna plantor/donatorplantax</b>	<b>Albina plantor</b>	<b>Frekv. albina plantor</b>
Biotron	DH Lina	24	agaros	4280	<b>178,3</b>	179	0,04
Biotron	Annabell	12	agaros	46	<b>3,8</b>	17	0,27
Biotron	Scandium	24	agaros	7	<b>0,3</b>	87	0,93
Biotron	DH Lina	24	gelrite	611	<b>25,5</b>	131	0,18
Biotron	Annabell	33	gelrite	29	<b>0,9</b>	36	0,55
Biotron	Scandium	25	gelrite	2	<b>0,1</b>	72	0,97

Tabell 4. Induktion av haploida plantor vid in vitro odling av isolerade mikrosporer på FHG induktionsmedium stabiliserat med 3,5 g/l Gelrite och 3,0 g/l agaros.

*Protokolljämförelse med eller utan tillsats av PAA i FHG induktionsmedium i modif. protokoll enligt Kasha et al 2003.*

Tillsats av BAP + PAA ger en positiv effekt, dvs ökad induktion av gröna plantor jämfört med enbart BAP. Dock visar resultatet också att en genotypinteraktion kan förekomma.

<b>Genotyp</b>	<b>Nr</b>	<b>Mikrosporisolering nr</b>	<b>Induktionsmedium</b>	<b>Gröna plantor/ax</b>
Lina	8597	72a	BAP+PAA	28,31
Lina	8597	72b	BAP	22,73
Annabell	8599	58	BAP+PAA	0,92
Annabell	8599	63	BAP	0,58
Annabell	8599	67	BAP+PAA	1,00
Annabell	8599	69	BAP	0,08
Simba	8601	55	BAP+PAA	0,00
Simba	8601	56	BAP	2,33
Simba	8601	59	BAP+PAA	0,55
Simba	8601	64	BAP	1,42

Tabell 5. Jämförelse mellan två tillsatser av växthormoner i regenerationsmedium vid framställning av haploida plantor genom modifiering av protokoll enl. Kasha et al. (2003).

*Protokolljämförelse med eller utan differentieringsmedium i modif. protokoll enligt Kasha et al 2003.*

I ett försök att förenkla protokollet Kasha et al. (2003), provades att utesluta steget med differentieringsmedium för hälften av antalet inducerade embryon i ett experiment med 6 mikrosporisolerings i genotypen Lina. I inget av dessa erhöles någon regeneration av skott eller rötter om differentieringsmedium uteslöts medan medeltalet haploida plantor per använt donatorax efter mikrosporodling med påföljande användning av differentieringsmedium blev 196,5.

*Jämförelse av regenerationsmedium av MS-grundtyp enligt Duchefa och modifierat enligt Kasha et al 2003.*

Mikrosporisoleringsen gav  $1,2 \times 10^6$  mikrosporer och en embryotillväxt i högsta bedömningsklass. Tabellen visar att något fler plantor regenererades med hormonberikat medium. Skillnaderna är dock inte statistiskt signifikanta. Å andra sidan erhöles betydligt bättre rotutveckling vid odling på hormonfritt medium, varför det senare är att föredra.

Reg medium	Odl.burk nr	Gröna plantor	Albina plantor	Summa plantor
MS Kasha	a	11	0	11
MS Kasha	b	11	0	11
MS Kasha	c	12	1	13
MS Kasha	d	17	8	25
MS Kasha	e	53	9	62
<b>Summa</b>		<b>104</b>	<b>18</b>	<b>122</b>
<b>Medel</b>		<b>20,8</b>	<b>3,6</b>	<b>24,4</b>
MS Duchefa	a	14	0	14
MS Duchefa	b	8	0	8
MS Duchefa	c	13	0	13
MS Duchefa	d	19	4	23
MS Duchefa	e	28	2	30
<b>Summa</b>		<b>82</b>	<b>6</b>	<b>88</b>
<b>Medel</b>		<b>16,4</b>	<b>1,2</b>	<b>17,6</b>

Tabell 7. Antal gröna och albina plantor efter odling på två olika regenerationsmedium, enligt Murashige & Skoog, 1968 (MS Duchefa) och modifierat (MS Kasha).

### *Havre*

Av varje genotyp lades ståndarna från 57 till 70 vippor. Från 5,9 till 0,3 embryon per vipa bildades och mellan 7,1 och 41,6% av embryona grodde och gav gröna plantor. Endast 20% av de gröna plantorna hade spontanfördblade kromosomer och 80% var haploider.

Tabell 8. Antal lagda vippor, producerade embryon, regenererade gröna och albinoplantor samt ploidinivån på de producerade gröna plantorna.

Genotyp	Lagda vippor	Antal embryo	Gröna plantor	Albino-plantor	Ploidinivå	
					1x	2x
Lisbeth	62	365	26	1	22	4
Aslak	70	245	102	10	63	18
Belinda	57	19	2	1	2	

## **Diskussion**

### ***Vete***

Även om behandlingen med ATP har minskat albinofrekvensen något är skillnaderna mellan olika behandlingar inte signifikanta och det faktum att också antalet producerade gröna plantor minskar är negativt ur produktionssynpunkt. Att hitta någon koncentration som är positiv eller neutral för alla genotyper verkar inte vara möjligt och detta begränsar användningen av ATP avsevärt.

### ***Korn***

Behandlingen av kornmikrosporer med colchicin har, i de begränsade studier som gjorts här, visat på positiva tendenser. Utökade studier för att hitta rätt behandlingstid och –koncentration är önskvärt.

Till de viktigare problem som återstår att lösa när det gäller mikrosporodling i vårkorn hör en starkt genotypberoende responsivitet. Ett annat gäller problem med embryogroning och regeneration av skott och rötter in vitro. I denna undersökning har vi försökt utveckla ett av de senast publicerade protokollen mot att bli mer generellt verkande genom att angripa ett par betydelsefulla moment. Delvis utanför själva protokollet ligger de specifika egenskaperna hos varje unik odlingsanläggning som kraftigt påverkar donatorplantornas odlingsbetingelser och därmed också utfallet av mikrosporodlingen. Den positiva responsen (om än svag) av odling i Biotronanläggningens växthusdel ger en indikation på hur klimatstyrningen bör åstadkommas. Skillnaden jämfört med Rönnebergsväxthuset består i en stabilare lufttemperatur över hela kammarens yta och d:o relativ fuktighet genom ett noggrant styrt luftflöde. Avsevärda variationer i planttemperaturer uppkom dock genom att möjlighet till solavskärmning inte fanns.

Den positiva effekten av odling på agarosstabiliserat induktionsmedium är en klar förbättring samtidigt som metoden kräver ytterligare utvecklingsarbete för att bemästra problem med kollapsande kulturer. Induktionsmediets hormonsammansättning visade sig också ha stor betydelse för utfallet och mediet enligt Kasha et al (2003) med tillsats av BAP och PAA utgör därvid ett framsteg jämfört med det provade alternativet. Detsamma gäller för användning av differentieringsmedium i embryokulturen.

Slutligen uppnåddes framsteg och en förenkling i slutsteget som består av odling av differentierade embryon på regenerationsmedium. Genom att helt slopa hormontillsats blev effekten visserligen att frekvensen regenererade skott blev något lägre men samtidigt kunde standardmedium användas samtidigt som väsentligt bättre rotning och planttillväxt uppnåddes.

### ***Havre***

För första gången har gröna plantor regenererats från ståndarodling i havre på SW laboratoriet. Detta positiva resultat har lett till fortsatta försök med utökad genpool.

## **Publikationer**

Dahl K (2005) Behandling av kornmikrosporer med colchicin för ökad produktion av fördubblade haploida plantor. Examensarbete 10 poäng, Biomedicinsk analytiker utbildning, Lunds Universitet, juni 2005.



DH-laboratoriets verksamhet finns beskriven på  
<http://www.swseed.se/>

### **Litteraturförteckning**

- Caredda S and Clément C (1999) Androgenesis and albinism in Poaceae: influence of genotype and carbohydrates. In *Anther and Pollen From Biology to Biotechnology*. Ed. Clément C, Pacini E and Audran J-C. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 211-228
- Holme IB, Olesen A, Hansen NJP and Andersen SB (1999) Anther culture and isolated microspore culture response of wheat lines from northwestern and eastern Europe. *Plant Breed* 118:111-117
- Jensen A (2002) A method of generating fertile plants from isolated microspores. Patent applicaton no. WO 02/01940 A2
- Kasha K and Simion E (2001) Embryogenesis and plant regeneration from microspores. Patent applicaton no. WO 01/41557 A2
- Kasha KJ, Simion E, Oro R and Shim YS (2003) Barley isolated microspore culture protocol. In *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Ed. Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP and Szarejko I. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 43-47
- Kiviharju E, Moisander S and Laurila J (2005) Improved green plant regeneration rates from oat anther culture and the agronomic performance of some DH lines. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 81:1-9
- Konzak C, Polle E, Liu W and Zheng Y (2001) Methods for generating doubled haploid plants. Patent applicaton no. WO 01/14518 A2
- Laurie DA and Bennett MD (1986) Wheat x maize hybridization. *Can. J. Genet. Cytol.* 28:313-316
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497
- Steward FC (1983) Reflections on aseptic culture. In *Handbook of Plant Cell Culture Vol. 1 Techniques for Propagation and Breeding*. 1 Ed. Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV and Yamada Y. Macmillan Publishing Company, New York. pp. 1-10
- Touraev A, Indrianto A, Wratschko I, Vicente O and Heberle-Bors E (1996) Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sex Plant Reprod* 9:209-215

### **Personliga meddelanden från:**

Dr. Jochen Kumlehn, Universität Hamburg, Institut für Allgemeine Botanik, AMP II,  
Ohnhorststr. 18, D-22609 Hamburg, Tyskland.