

ALEKSANDRA PONITKA
AURELIA ŚLUSARKIEWICZ-JARZINA
Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

Otrzymywanie spontanicznych i indukowanych linii podwojonych haploidów pszenżyta ozimego z wykorzystaniem kultur pylnikowych*

Production of spontaneous and induced doubled-haploid lines of winter triticale obtained through anther culture

W kulturach pylnikowych 15 form mieszańcowych pszenżyta ozimego badano częstotliwość uzyskiwania androgenicznych roślin. Ze wszystkich genotypów otrzymano zielone rośliny, przy czym częstotliwość wahała się od 0,4 do 15,2/100 pylników w poszczególnych genotypach. Dla regeneracji roślin zastosowano pożywkę 190-2 z dwoma stężeniami kinetyny (0,5 lub 1,5 mg/l). Na pożywce zawierającej 0,5 mg/l kinetyny otrzymano więcej zielonych roślin, tj. od 2,5 do 46,7/100 androgenicznych struktur. Poziom ploidalności oznaczono cytometrycznie u 350 roślin i w zależności od genotypu stwierdzono od 17,6 do 80,0% spontanicznie podwojonych haploidów. Ogółem uzyskano 80,3% linii DH pszenżyta ozimego, wśród których było 38,0% spontanicznie podwojonych haploidów, natomiast w wyniku kolchicynowania 209 roślin haploidalnych otrzymano 70,8% linii DH.

Słowa kluczowe: haploid, kultury pylnikowe, linie DH, pszenżyto ozime

We investigated the rate of obtaining androgenic plants using anther culture of 15 winter triticale hybrids. Green plants were obtained from all genotypes, with the frequency ranging from 0.4 to 15.2/100 anthers. The medium 190-2, with two different concentrations of kinetin (0.5 and 1.5 mg/l), was used for plant regeneration. Higher number of green plants was observed in the case of the medium with 0.5 mg/l of kinetin (2.5–46.7/100 androgenic structures). Ploidy level was determined by flow cytometry in 350 plants and showed from 17.6 to 80.0% spontaneously doubled haploids, depending on the genotype. A total of 80.3% of DH lines was obtained, among which 38.0% were spontaneously doubled haploids, whereas 70.8% of DH lines was obtained from colchicine treatment of 209 haploid plants.

Key words: haploid, anther culture, DH lines, winter triticale

* Praca wykonana w ramach projektu MRiRW: nr 26-7/2009

WSTĘP

Opracowanie efektywnej metody indukcji androgenicznych struktur w kulturach pylnikowych, regeneracji zielonych roślin, oraz uzyskiwania linii podwojonych haploidów stwarza możliwość skróceniu cyklu hodowlanego pszenżyta ozimego.

Otrzymywanie androgenicznych roślin w kulturach *in vitro* zależy między innymi od sposobu traktowania ściętych kłosów przed wyłożeniem pylników na pożywkę oraz od komponentów pożywek indukujących i regeneracyjnych (Sharma i in., 1982; Hassawi i Liang, 1990; Hassawi i in., 1990; Karsai i in., 1994; Ślusarkiewicz-Jarzina i Ponitka, 1997; Ponitka i in., 1999; Immonen i Robinson, 2000; Tuvesson i in., 2000; González i Jouvet, 2000, 2005; Arzani i Darvey, 2002). Wśród zregenerowanych roślin obserwowano haploidy, spontanicznie podwojone haploidy oraz aneuploidy (Muranty i in., 2002; Oleszczuk i in., 2010; Warzecha i in., 2005). Celem podwojenia liczby chromosomów haploidalnych roślin stosowano np.: kolchicynę (Redha i in., 1998), oryzalinę, trifluoralin (Wan i in., 1991), kofeinę (Thomas i in., 1997). Najczęściej jednak używano kolchicynę, którą dodawano do pożywek indukujących proces androgenezy (Barnabás i in., 1991; Navarro-Alvarez i in., 1994; Redha i in., 1998; Zamani i in., 2000), do pożywek regeneracyjnych (Ouyang i in., 1994; Mentewab i Sarrafi, 1997), lub w roztworze dla traktowania haploidalnych roślin (Arzani i Darvey, 2001; Ślusarkiewicz-Jarzina i Ponitka, 2003; Oleszczuk i in., 2004).

Celem pracy było badanie wpływu stężenia kinetyny na regenerację androgenicznych roślin pszenżyta oraz określenie częstotliwości otrzymywania podwojonych haploidów w kulturach pylnikowych oraz po kolchicynowaniu haploidalnych roślin.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem doświadczalnym było 15 form mieszańcowych pszenżyta ozimego (Sz5/09, Sz9/09, CT08048, CT08095, CT08118, CT08203, CT08206, CT08249, CT08251, CT08266, BK1921, Tsoz400-R, Tsoz401-R, Tsoz402-R, Tsoz403-R) pochodzących z czterech Stacji Hodowli Roślin: Szelejewo, DANKO-Choryń, Strzelce, Smolice.

Z roślin rosnących w szklarni ścinano pędy z kłosami zawierającymi pylniki w stadium mikrospor i traktowano roztworem mikro i makroelementów wg pożywki N6 (Chu i in., 1975) z dodatkiem 2 mg/l 2,4-D, w temperaturze 4°C przez 7 dni, w ciemności. Pylniki izolowano w sterylnych warunkach i wykładano na pożywkę C17 (Wang i Cheng, 1983) z dodatkiem 90 g/l maltozy. Kultury pylnikowe inkubowano w temperaturze 28°C, w ciemności, natomiast androgeniczne struktury hodowano na pożywce regeneracyjnej 190-2 (Zhuang i Xu, 1983) zawierającej 0,5 mg/l kinetyny (KIN) + 0,5 mg/l kwasu L-naftalenooctowego (NAA) lub 1,5 mg/l KIN + 0,5 mg/l NAA, w temperaturze 22°C, przy oświetleniu 4000 Lx, przez 12 godzin na dobę. Do badań cytometrycznych wybrano losowo zielone rośliny o wysokości około 15 cm i określano poziom ploidalności, oceniając intensywność fluorescencji DNA w zawiesinie komórek liści z wykorzystaniem cytometru przepływowego (typ PARTEC). Wszystkie rośliny jarowizowano w chłodni przez 8 tygodni, a następnie przycinano korzenie haploidalnych roślin i zanurzano do

wysokości 1,5 cm powyżej węzła krzewienia, w roztworze 0,1% kolchicyny + 4% DMSO (dimetylosulfotlenek) + 25 mg/l GA₃ (kwas gibberelinowy), w temperaturze 25°C, przez 6 godzin. Przed wysadzeniem do ziemi rośliny płukano 12 godzin pod bieżącą wodą. Częstotliwość uzyskiwania zielonych roślin określano w stosunku do liczby wyłożonych pylników oraz do androgenicznych struktur.

WYNIKI

Z wyłożonych 23499 pylników na pożywce C17 z dodatkiem maltozy uzyskano 15553 androgenicznych struktur, średnio 66,2/100 pylników (w zależności od genotypu od 1,6 do 118,1). Na dwóch wariantach pożywki regeneracyjnej 190-2, różniących się stężeniem kinetyny, wyhodowano ogółem 1398 zielonych roślin (średnio 5,9/100 pylników). Rośliny otrzymano ze wszystkich genotypów, przy czym częstotliwość wahała się od 0,4 do 15,2/100 pylników. Najwięcej zielonych roślin (powyżej 6,5/100 pylników) stwierdzono w 6 badanych genotypach, przy czym powyżej 13,0/100 pylników w trzech genotypach: CT08251, CT08306, CT08249. Stwierdzono genotypy (np. Sz9/09 oraz Tsoz402-R), z których uzyskano niską regenerację zielonych roślin (odpowiednio 1,9 i 0,6/100 pylników) pomimo wysokiej indukcji androgenicznych struktur (odpowiednio 54,0 i 58,2/100 pylników) — tab. 1, rys. 1 i 2.

Tabela 1

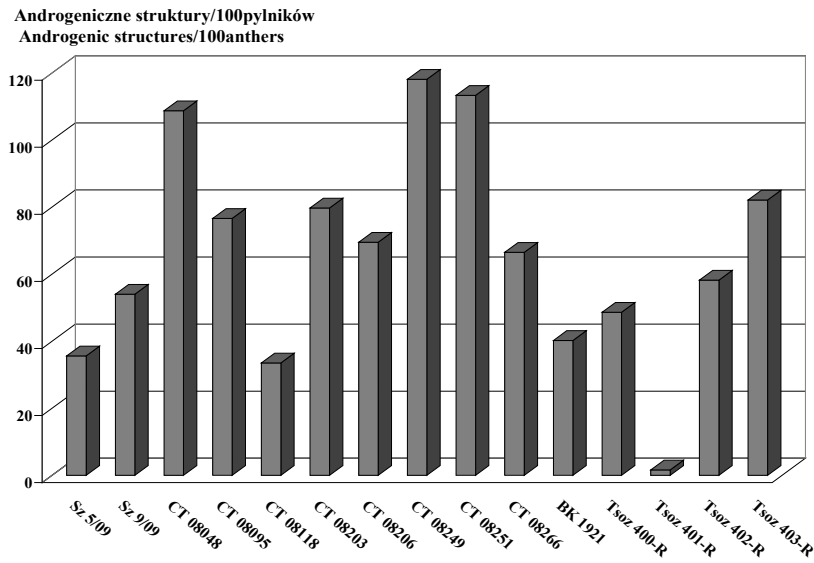
Efektywność uzyskiwania androgenicznych struktur i zielonych roślin z 15 mieszańców pszenżyta ozimego

Frequencies of embryo-like structures and green plants obtained from 15 winter triticale hybrids

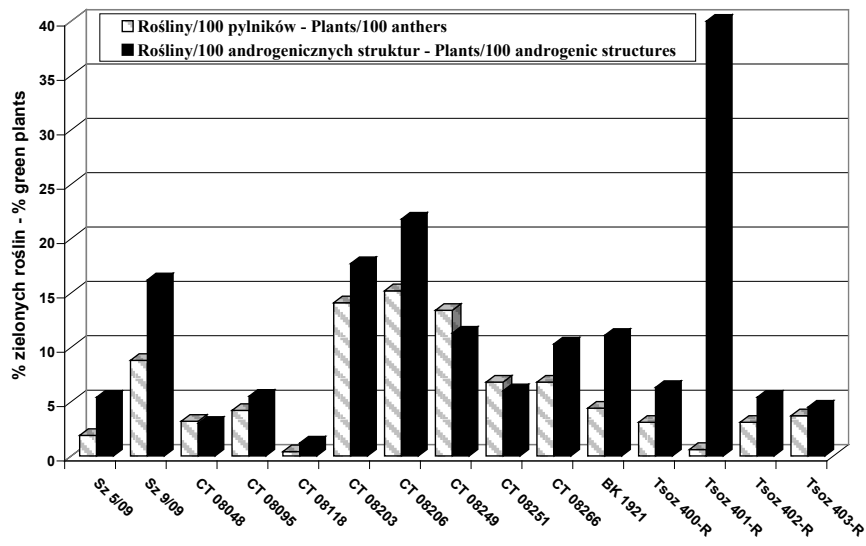
Genotyp Genotype	Liczba pylników No. of anthers	Androgeniczne struktury Androgenic structures		Zielone rośliny Green plants	
		liczba no.	/100 pylników /100 anthers	liczba no.	/100 pylników /100 anthers
Sz5/09	1666	593	35,6	53	3,7
Sz9/09	1656	894	54,0	32	1,9
CT08048	1606	1746	108,7	145	8,8
CT08095	1637	1254	76,6	52	3,2
CT08118	1548	519	33,5	69	4,2
CT08203	1497	1193	79,7	6	0,4
CT08206	1417	985	69,5	211	14,1
CT08249	1716	2027	118,1	215	15,2
CT08251	1721	1950	113,3	230	13,4
CT08266	1423	946	66,5	117	6,8
BK1921	1419	570	40,2	97	6,8
Tsoz400-R	1760	855	48,6	63	4,4
Tsoz401-R	1591	25	1,6	54	3,1
Tsoz402-R	1412	822	58,2	10	0,6
Tsoz403-R	1430	1174	82,1	44	3,1
Ogółem Total	23499	15553	66,2	1398	5,9

Na pożywce 190-2 z dodatkiem 0,5 mg/l KIN notowano wyższą częstotliwość regeneracji, tj. 11,1 roślin/100 androgenicznych struktur (w zależności od genotypu 2,5 do 46,7), natomiast stosując stężenie 1,5 mg/l KIN otrzymano 6,8 roślin/100 androgenicznych

struktur (0,3 do 33,3) — tab. 2, rys 3. Otrzymano również 1107 albinotycznych roślin (4,7/100 pylników), których nie uwzględniono w tabelach i dalszych analizach.



Rys. 1. Efektywność uzyskiwania androgenicznych struktur z 15 mieszańców pszenżyta ozimego
Fig. 1. Frequencies of embryo-like structures and obtained from 15 winter triticale hybrids



Rys. 2. Efektywność uzyskiwania androgenicznych roślin z 15 mieszańców pszenżyta ozimego
Fig. 2. Frequencies of androgenic plants obtained from 15 winter triticale hybrids

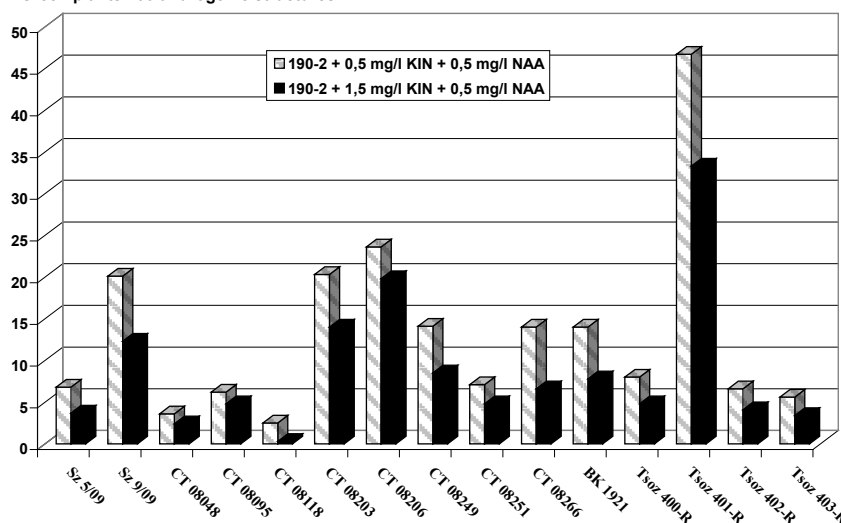
Tabela 2

Efektywność uzyskiwania androgenicznych roślin z 15 mieszańców pszenżyta ozimego na dwóch wariantach pożywki regeneracyjnej 190-2

Frequencies of androgenic plants obtained from 15 winter triticale hybrids on two variants of regeneration medium 190-2

Genotyp Genotype	Pożywka 190-2 zawierająca 0,5 mg/l KIN + 0,5 mg/l NAA Medium 190-2 containing 0,5 mg/l KIN + 0,5 mg/l NAA			Pożywka 190-2 zawierająca 1,5 mg/l KIN + 0,5 mg/l IAA Medium 190-2 containing 1,5 mg/l KIN + 0,5 mg/l IAA		
	liczba androgenicznych struktur no. of androgenic structures	zielone rośliny green plants		liczba androgenicznych struktur no. of androgenic structures	zielone rośliny green plants	
		liczba — no.	%		liczba — no.	%
Sz5/09	323	22	6,8	270	10	3,7
Sz9/09	447	90	20,1	447	55	12,3
CT08048	896	32	3,6	850	20	2,4
CT08095	627	39	6,2	627	30	4,8
CT08118	200	5	2,5	319	1	0,3
CT08203	693	141	20,3	500	70	14,0
CT08206	530	125	23,6	455	90	19,8
CT08249	1027	145	14,1	1000	85	8,5
CT08251	1000	71	7,1	950	46	4,8
CT08266	473	66	14,0	473	31	6,6
BK1921	300	42	14,0	270	21	7,8
Tsoz400-R	400	32	8,0	455	22	4,8
Tsoz401-R	15	7	46,7	10	3	33,3
Tsoz402-R	411	27	6,6	411	17	4,1
Tsoz403-R	587	33	5,6	587	20	3,4
Ogółem Total	7929	877	11,1	7624	521	6,8

Zielone rośliny/100 androgenicznych struktur
Green plants/100 androgenic structures



Rys. 3. Efektywność uzyskiwania androgenicznych roślin z 15 mieszańców pszenżyta ozimego na dwóch wariantach pożywki regeneracyjnej 190-2

Fig. 3. Frequencies of androgenic plants obtained from 15 winter triticale hybrids on two variants of regeneration medium 190-2

Tabela 3

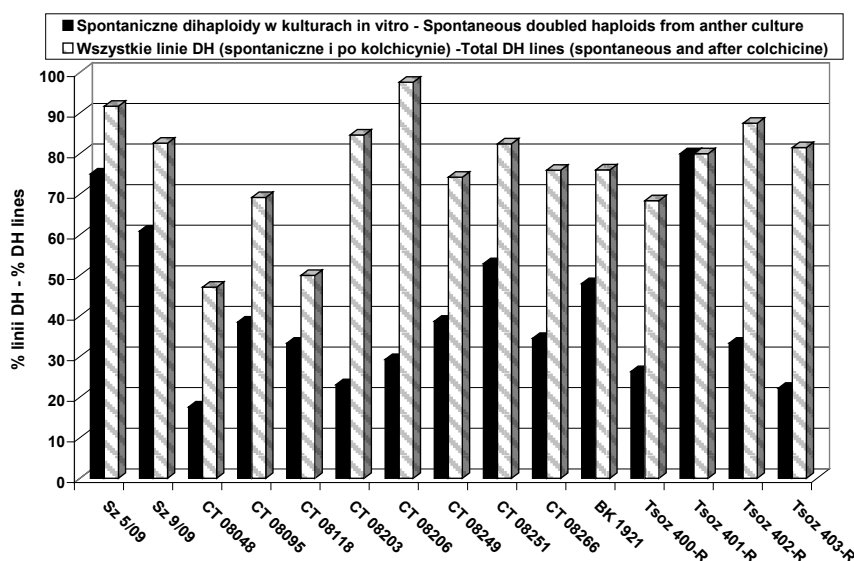
Efektywność uzyskiwania haploidów i podwojonych haploidów pszenżyta (otrzymanych spontanicznie i po kolchicynie) w kulturach pylnikowych 15 mieszańców

Frequencies of triticale haploids and doubled haploids (spontaneous and after colchicine treatment) obtained from anther culture of 15 hybrids

Genotyp Genotype	Liczba zielonych roślin No. of green plants	Haploidy Haploids		Podwojone haploidy — Doubled haploids						Aneuploidy Aneuploids	
				spontanicznie spontaneous		po kolchicynie after colchicine		ogółem total			
		l. -no.	%	l. -no.	% ⁺	l. -no.	% [*]	l. -no.	% [#]	l. -no.	%
Sz5/09	12	3	25,0	9	75,0	2	66,7	11	91,7	—	—
Sz9/09	23	9	39,1	14	60,9	6	66,7	19	82,6	—	—
CT08048	17	13	76,5	3	17,6	5	38,5	8	47,1	1	5,9
CT08095	13	8	61,5	5	38,5	4	50,0	9	69,2	—	—
CT08118	6	4	66,7	2	33,3	1	25,0	3	50,0	—	—
CT08203	39	28	71,8	9	23,1	24	85,7	33	84,6	2	5,1
CT08206	41	29	70,7	12	29,3	28	96,5	40	97,6	—	—
CT08249	31	19	61,3	12	38,7	11	57,9	23	74,2	—	—
CT08251	34	16	47,1	18	52,9	11	68,8	28	82,4	—	—
CT08266	29	17	58,6	10	34,5	12	70,6	22	75,9	2	6,9
BK1921	25	11	44,0	12	48,0	7	63,6	19	76,0	2	8,0
Tsoz400-R	19	13	68,4	5	26,3	8	72,7	13	68,4	1	5,3
Tsoz401-R	10	2	20,0	8	80,0	0	0	8	80,0	—	—
Tsoz402-R	24	16	66,7	8	33,3	13	81,3	21	87,5	—	—
Tsoz403-R	27	21	77,8	6	22,2	16	76,2	22	81,5	—	—
Ogółem Total	350	209	59,7	133	38,0	148	70,8	281	80,3	8	2,3

⁺ spontanicznie podwojone haploidy / zielone rośliny; —⁺ doubled haploid plants / green plants

^{*} podwojone haploidy po kolchicynowaniu / rośliny haploidalne —^{*} doubled haploids after colchicine treatment/haploid



Rys. 4. Efektywność uzyskiwania podwojonych haploidów (otrzymanych spontanicznie i po kolchicynie) z 15 mieszańców pszenżyta

Fig. 4. Frequencies of triticale doubled haploids (spontaneous and after colchicine treatment) obtained from 15 hybrids

W wyniku analiz cytometrycznych poziomu ploidalności 350 zielonych roślin, pochodzących z 15 form mieszańcowych, stwierdzono 133 spontanicznie podwojone haploidy, tj. 38,0% (17,6–80,0% w zależności od genotypu), 209 haploidów, tj. 59,7% (20,0–77,8%) oraz 8 aneuploidów (średnio 2,3%). W wyniku kolchicynowania haploidów uzyskano 148 podwojonych haploidów (średnio 70,8%, w zależności od genotypu 25,0–96,5%). Zaobserwowano wysoką częstotliwość otrzymywania linii DH w wyniku spontanicznych podwojeń w trzech genotypach: Sz9/09 (60,9%), Sz5/09 (75,0%), Tsoz401-R (80,0%) oraz po kolchicynowaniu haploidów w czterech genotypach: CT08203 (85,7%), CT08206 (96,5%), Tsoz402-R (81,3%), Tsoz403-R (76,2%). Wszystkie rośliny hodowano do dojrzałości i ogółem uzyskano 281 linii DH, co stanowi 80,3% badanych regeneratów — tab. 3, rys. 4.

DYSKUSJA

W dotychczasowych badaniach nad uzyskiwaniem haploidów pszenżyta w kulturach pylnikowych stosowano różne pożywki regeneracyjne z modyfikacjami substancji wzrostowych. Androgeniczne struktury wykładano na pożywkę MS (Murashige i Skoog, 1963) zawierającą ½ stężenia soli mineralnych z MS, żelazo i witaminy z MS oraz substancje wzrostowe 0,5 mg/l IAA i 1,0 mg/l KIN (Immonen i Robinson, 2000) lub na pożywkę MS z dodatkiem 1,0 mg/l IAA i 1,0 mg/l BAP (Arzani i Darvey, 2002). González i Jouve (2000) testowali różne kombinacje regulatorów wzrostu (IAA, NAA, IBA, BAP, KIN, DICAMBA) w pożywce zawierającej związki mineralne wg Millera (1963) i obserwowali efektywną regenerację roślin na pożywce bez hormonów. González i in. (1997) dla indukcji organogenezy z powodzeniem zastosowali pożywkę N6 z dodatkiem 0,4 mg/l NAA oraz 1,0 mg/l IAA, natomiast Karsai i Bedö (1997) badali wpływ trzech pożywek podstawowych (190-2, MN6 oraz MS) na regenerację roślin i stwierdzili, że najefektywniejszą była pożywka 190-2, lecz dla niektórych genotypów uzyskano również dobrą regenerację na pożywce MN6.

Dotychczas wielokrotnie używano zmodyfikowaną pożywkę 190-2 i notowano zróżnicowaną efektywność regeneracji zielonych roślin (Pauk i in., 1991; Karsai i in., 1994; Immonen, 1996; Tuveson i in., 2000). W prezentowanej pracy testowano wpływ dwóch stężeń kinetyny w pożywce 190-2 na regenerację androgenicznych roślin i stwierdzono wyższą częstotliwość stosując 0,5 mg/l KIN, w porównaniu z 1,5 mg/l KIN.

W wyniku analiz cytometrycznych roślin androgenicznych, z 15 badanych form stwierdzono średnio 38,0% roślin ze spontanicznie podwojoną liczbą chromosomów, pomimo że wcześniej autorki (Ślusarkiewicz-Jarzina i Ponitka, 2003) uzyskały 57,5% spontanicznych podwojeń w kulturach pylnikowych 7 form pszenżyta. Arzani i Darvey (2001) obserwowali średnio tylko 9% spontanicznych podwojeń w 14 badanych formach, natomiast Oleszczuk i in. (2004), w kulturach izolowanych mikrospor pszenżyta odmiany Bogo, stwierdzili 30,8% (w różnych doświadczeniach od 10,0 do 70,0%) regeneratów ze spontanicznie podwojoną liczbą chromosomów.

Częstotliwość uzyskiwania podwojonych haploidów (spontanicznych oraz po kolchicynowaniu haploidów) w naszych eksperymentach wynosiła średnio 80,3% (47,1 do 97,6%

w zależności od genotypu). Podobnie wcześniej Arzani i Darvey (2001) wykazali 82,3% (6,0 do 98,0%) podwojonych haploidów oraz Ślusarkiewicz-Jarzina i Ponitka (2003) otrzymały 82,8% (66,7 do 90,7%). Oleszczuk i in. (2004), w kulturach izolowanych mikrospor pszenżyta odmiany Bogo, uzyskali ogółem 92,0% linii DH w stosunku do wszystkich regenerantów.

Przedstawione przez nas wyniki wskazują, że można zwiększyć częstotliwość uzyskiwania androgenicznych roślin pszenżyta poprzez dobór odpowiednich stężeń substancji wzrostowych w pożywce regeneracyjnej. Wydaje się, że podwyższenie częstotliwości spontanicznych podwojeń liczby chromosomów w kulturach pylnikowych oraz opracowanie optymalnej metodyki kolchicynowania haploidów pozwoli uzyskać zadowalającą ilość linii DH pszenżyta.

WNIOSKI

1. Odpowiedni dobór stężenia kinetyny w pożywce regeneracyjnej pozwala zwiększyć częstotliwość regeneracji androgenicznych roślin pszenżyta.
2. Opracowanie optymalnych warunków dla indukowania spontanicznie podwojonych haploidów w kulturach pylnikowych oraz metodyki podwajania liczby chromosomów roślin haploidalnych stwarza możliwość podwyższenia wydajności uzyskiwania linii DH pszenżyta.

LITERATURA

- Arzani A., Darvey N. L. 2001. The effect of colchicine on triticales anther-derived plants: microspore pretreatment and haploid plant treatment using a hydroponic recovery system. *Euphytica* 122: 235 — 241.
- Arzani A., Darvey N. L. 2002. Androgenetic response of heterozygous triticales populations using a greenhouse hydroponic system. *Euphytica* 127: 53 — 60.
- Barnabás B., Pfähler P. L., Kovács G. 1991. Direct effect of colchicine on the microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 81: 675 — 678.
- Chu C. C., Wang C. C., Sun C. S., Hsu C., Yin K. C., Chu C. Y., Bi F. Y. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica* 18: 659 — 668.
- González J. M., Jouve N. 2000. Improvement of anther culture media for haploid production in triticales. *Cereal Research Comm.* 28: 65 — 71.
- González J. M., Jouve N. 2005. Microspore development during in vitro androgenesis in triticales. *Biologia Plantarum* 49: 23 — 28.
- Hassawi D. S., Liang G. H. 1990. Effect of cultivar, incubation temperature, and stage of microspore development on anther culture in wheat i triticales. *Plant Breed.* 105: 332 — 336.
- Hassawi D. S., Jiahua Q. I., Liang G. H. 1990. Effect of growth regulator and genotype production of wheat and triticales polyhaploids from anther culture. *Plant Breed.* 104: 40 — 45.
- Immonen A. S. T. 1996. Influence of media and growth regulators on somatic embryogenesis and plant regeneration for production of primary triticales. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 44: 45 — 52.
- Immonen S., Robinson J. 2000. Stress treatment and ficoll for improving green plant regeneration in triticales anther culture. *Plant Sci.* 150: 77 — 84
- Karsai I., Bedö Z., Hayes P.M. 1994. Effect of induction medium pH and maltose concentration on in vitro androgenesis of hexaploid winter triticales and wheat. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39: 49 — 53.
- Karsai I., Bedö Z. 1997. Effect of carbohydrate content on the embryoid and plant production in triticales anther culture. *Cereal Res. Comm.* 25: 109 — 116.

- Miller C. O. 1963. Kinetin and kinetin-like compounds. In: *Moderne Methoden der Pflanzen-Analyse*. Eds. H. F. Lenskens and M. C. Tracey. Springer-Verlag, Berlin. 6: 193 — 202.
- Murashige T., Skoog A. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473 — 497.
- Muranty H., Sourdille P., Bernard S., Bernard M. 2002. Genetic characterization of spontaneous diploid androgenetic wheat and triticales plants. *Plant Breed.* 121: 470 — 474.
- Navarro-Alvarez W., Baenzi Ger P. S., Eskridge K.M., Hugo M., Gustafson D. V. 1994. Addition on colchicine to wheat anther culture media to increase doubled haploid plant production. *Plant Breeding* 112: 192 — 198.
- Oleszczuk S., Sowa S., Zimny J. 2004. Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticales (*X Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo. *Plant Cell Rep.* 22: 885 — 893.
- Oleszczuk S., Rabiza-Swider J., Zimny J., Łukaszewski A. J. 2011. Aneuploidy among androgenic progeny of hexaploid triticales (*X Triticosecale* Wittmack). *Plant Cell Rep.* vol. 30/4: 575 — 586.
- Ouynang J. W., Liang H., Jia S. E., Zhang C., Zhao T.H., He L.Z., Jia X. 1994. Studies on the chromosome doubling of wheat pollen plants. *Plant Sci.* 98: 209 — 214.
- Pauk J., Manninen O., Mattila I., Salo Y., Pulli S. 1991. Androgenesis in hexaploid spring wheat F₂ populations and their parents using a multiple-step regeneration system. *Plant Breed.* 107: 18 — 27.
- Ponitka A., Ślusarkiewicz-Jarzina A., Wędzony M., Marcińska I., Woźna J. 1999. The influence of various in vitro culture conditions on androgenetic embryo induction and plant regeneration from hexaploid triticales (*X Triticosecale* Wittm.). *J. Appl. Genet.* 40: 165 — 174.
- Redha A., Attia T., Büter B., Saisingtong S., Stamp P., Schmid J. E. 1998. Improved production of doubled haploids by colchicine application to wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Plant Cell Reports* 17: 974 — 979.
- Sharma C. C., Wang W. C., Sapra V. T. 1982. Effect of genotype, media and temperature pretreatment on callus initiation in triticales, wheat and rye anther cultures. *Cereal Res. Comm.* 10: 143 — 150.
- Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A. 1997. Effect of genotype and media composition on embryoid induction and plant regeneration from anther culture in triticales. *J. Appl. Genet.* 38: 253 — 258.
- Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A. 2003. Efficient production of spontaneous and induced doubled haploid triticales plants derived from anther culture. *Cereal Res. Comm.* 31: 289 — 296.
- Thomas J., Chen Q., Howes N. (1997). Chromosome doubling of haploids of common wheat with caffeine. *Genome* 40: 552 — 558.
- Turesson S., Liungberg N., Johansson N., Karlsson K.E., Suis L.W., Josset J. P. 2000. Large-scale production of Wheat and triticales double haploids through the use of a single-anther culture method. *Plant Breed.* 119: 455 — 459.
- Wan Y., Duncan D. R., Rayburn A. L., Petolino J. F., Widholm J. M. 1991. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. *Theor. Appl. Genet* 81: 205 — 211.
- Warzecha R., Sowa S., Salak-Warzecha K., Oleszczuk S., Śliwińska E., Zimny J. 2005. Doubled haploids in production of male sterility maintaining triticales (*Triticosecale* Wittmack) lines. *Acta Physiol. Plant.* 27: 245 — 250.
- Wang P., Chen Y. (1983). Preliminary study on production of high of pollen H₂ generation in winter wheat grown in the field. *Acta Agron. Sin.* 9: 283 — 284.
- Zamani G., Kovács E., Gouli-Vavdinoudi D., Roupakias G., Barnabas B. 2000. Regeneration of fertile doubled haploid plants colchicine-supplemented media in wheat anther culture. *Plant Breeding* 119: 461 — 465.
- Zhuang J.J., Xu J. 1983. Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus. In: *Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement*, Science Press. Beijing: 431.