

REPONSE A LA CULTURE D'ANTHERES DE QUELQUES VARIETES TUNISIENNES DE BLE TENDRE (*TRITICUM AESTIVUM L.*)

Ali Ltifi*, Anissa Sahli, Wejden Brahmi et Insaf Nefzi

Université de Carthage

Laboratoire de Biotechnologie Appliquée à l'Agriculture

Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie, Ariana 2049, Tunisia

*Correspondant Auteur: ltifi_ali@yahoo.fr

(Received 6 December 2016 – Accepted 30 January 2018)

RESUME

Ltifi, Ali, Anissa Sahli, Wejden Brahmi et Insaf Nefzi. 2018. Réponse à la culture d'anthères de quelques variétés tunisiennes de blé tendre (*Triticum aestivum L.*). Journal Scientifique Libanais, 19(1): 1-9.

Cet article traite la production d'haploïdes de blé tendre par culture d'anthères. L'objectif de cette étude est de comparer la réponse à l'androgénèse in vitro de dix variétés tunisiennes de blé tendre sur deux milieux d'induction différents. Les anthères ont été mises en culture quand les microspores se trouvaient au stade uninucléé médian. Les épis contenant les anthères ont été traités au froid à 4°C pendant deux semaines. Les milieux de culture 190-2 et BAC3 ont été utilisés pour l'induction de l'androgénèse in vitro. La régénération de plantes à partir des embryons et des cals a été faite sur le milieu 190-2 dépourvu de substances de croissances. La réponse à la culture d'anthères a été variable d'une variété à l'autre. L'induction de l'androgénèse a été meilleure sur le milieu 190-2 que sur le milieu BAC3. De plus, la régénération des embryons et des cals développés sur le milieu 190-2 a été meilleure que celle des embryons induits sur le milieu BAC3. Des plantes vertes et albina ont été régénérées à partir des embryons induits sur le milieu 190-2, alors qu'aucune plante verte n'a été régénérée à partir des embryons développés sur le milieu d'induction Bac3. Quatre variétés sur dix étudiées ont donné des plantules chlorophylliennes en nombre suffisant. Ces résultats indiquent que le milieu 190-2 est plus favorable que le milieu BAC3 à l'androgénèse in vitro des variétés tunisiennes de blé tendre.

Mots-clés: Blé tendre, androgénèse *in vitro*, haploïde, embryon, cal.

ABSTRACT

Ltifi, Ali, Anissa Sahli, Wejden Brahmi et Insaf Nefzi. 2018. Response of some Tunisian bread wheat varieties (*Triticum aestivum L.*) to anther culture system. Lebanese Science Journal, 19(1): 1-9.

This study focused on wheat haploid production by anther culture. The main purpose was to compare the in vitro androgenesis response of ten wheat Tunisian bread wheat varieties on two different induction media. The anthers were introduced in vitro when microspores were in the middle uninucleate stage and obtained from treated spikes at 4° C for two weeks. The culture media 190-2 and BAC3 were used. Plants regenerated from induced

<http://dx.doi.org/10.22453/LSJ-019.1.001-009>

National Council for Scientific Research – Lebanon 2018©

lsj.cnrs.edu.lb/vol-19-no-1-2018/

embryos and calli were grown on the 190-2 medium without any growth regulators. The response to anther culture was different between the studied varieties. Androgenesis induction was better on the 190-2 medium than on BAC3 medium. In addition, the development of calli and the regeneration of embryos were better on 190-2 medium than on BAC3. Both green plantlets and albina were regenerated from induced embryos on the 190-2 medium, while no green plant regenerated from the embryos growing on BAC3 medium. Four varieties over ten studied gave good number of green plants. These results indicated that 190-2 medium was most favorable for the in vitro androgenesis of the Tunisian bread wheat varieties.

Keywords: Bread wheat, in vitro androgenesis, haploid, embryo, callus.

INTRODUCTION

L'amélioration du blé tendre (*Triticum aestivum* L.) par les méthodes de sélection classiques est onéreuse et demande plusieurs cycles d'autofécondation et de sélection pour atteindre l'homozygotie. La réduction des délais de sélection de nouvelles variétés est possible par l'utilisation des techniques de biotechnologies. En effet, les techniques d'haplodiploïdisation permettent de fixer rapidement le matériel végétal et d'obtenir ainsi des lignées pures en une seule génération (El-Hennawy *et al.*, 2011 ; Belchev *et al.*, 2004). Outre le gain appréciable de temps, la sélection dans les haploïdes doublés est plus simple et plus efficace. Ainsi, les mutations et les caractéristiques contrôlées par des gènes récessifs ou dominants s'extériorisent et peuvent être fixées rapidement (Szarejko, 2003). L'utilisation des haplométhodes permet également de subvenir rapidement aux besoins des producteurs et des consommateurs par la mise sur le marché de variétés améliorées ayant de nouvelles caractéristiques désirables.

Les haploïdes doublés de blé tendre peuvent être obtenus par culture d'anthères ou de microspores (Barnabas, 2003 ; Kunz *et al.*, 2000) et par croisement intergénérique blé x maïs (Inagaki et Mujeeb-Kazi, 1995 ; Mugeeb-Kazi *et al.*, 2006). La production d'haploïdes doublés par culture d'anthères est influencée par le génotype, les conditions de culture des plantes donatrices d'anthères, le stade de développement des microspores, le prétraitement des épis et la composition des milieux de culture (Kasha et Maluszynski, 2003). L'utilisation de la culture d'anthères dans la sélection du blé tendre a prouvé son efficacité. La première variété provenant de la culture d'anthères 'Jinghua No. 1' a été développée en Chine en 1986 (Hu *et al.*, 1986). Ensuite, plusieurs variétés ont été produites par cette technique en Europe et en d'autres parties du monde (Barnabas *et al.*, 2000 ; De-Buysse, 1987 ; Pauk *et al.*, 1995). Malgré les succès qui ont pu être réalisés par la technique de culture d'anthères, certaines difficultés persistent encore. Il s'agit notamment de la dépendance génotypique, de la régénération de plantules et de l'albinisme. Ces problèmes qui sont actuellement atténués par des progrès techniques devraient être résolus pour rendre la production d'haploïdes doublés par culture d'anthères une technique de routine.

Les améliorations les plus significatives de la technique de culture d'anthères ont été réalisées au niveau de la composition des milieux de culture. La substitution du saccharose par le maltose a constitué un progrès remarquable dans l'amélioration de l'induction de l'androgénèse du blé tendre (Tuvevsson *et al.*, 2000). Les milieux d'induction de l'androgénèse solidifiés par l'agar sont souvent préférés aux milieux semi-liquides utilisant le ficoll qui un alcaloïde coûteux. Toutefois, la réponse à l'androgénèse est meilleure sur les milieux semi-liquides (Tuvevsson *et al.*, 2003 ; Ltifi et Djebbi, 2012).

Le phénomène d'albinisme constaté chez les plantes issues d'embryogenèse pollinique reste un déficit majeur de la production d'haploïdes doublés par culture d'anthères. L'albinisme qui est dû à l'altération du génome chloroplastique est contrôlé par des gènes nucléaires (Tuvevsson *et al.*, 1989). Plusieurs facteurs contribuent au phénomène complexe d'albinisme, notamment l'hérédité maternelle du génome chloroplastique (Vaughn *et al.*, 1980) et la délétion et la reorganisation des génomes plastidiques (Day et Ellis, 1985).

La dépendance génotypique est un facteur limitant de la production d'haploïdes doublés par culture d'anthères. La réponse à l'androgénèse peut varier considérablement suivant l'origine géographique du matériel

vévéral. En effet, des études ont montré que la réponse à l'androgénèse de génotypes originaires de l'Europe du nord ouest est faible (Holme *et al.*, 1999). L'utilisation de génotypes qui répondent bien à la culture d'anthères dans les programmes de croisement est un moyen pour améliorer le rendement de cette technique (De-Buyser *et al.*, 1987).

L'objectif de ce travail est d'étudier la réponse à l'androgénèse *in vitro* de variétés de blé tendre originaires de la Tunisie dans deux milieux d'induction différents.

MATERIELS ET METHODES

Matériel végétal

Cette étude a été réalisée sur 10 variétés de blé tendre cultivées en Tunisie : Haidra, Dougga, Carthage, Soltane, Ariana, Vaga, Florence x Aurore et Utique. Le pedigree des variétés étudiées est donné dans le tableau 1. Le semis a été effectué au champ de l'INRAT à Tunis pendant la 2^{ème} quinzaine du mois de novembre. Le désherbage a été fait manuellement. La fertilisation a consisté en l'apport de 67 unités de P₂O₅ sous forme de triple superphosphate avant le semis et de 80 unités d'azote sous forme de nitrate d'ammonium en deux apports égaux, l'un à la levée et l'autre au tallage.

Tableau 1. Variétés de blé tendre utilisées pour la culture d'anthères.

Variété	Pedigree
Haidra	Bow/Dga
Dougga	Klein Peliso/Rafaelle//2*8156-R
Carthage	Napo/Tobari//8156-R
Soltane	Sonora 64/Klein Pendidor
Ariana	Kenya 338/Etoile de Choisy
Vaga	4777*2//FKN/GB54/3/VEE#5/4/BUC"S"/PVN"S"
Florence Aurore	Florence x Aurore
Utique	ND/VG9144//KAL/BB/3/YACO/4/VEE#5
Salambo	Pato//Corre Caminos/Inia
Tahent	Attila/3/Hui/Carc//Chen/Chto/4/Attila

Prélèvement des épis

Les épis contenant les anthères ont été prélevés quand les microspores étaient au stade uninucléé médian. Ce stade a été repéré pour chaque variété par observation des microspores au microscope, après étalement des anthères dans une goutte de carmin acétique qui permet de colorer les noyaux des microspores. Les épis ont été traités au froid à 5°C pendant deux semaines afin de synchroniser le développement des microspores (Hu Kasha, 1999 ; Xinias *et al.*, 2001).

Mise en culture des anthers

Après le traitement au froid, les épis ont été aseptisés par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium à 12% pendant 10 mn. Ensuite, ils ont été rincés 3 fois à l'eau distillée stérile. Les anthères ont été prélevées à l'aide de pinces stérilisées et transférées dans des boîtes de pétri de 9 cm de diamètre contenant les milieux d'induction 190-2 (Brisive *et al.*, 1997) et BAC3 (Cai *et al.*, 1992)(Tableau 2) à raison de 60 anthères par boîte. Les milieux d'induction ont été auparavant stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20mn. Les boîtes de pétri ont été ensuite placées dans un incubateur à l'obscurité à 28°C pendant 30 à 40 jours jusqu'à l'apparition des embryons et des cals d'origine pollinique. Après dénombrement, les embryons et les cals ont été transférés sur le milieu de régénération 190-2 dépourvu d'hormones. La régénération de plantules a eu lieu à 24°C, avec une photopériode de 16 heures de lumière.

Tableau 2. Composition des milieux d'induction BAC3 et 190-2.

Composition	BAC3 (mg/l)	190-2 (mg/l)
<u>Macroéléments :</u>		
KNO ₃	2600	1000
NH ₄ NO ₃	200	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	400	200
KH ₂ PO ₄	170	300
Na H ₂ PO ₄ ×H ₂ O	150	-
CaCl ₂ ×2H ₂ O	600	-
Ca(NO ₃) ₂ ×4H ₂ O	-	100
MgSO ₄ ×7H ₂ O	300	-
KCL	-	40
<u>Micro-éléments :</u>		
HBO ₃	5	3
MnSO ₄ ×H ₂ O	5	8
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	2	3
KI	0.8	0.5
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0.25	-
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0.025	-
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0.025	-
KHCO ₃	50	-
AgNO ₃	10	-
<u>Vitamines :</u>		
Myo-inositol	2000	100
Pyridoxine HCl	0.5	0.5
Thiamine HCl	1	1
Acide nicotinique	0.5	0.5
Acide ascorbique	1	-
<u>Acides aminés :</u>		
Hydrolysats de caséine	300	-
<u>Régulateurs de croissance :</u>		
NAA	2	-
BAP	1	-
2,4-D	-	1.5
Kinéline	-	0.5
<u>Acides organiques :</u>		
Acide citrique	10	-
Acide pyruvique	10	-
<u>Sucre :</u>		
Maltose	60000	90000
<u>Na₂FeEDTA</u>	40	40
Agar	8000	8000
pH	6.2	6.0

Analyse statistique des paramètres étudiés

Les pourcentages d'anthères embryogènes, d'embryons et de cals induits et de plantules régénérées ont été établis. Les pourcentages ont été calculés par rapport à 100 anthères mises en culture. Un dispositif expérimental en bloc aléatoire complet a été utilisé. Les données expérimentales ont été traitées statistiquement par une analyse de variance et les moyennes ont été comparées avec le test de la plus petite différence significative (PPDS) à 5% avec le programme d'analyse statistique MSTAT.

RESULTATS ET DISCUSSION**Induction des embryons et régénération des plantules**

L'analyse de la variance des pourcentages d'embryons induits et de plantes régénérées a montré que les effets du génotype et du milieu ont été hautement significatifs, tandis que l'effet d'interaction génotype x milieu n'a pas été significatif (Tableau 3).

Tableau 3. Analyse de la variance des pourcentages d'induction et de régénération de plantes androgéniques.

Source de variation	ddl	Carré moyen du pourcentage d'embryons induits	Carré moyen du pourcentage plantes régénérées
Génotypes	9	4300.4**	250.3**
Milieux	1	5350.1**	290.8**
Génotypes x Milieux	9	445.5 ns	6.9 ns
Erreur	52	334.7	20.9

Influence du génotype et du milieu de culture sur l'induction des embryons

Les premières divisions nucléaires des microspores peuvent être observées après trois jours de mise en culture des anthères sur les milieux d'induction 190-2 ou BAC3 (Figure 1 b). Les divisions nucléaires se poursuivent et aboutissent au bout de deux semaines à la formation d'un proembryon (Figure 1 c). Les embryons et les cals apparaissent dans les fentes de déhiscence des anthères à partir de la 4^{ème} semaine de mise en culture des anthères (Figure 1 d).

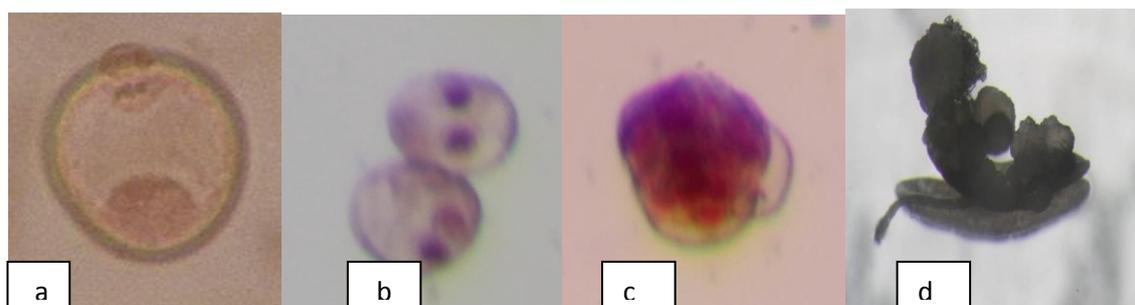


Figure 1. Induction des embryons et des cals d'origine pollinique. a) microspore de blé tendre au stade uninucléé médian, b) première division nucléaire après 3 j de mise en culture, c) proembryon formé après 2 semaines de mise en culture, d) embryons et cals formés dans une anthère après 4 semaines de mise en culture.

Le nombre d'anthères mises en culture sur les milieux d'induction 190-2 et BAC3 des dix variétés expérimentées est présenté dans le tableau 4. Au total 10358 anthères ont été mises en culture sur le milieu 190-2 et 5382 anthères sur le milieu BAC3. La mise en culture des anthères sur le milieu 190-2 a permis d'obtenir des

embryons et des cals d'origine pollinique chez la plupart des variétés expérimentées. Toutefois, l'induction de l'androgenèse sur le milieu BAC3 n'a été notable que chez les variétés 'Soltane' et 'Salambo'. Les résultats de l'analyse de la variance n'ont pas mis en évidence une interaction génotype x milieu de culture. Un résultat similaire a été obtenu par Lantos et Pauk (2016). Toutefois, l'androgenèse des céréales est souvent caractérisée par une interaction génotype x milieu d'induction (Fadel et Wenzel, 1990 ; Foroughi-Wehr, 1993 ; Jauhar, 2003). Les variétés 'Dougga', 'Ariana' et 'Florence Aurore' ont été récalcitrantes à la culture d'anthères sur les deux milieux d'induction. L'influence génotypique sur l'induction de l'androgenèse est un phénomène bien connu chez les céréales et en particulier le blé tendre (Zamani *et al.*, 2003 ; Liu *et al.*, 2004). Il a été constaté que l'origine géographique du matériel végétal joue un rôle dans l'induction de l'androgenèse *in vitro*. En effet, la réponse à la culture d'anthère est meilleure chez les blés d'hiver que chez les blés de printemps (Tuvesson *et al.*, 2000). L'influence génotypique a été atténuée par des améliorations successives de la technique de culture d'anthères, ce qui fait qu'elle est beaucoup moins prononcée que ce qu'elle était il y a une trentaine d'années.

Tableau 4. Effet du milieu de culture sur l'induction de l'androgenèse *in vitro* de 10 variétés de blé tendre.

Génotype	Milieu d'induction 190-2		Milieu d'induction BAC3	
	Nombre d'anthères mises en culture	Pourcentage d'anthères embryogènes	Nombre d'anthères mises en culture	Pourcentage d'anthères embryogènes
Haidra	1413	2.4	320	0.1
Dougga	895	0.1	226	0.2
Carthage	807	6.8	839	0.1
Soltane	586	4.5	144	2.0
Ariana	249	0.2	313	0.1
Vaga	2081	2.8	2133	0.2
Florence Aurore	891	0.1	178	0.2
Utique	579	1.2	859	0.1
Salambo	1528	1.4	690	1.3
Tahent	1329	2.0	350	0.1
Total	10358		6052	

Influence du génotype et du milieu de culture sur la régénération de plantules

Le transfert des embryons et des cals obtenus sur les milieux d'induction 190-2 et BAC3 sur le milieu de régénération 190-2 dépourvu de substances de croissances a abouti, après 2 à 3 semaines soit à la formation de plantules chlorophylliennes (Figure 2 a), soit à la régénération de plantules albina déficientes en chlorophylle (Figure 2 b). La formation de racines sans partie aérienne a été également observée (Figure 2 c).

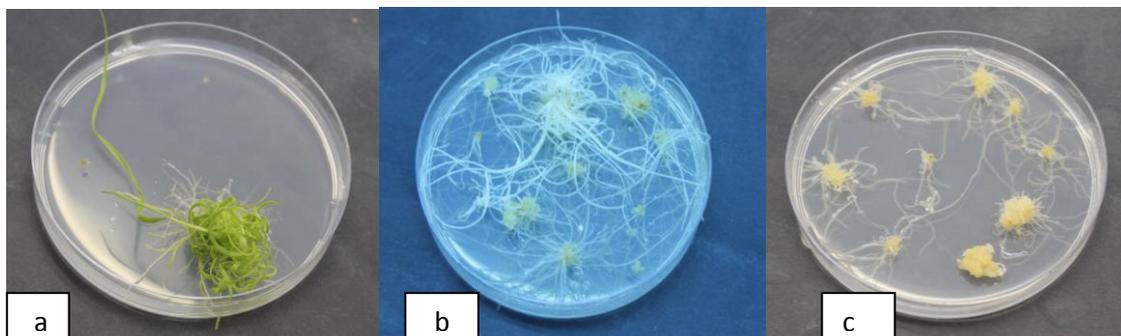


Figure 2. Régénération de plantes d'origine pollinique a) plante chlorophyllienne, b) plantules albina, c) formation de racines sans partie aérienne.

La régénération de plantules chlorophylliennes et albina à partir des embryons obtenus sur le milieu d'induction 190-2 a été meilleure que celle des embryons formés sur BAC3 (Tableau 3). Le génotype de blé tendre a été le facteur le plus important qui influence la régénération de plantules vertes. Ces résultats confirment d'autres études qui ont mis en évidence le contrôle génétique de la régénération de plantules d'origine pollinique (Ltifi et Djebbi, 2012 ; Lantos et Pauk, 216 ; *Lantos et al.*, 2013). Le pourcentage de plantules albina régénérées a été plus élevé que le pourcentage de plantules chlorophylliennes pour la quasi-totalité des génotypes expérimentés. Les meilleurs taux de régénération de plantules vertes ont été obtenus chez les variétés 'Soltane', 'Hidra', 'Vaga', 'Carthage' et 'Utique'. Le phénomène d'albinisme reste un déficit majeur de la production de plantules haploïdes doublées par culture d'anthers, bien qu'il ait été atténué par des améliorations de cette technique. En effet, la réduction de l'albinisme a été obtenue par le choix du pétraitement (Hu et Kasha, 1999; Xynias *et al.*, 2001) et notamment le froid à 4°C qui permet de synchroniser le stade d'évolution des microspores et d'augmenter le taux de plantules chlorophylliennes régénérées. Le taux d'albinisme a été également réduit par la synchronisation de la première division symétrique nucléaire et l'amélioration de la viabilité des microspores durant la période de mise en culture (Wojnarowicz *et al.*, 2002). L'albinisme et la dépendance génotypique restent des déficits majeurs de la technique de production d'haploïdes doublés par culture d'anthers.

Tableau 5. Régénération de plantes à partir d'embryons développés sur les milieux d'induction 190-2 et BAC3.

Génotype	Milieu 190-2		Milieu BAC3	
	Pourcentage de plantes chlorophylliennes	Pourcentage de plantes albina	Pourcentage de plantes chlorophylliennes	Pourcentage de plantes albina
Haidra	0,9	0,6	0,0	0,1
Dougga	0,1	0,1	0,0	0,2
Carthage	0,5	0,8	0,0	0,3
Soltane	1,1	1,5	0,0	0,6
Ariana	0,1	0,1	0,0	0,1
Vaga	0,8	1,2	0,0	0,1
Florence Aurore	0,2	0,1	0,0	0,2
Utique	0,5	0,9	0,0	0,1
Salambo	0,1	0,1	0,0	0,3
Tahent	0,1	1,2	0,0	0,1

La réponse des variétés tunisiennes de blé tendre à l'androgenèse *in vitro* sur les milieux d'induction 190-2 et BAC3 a été variable selon le génotype et le milieu d'induction. Le développement des embryons et la formation des cals ainsi que la production de plantules haploïdes ont été meilleurs sur le milieu 190-2 que sur BAC3. Les

résultats de cette étude ont permis d'identifier des génotypes qui répondent bien à la culture d'anthers et qui produisent des plantules vertes en quantité suffisante pour l'amélioration génétique du blé tendre en Tunisie et dans la région du nord de l'Afrique. La réponse à la culture d'anthers devrait être utilisée comme un nouveau critère de sélection des parents en croisement afin de produire des haploïdes doublés pour l'amélioration génétique du blé tendre.

REFERENCES

- Barnabas, B., Szakacs, I., Karsai, I., Bido Z. 2000. *In vitro* androgenesis of wheat from fundamentals to practical application. Pp. 517-525 *In: Wheat in a global environment*. Bido Z. et Lang L. (eds.) Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht.
- Barnabas, B. 2003. Protocol for producing doubled haploid plants from anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). Pp. 65-70 *In: Maluszynsky, M., Kasha, K. J., Forster, B. P., Szarejko, I. (Eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. A manual*. Kluwer, Dordrecht/Boston/London.
- Belchev, I., Tchorbadjieva, M., Pantchev, I. 2004. Effect of 5-azaclidine on callus induction and plant regeneration potential in anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Bulgarian J. Plant Physiology*, 30(1-2): 45-50.
- Brisive, E.A., Olesen, A., Andersen, S. B. 1997. Characterization of anther culture-derived cell suspensions exclusively regenerating green plantlets in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 93:321-329.
- Cai, Q., Szarejko, I., Polok, K., Maluszynski, M. 1992. The effect of sugars and growth regulators on embryoid formation and plant regeneration from barley anther culture. *Plant Breeding*, 109: 218-226.
- Day, A., Ellis, T. H. N. 1985. Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture. *Current Genetics*, 9: 671-678.
- De-Buysse, J., Henry, Y., Bonnet, P., Hertzog, R., Hespel, A. 1987. 'Florin': A doubled haploid wheat variety developed by the anther culture method. *Plant Breeding*, 98: 53-56.
- El-Hennawy, M. A., Abdalla, A. F., Shafey, S. A., Al-Ashkar, I. M. 2011. Production of doubled haploid wheat lines (*Triticum aestivum* L.) using anther culture technique. *Annals of Agricultural Science*, 56(2): 63-72.
- Fadel, F., Wenzel, G. 1990. Medium- Genotype- Interaction on Androgenetic Haploid Production in Wheat. *Plant Breeding*, 105: 278-282.
- Foroughi-Wehr, B. 1993. Protokoll für die effiziente Produktion von doppelhaploiden Gerste- und Weizenpflanzen. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd*, 45: 263-267.
- Holme, I. B., Olesen, A., Hansen, N. J. P., Andersen, S. B. 1999. Anther and isolated microspore culture response of wheat lines from northwestern and eastern Europe. *Plant Breeding*, 118: 111-117.
- Hu, D., Yuan, Z., Tang, Y., Liu, J. 1986. Jinghua No. 1 – A winter wheat variety derived from pollen sporophyte. *Scientia Sinica Series B*, 29:733-745.
- Hu, T., Kasha, K. J. 1999. A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. *Genome*, 42(3): 432-441.
- Inagaki, M. N., Mujeeb-kazi, A. 1995. Comparison of polyhaploid production frequencies in crosses of hexaploid wheat with maize, pearl millet and sorghum. *Breeding Science*, 45: 157-161.
- Jauhar, P. P. 2003. Haploid and doubled haploid production in durum wheat by anther culture. Pp. 167-172 *In: Maluszynsky M., Kasha, K. J., Forster, B. P., Szarejko, I. (Eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. A manual*. Kluwer, Dordrecht/Boston/London.
- Kasha, K. J., Maluszynski, M. 2003. Production of doubled haploids in crop plants. Pp. 1-4 *In: Maluszynsky, M., Kasha, K. J., Forster, B. P., Szarejko, I. (Eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. A manual*. Kluwer, Dordrecht/Boston/London, pp 1-4.
- Kunz, C., Islam, S. M. S., Berberat, J., Peter, S. O., Büter, B., Stamp, P., Schmid, J. E. 2000. Assessment and improvement of wheat microspore derived embryo induction and regeneration. *J. Plant Physiology*, 156: 190-196.

- Lantos, C., Pauk, J. 2016. Anther culture as an effective tool in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding. Russian Journal of Genetics, 52(8): 794-801.
- Lantos, C., Weyen, J., Orsini, J.M. 2013. Efficient application of *in vitro* anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programmes, Plant breeding, 132: 149-154.
- Liu, W., Zheng, Y., Polle, E., Konzak, C. F. 2002. Highly efficient doubled haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. Crop Science, 42: 686-692.
- Ltifi, A., Djebbi, A. 2012. Effet de la substitution du gelrite par le ficoll sur l'embryogenèse pollinique de variétés tunisiennes de blé tendre (*Triticum aestivum* L.). Al Awamia, 125-126: 82-95.
- Mujeeb-kazi, A., Gul, A., Ahmed, J., Mirza, J. I. 2006. A simplified and effective protocol for production of bread wheat haploids ($n=3x=21$, ABD) with some application areas in wheat improvement. Pakistan Journal of Botany, 38: 393-406.
- Pauk, J., Kertesz, Z., Beke, B., Lobna, L., Csoz, M., Matuz, J. 1995. New Winter Wheat variety: 'GK Delibab' developed via combining conventional breeding and *in vitro* androgenesis. Cereal Research Communications, 23(3): 251-256.
- Szarejko, I. 2003. Doubled haploid mutant production. Pp. 351-361 In: Maluszynsky M., Kasha K. J., Forster B.P., Szarejko I. (Eds.) Doubled Haploid Production in Crop Plants. A manual. Kluwer, Dordrecht/Boston/London.
- Turesson, S., Ljungberg, A., Johansson, N., Karlsson, K. E., Suijs, L. W., Josset, J. P. 2000. Large-scale production of wheat and triticale doubled haploids through the use of a single-anther culture method. Plant breeding, 119: 455-459.
- Turesson, S., von Post R., Ljungberg, A. 2003. Wheat anther culture. Pp. 71-76 In: Maluszynsky M., Kasha K. J., Forster B.P., Szarejko I. (Eds.) Doubled Haploid Production in Crop Plants. A manual. Kluwer, Dordrecht/Boston/London.
- Turesson, I. K. D., Pederson, S., Anderson, S. B. 1989. Nuclear genes affecting albinism in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. Theoretical and Applied Genetics, 78: 879-883.
- Vaughn, K. C., DeBonte, L. R., Wilson, K. G. 1980. Organelle alteration as a mechanism of maternal inheritance. Science, 208: 196-198.
- Wojnarowicz, G., Jacquard, C., Devaux, P., Sangwan, R.S., Clément, C. 2002. Influence of copper sulfate on anther culture in barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Science, 162: 843-847.
- Xynias, I. N., Zamani, I. A., Gouli-Vavdinoudi, E., Roupakias, D. G. 2001. Effect of cold treatment and incubation temperature on bread wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. Cereal Research Communications, 29(3-4): 331-338.
- Zamani, I., Gouli-Vavdinoudi, E., Kovacs, G., Xynias, G., Roupakias, D., Barnabas, B. 2003. Effect of parental genotypes and colchicine treatment on the androgenic response of F1 hybrids. Plant Breeding, 122: 314-317.