

Cultivo de tejidos y mejora genética en gramíneas forrajeras

HIPÓLITO MEDRANO Y ANDREU POL

Fisiología Vegetal
Facultad de Ciencias. Univ. de *les Illes Balears*
(Trabajo incluido en el proyecto de la CAICYT, n.º 1936/82)

RESUMEN

El cultivo de tejidos in vitro presenta dificultades técnicas en forrajeras, sobre todo en la obtención de haploides y protoplastos. No obstante, el cultivo de meristemos y callos permite ya una aplicación directa en generación, selección y conservación de nuevos cultivares.

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de cultivo de tejidos han experimentado un fuerte desarrollo en las pasadas décadas, ampliando su campo de acción a nuevas especies y ofreciendo nuevas posibilidades de interés, tanto para la investigación en aspectos fundamentales de fisiología y genética como para las aplicaciones más inmediatas. (VOSE & BLIXT 1984).

Desde los primeros éxitos obtenidos por MOREL 1964, en la propagación por meristemos en orquídeas, hasta los más recientes intentos de transformación celular, mediante ingeniería genética (FLAVELL & MATHIAS 1984) uno de los campos, en que estas técnicas presentan más posibilidades de aplicación es la mejora genética de las especies cultivadas. (VASIL & col. 1984).

En ciertas variedades de plantas hortícolas y árboles frutales, se ha conseguido incrementar notablemente el rendimiento mediante la obtención de plantones libres de virus por cultivo in vitro de meristemos (MURASHIGE, 1974), (NAVARRO & col., 1975). Asimismo se han aplicado con éxito las técnicas de cultivos de tejidos a la obtención de variedades resistentes a ciertas enfermedades (HENSLEY, 1984).

La obtención de haploides mediante el cultivo de anteras ha hecho posible el disponer de líneas hemocigóticas en un tiempo más corto que el requerido por las técnicas tradicionales de mejora. El cultivo de estos haploides, callos, células y protoplastos, permite incrementar fuertemente la variabilidad (CAILLOUX, 1984), (SHARP & col., 1984) realizar cruces entre especies o cruces autoincompatibles, e introducir genes de bacterias en las células vegetales.

La aplicación de estas técnicas, ha tenido un éxito desigual en los diferentes grupos de plantas. En general en dicotiledoneas y sobre todo en solanáceas, ha ofrecido grandes posibilidades de uso.

En monocotiledoneas, y particularmente en gramíneas, la obtención y mantenimiento de tejidos, células o protoplastos in vitro presenta mayores dificultades y bajos rendimientos.

No obstante, los éxitos obtenidos en otras especies, y las razonables posibilidades que ofrece el cultivo in vitro, mantiene el interés de cada vez mayor número de investigadores en este campo, lo que hace posible avanzar cada vez más en el conocimiento de los requerimientos específicos de estas plantas, para su cultivo in vitro, la utilización de estas técnicas en un número creciente de especies y situaciones, y profundizar en el conocimiento de las peculiaridades de esta familia. (DALE, 1984).

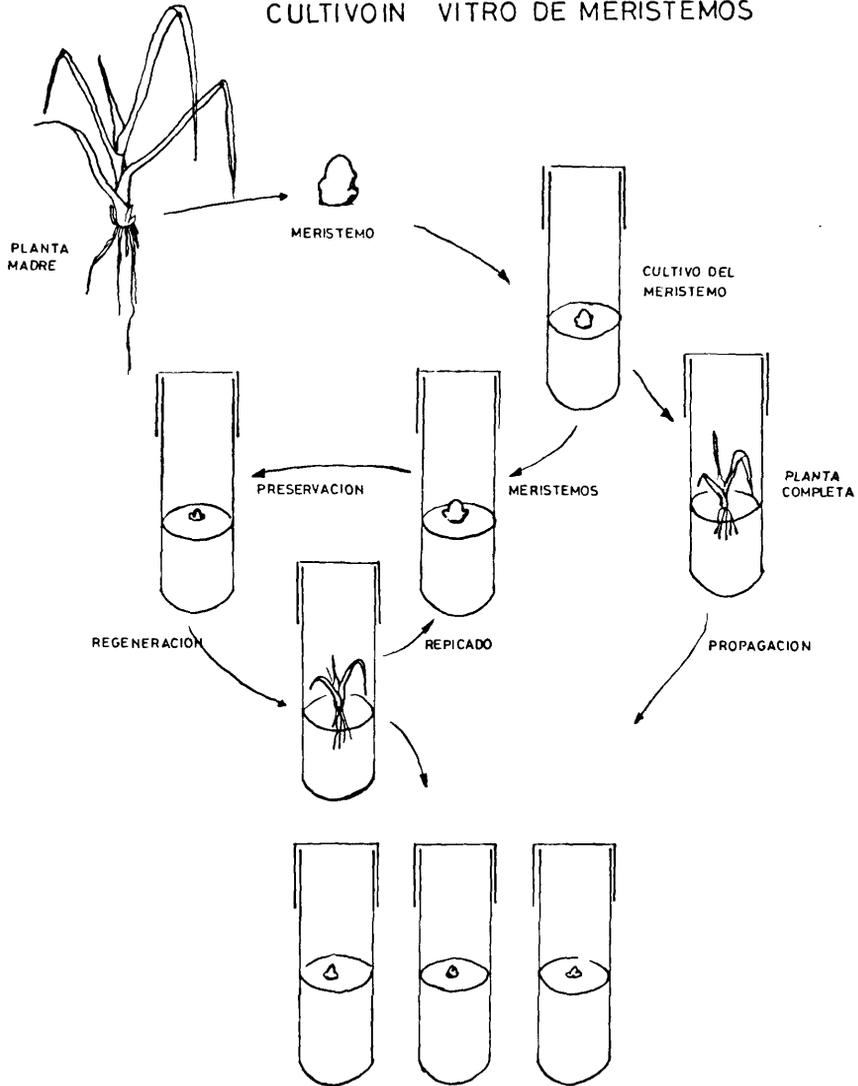
En el presente trabajo, se señalan las posibilidades de aplicación de estas técnicas en distintos campos de la mejora genética de gramíneas forrajeras, esbozándose algunas causas de los distintos rendimientos que presentan frente a otras familias.

UTILIZACIÓN DE CULTIVO DE TEJIDOS EN LA PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

Propagación

Habitualmente, el almacenamiento de semillas en condiciones adecuadas, permite la conservación de los recursos genéticos para la mejora de forrajeras. Sin embargo, en ciertas circunstan-

PROPAGACION VEGETATIVA POR CULTIVO IN VITRO DE MERISTEMOS



cias puede ser interesante mantener plantas vegetativamente, por ejemplo en genotipos que presentan una marcada autoesterilidad, en clones con baja capacidad para sobrevivir, en multiplicación de líneas con polen estéril, en mantenimiento de líneas madre de ciertos cultivares de interés, etc. En estos casos, el cultivo en invernadero o en campo, presenta el riesgo de infección, de ataques por insectos, etc., así como daños por cambios drásticos del clima.

El cultivo *in vitro*, permite el mantenimiento de estas plantas asépticamente preservándolas de eventuales infecciones o pérdidas, y permite la rápida propagación de las mismas (GREEN, 1978).

El cultivo puede iniciarse a partir de una sola planta utilizando yemas o meristemos, y cultivándolos *in vitro* en medio básico con agar en una cámara a 20-25° C, 10-16 h. luz, con una intensidad luminosa de 3000-6000 lux. Tres o cuatro semanas más tarde se pueden disponer de plantas sanas de 2-6 cm. de longitud.

Obtenidas estas plantas, pueden utilizarse para obtener nuevos repicados a partir de maristemos basales, ampliando el número de copias disponibles.

La inducción del ahijado puede llevarse a cabo *in vitro*, utilizando el medio de cultivo y las condiciones adecuadas (DALTON & DALE, 1981) y a partir de una sola planta, pueden disponerse de unas 8000 plántulas en unos tres meses (DALE, 1984). Teniendo en cuenta la relativa facilidad técnica con que esta propagación puede llevarse a cabo, y el escaso espacio necesario (pueden mantenerse unas 500 plantas por m²), podemos decir que se trata de un método seguro, rápido y fácil de propagación, con una alta eficacia en la multiplicación del número de copias del genotipo inicial.

Mantenimiento y preservación

Otra área de interés de esta técnica es el almacenamiento a largo plazo en condiciones de mínimo crecimiento, para la preservación de ciertos genotipos. Esto puede llevarse a cabo manteniendo los cultivos a 2-4° C con 8 h. de luz a unos 300 lux, en medio Murashige-Skoog (1962), sin auxinas.

En estas condiciones el cultivo puede permanecer casi sin crecimiento un año. Es conveniente al final de este período, transferir el tejido a medio y condiciones de crecimiento. Tras 4 a 6

semanas la plantita se ha desarrollado y a partir de ella pueden obtenerse nuevas réplicas para su utilización inmediata o bien para continuar su preservación (DALE, 1980).

Con este método, las plantas se mantienen sanas y disponibles para ser utilizadas en cualquier época del año. Una de las mayores ventajas de la utilización de maristemos o yemas en la propagación vegetativa es que en estos tejidos todas las células son diploides y que a lo largo de diferentes monocultivos y almacenamientos se mantienen genéticamente estables (DALE & col. 1982).

UTILIZACIÓN DEL CULTIVO DE TEJIDOS PARA LA OBTENCIÓN DE UNA NUEVA VARIABILIDAD GENÉTICA

Una de las más interesantes aportaciones de las técnicas de cultivo de tejidos a la mejora, es la posibilidad de incrementar la variabilidad genética en las poblaciones obtenidas por este método. Este incremento puede deberse a cambios del genotipo relacionados con las manipulaciones de los tejidos, o bien, pueden ser fácilmente inducidos mediante tratamiento con mutágenos o por intercambio dirigido de material genético.

En este sentido pueden contemplarse la obtención de haploides a partir de anteras, la obtención de callos de diferentes tejidos y la posterior embriogénesis, y el cultivo de protoplastos y células.

Obtención y cultivo de haploides

La obtención de haploides permite «destapar» la gran variabilidad existente en la población inicial el evitar los efectos enmascaradores de la dominancia, y por otra parte, la diploidización mediante colchicina u otros tratamientos permiten disponer de individuos homocigotos en un tiempo muy reducido.

La técnica de obtención de haploides, requiere un cultivo aséptico de granos de polen, anteras o espigas en medio y condiciones de cultivo, que se ajusta en función de la especie. El momento de obtención de las anteras, las condiciones de cultivo de la planta donante, y determinadas precauciones en la obtención de las anteras deben tenerse en cuenta (SUNDERLAND & DUNWELL, 1977).

En forrajeras, sin embargo, la respuesta a la inducción de la

androgénesis es muy baja y difícilmente conduce a la formación directa de un embrión y posterior plantita. Desde los primeros trabajos (NITZSCHE, 1970, KIMATA & SAKEMOTO, 1971, CHAPHAM, 1971, NIIZEKI & KITA, 1973, ZENKTELLER & col. 1974-75) hasta los más actuales, (KASPERBANER & col. 1980, PAGNIEZ & DESMALLY, 1979, DALE & col. 1981, CHEN & col. 1982, CONGER & MC DONNELL, 1983, SHARMA & col. 1984), la obtención de poblaciones de plantas haploides a partir de anteras no ha sido posible en gramíneas forrajeras.

Las anteras, o espigas cultivadas tienden a producir pequeños callos a partir de los cuales emergen los embrioides y eventualmente las plantas, en pocos casos haploides (KASPERBAUER & col. 1980).

El escaso éxito obtenido en la generación de plantas haploides completas a partir de anteras o inflorescencias, ha hecho cambiar la dirección de las investigaciones en este campo hacia el conocimiento de las posibles causas de este escaso éxito y hacia el desarrollo de otras fuentes de variabilidad como son el cultivo de callos, células y protoplastos.

Cultivo de callos

El establecimiento y mantenimiento de callos (masas de células indiferenciadas) se ha realizado con éxito en distintas especies forrajeras y a partir de diferentes partes de la planta. En general es necesaria la adición de hormonas al medio de cultivo (auxinas y citoquininas) para estimular la división celular.

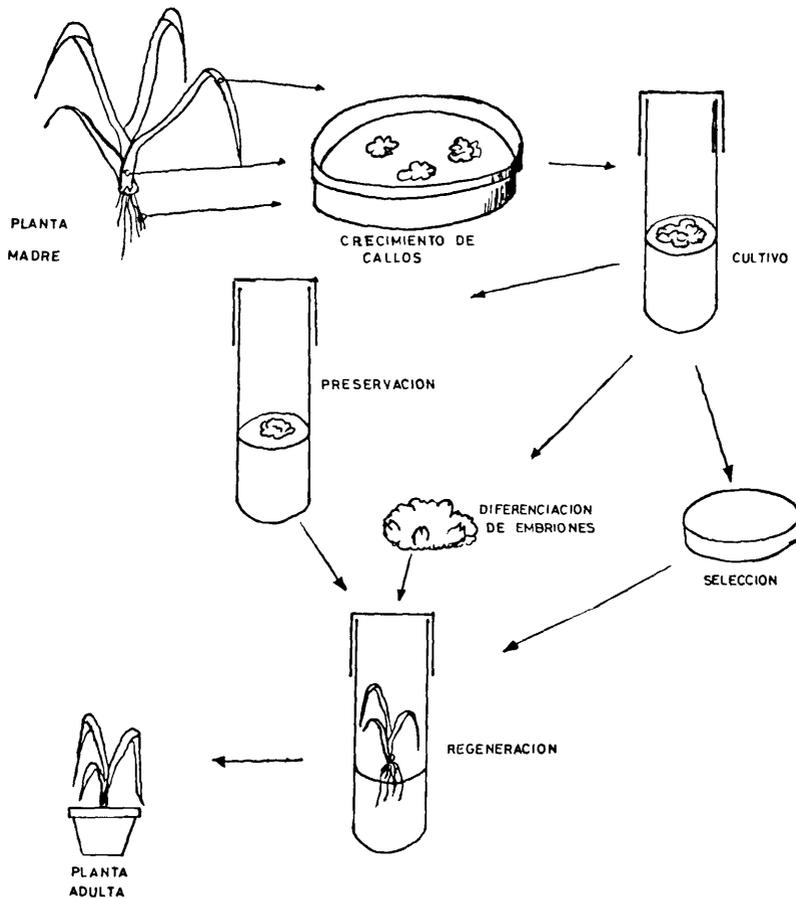
A partir de los callos, en muchos casos, modificando el balance de hormonas puede inducirse la embriogénesis que conduce finalmente a la formación de plantas completas.

En forrajeras, el establecimiento y mantenimiento de callos ha sido obtenido a partir de distintos explantes. El cultivo *in vitro* de anteras, que difícilmente permite la obtención de haploides, puede derivar hacia el desarrollo de callos, en general a partir del tejido de las paredes de la antera, por lo que los callos obtenidos, suelen ser diploides (PAGNIEZ & DEMASLY, 1979, SIVA & col. 1985). Similarmente, inflorescencias inmaduras han sido utilizadas para la obtención de callos en *Agropyron*, *Andropogon*, *Bromus* y otras especies forrajeras (LO & col. 1980), *Lolium*, (DALE & col. 1981), *Dactylis glomerata* (CHEN & col. 1982) entre otros.

La obtención de callos, se ha llevado a cabo con éxito también en inflorescencias maduras, (CONGER & MC DONNELL, 1983,

SHARMA & col. 1984) a partir de embriones maduros separados del resto de la semilla (KAREN & col. 1979, Mc. DONNELL & CONGER, 1984) y a partir de tejidos adultos como segmento de tallos (KASPERBANER & col. 1979) o secciones de hoja (HANNING & CONGER, 1982).

CULTIVO DE CALLOS



Aunque en ciertos casos se ha puesto énfasis en la utilidad de los callos para la preservación in vitro, y la propagación vegetativa mediante inducción de embriogénesis en la superficie de los mismos, la elevada frecuencia de modificaciones genéticas en estos cultivos hace que sean mucho más apropiados para obtener tetraploides y aneuploides, en definitiva, para incrementar la variabilidad genética.

Parte de la variación observada puede ser de origen fisiológico, y desaparecer al llevar las plantas a maceta. Las variaciones en el número de cromosomas, son muy frecuentes y en general su frecuencia aumenta con el tiempo de mantenimiento, aunque pueden obtenerse tetraploides tras sólo dos meses de cultivo. DALTON & col. 1982, analizando una muestra de 30 plantas de *Lolium perenne* regeneradas a partir de callos que llevaban dos años de cultivo in vitro, observaron mezcla de tetraploides y aneuploides.

Cambios genéticos que no implican variación en el número de cromosomas también han sido observados y que pueden suponer una fuente importante de variabilidad. Esta variabilidad ha permitido la selección de líneas de mayor rendimiento en caña de azúcar (LIN & CHEN, 1978) y resistentes a ciertas enfermedades (BLEINT & col. 1978) y ha permitido la obtención de nuevas líneas en híbridos de *L. multiflorum* - *L. perenne* (AHLOOWALIA, 1978).

Cultivo de células y protoplastos

La obtención de células aisladas y protoplastos, a partir de distintos tejidos, el cultivo de las mismas y la eventual regeneración de las plantas completas a partir de una célula, constituye uno de los aspectos más llamativos de la técnica de cultivo de tejidos.

Se ha especulado mucho sobre el potencial de estos métodos en mejora genética (THOMAS & col. 1979, VASIL & col. 1984) que permiten la aplicación de las técnicas de mutagénesis y selección típicas de microorganismos a plantas superiores. Los recientes logros de la ingeniería genética en este campo han aumentado aún más, el interés de estas técnicas.

Primeramente en *N. tabacum* (CARLSON, 1973) y más adelante en otras especies, ha sido posible obtener fusiones, transformaciones y transducción de material genético. (VASIL & col. 1984).

Las células pueden aislarse a partir de mesófilo de hoja, raíces, órganos de reserva o callos, mediante incubación con pectinasa, en segmentos fracturados de estos tejidos. Una vez separados los restos de hoja, etc... y aisladas las células, se cultivan en medio sólido obteniéndose al cabo de unos días (10-12) pequeñas colonias, callos incipientes en los que puede inducirse embriogénesis. El cultivo en medio líquido con agitación, permite el mantenimiento de suspensiones de células durante largo

tiempo, y su utilización directa en selección. La obtención de protoplastos requiere la rotura de la pared celular para permitir la salida del protoplasto, que se consigue mediante incubación con celulasa. En todas las operaciones es imprescindible mantener el adecuado equilibrio osmótico para mantener el protoplasto activo.

La posibilidad de utilización de protoplastos en forrajes ha sido hasta los años 80 limitada a *Bromus inermis* (KAO & col. 1973, VASIL & col. 1980). En ambos casos los cultivos se establecieron a partir de tejidos embriogénicos. En los últimos años, nuevos trabajos en distintas especies han ampliado el espectro de aplicación de estas técnicas a *Panicum maximum* (LU & col. 1981), *Pennisetum purpureum*, (VASIL & col. 1983). En *Lolium multiflorum* pueden aislarse protoplastos a partir de callos de embriones inmaduros, pero una vez aislados, deriva nuevamente hacia la formación de nuevos callos (JONES & DALE, 1982). La obtención de protoplastos a partir de cultivos de células, previamente establecidos ha ofrecido mayores éxitos (MARETZKI & NICKELL, 1973, ANONYMOUS, 1975, CHIKUEI & col. 1978). No obstante los cultivos derivaron rápidamente a nuevos tipos de células.

Hasta el momento el cultivo in vitro de protoplastos en plantas forrajeras no ha permitido generalizar su uso. Lo cual suele explicarse por causas de tipo genético, aunque también puede deberse a los escasos conocimientos sobre las bases metabólicas y genéticas de la respuesta de las células a las condiciones de cultivo, así como sobre los requerimientos para el establecimiento en estos cultivos in vitro.

APLICABILIDAD DE LAS TÉCNICAS DE CULTIVO DE TEJIDOS A LA MEJORA GENÉTICA EN FORRAJERAS

La dificultad que estas plantas presentan en el establecimiento y manejo de cultivo de tejidos in vitro, puede inducir un desaliento en cuanto a su potencial uso y su aplicabilidad.

Sin embargo, existen ejemplos de utilización de técnicas de cultivos de meristemos y yemas en el mantenimiento de ciertas líneas por propagación vegetativa. La utilización de este método de propagación permite eliminar virus y micoplasmas en *Lolium multiflorum* y *Dactylis glomerata* (DALE & col. 1980).

La obtención de callos, su mantenimiento y la organogénesis a partir de los mismos, se ha conseguido en muchas especies de

forrajeras a partir de distintos explantes. La obtención de poliploides y aneuploides, ha sido llevado a cabo en diferentes especies (DALE & col. 1982, CHEN & col. 1982) así como la obtención de líneas seleccionadas (AHLOOWATIA, 1978). La puesta a punto de estas técnicas permite pensar en selecciones por resistencia a infecciones, pestes, etc., como se ha conseguido en otras plantas, así como en las grandes posibilidades de utilización de los callos en programas de selección por resistencia a ciertas condiciones del medio (medios auxotróficos, alta concentración de aminoácidos, etc.) como ha sido llevado a cabo en otras especies (CARLSON, 1973).

El problema de la baja respuesta a las condiciones de cultivo in vitro, parece estar relacionado con las características genéticas de este grupo de plantas. Se han descrito marcadas diferencias en la respuesta frente al cultivo de tejidos a nivel de género, especie y cultivar (RINES & Mc. COY, 1981, HANZEL & col. 1984), así como heredabilidad del tipo de respuesta (KEYES & col. 1980). La selección por respuesta in vitro en varias generaciones ha dado líneas de mejor respuesta en cultivos in vitro (BINGHAM & col. 1975, DALE & col. 1982).

A pesar de este documentado efecto del genotipo, se desconoce el porqué ciertos genotipos de una determinada especie responden y otros no. La regulación del contenido interno de hormonas, las interacciones hormona externa y célula (receptores), y los cambios de estos efectos con la ontogenia, son posibles vías de explicación de estas distintas respuestas.

Las plantas forrajeras, cubren alrededor del 25 % de la superficie agrícola total, y son la base del 10 % del alimento producido (JOLLANS, 1981), por lo que juegan un papel fundamental en la alimentación humana.

Aunque la hibridación y selección clásicas siguen ofreciendo la mayor parte de los logros en el campo de la mejora genética, las aportaciones de las técnicas de cultivo de tejidos en este campo, comienzan a ser palpables en ciertos casos concretos a pesar de las dificultades que presenta esta particular familia de plantas.

No cabe duda de que explorar las posibilidades de uso de estas técnicas, mejorar los rendimientos de las mismas, y ampliar el número de especies y explantes utilizables puede reportar beneficios en la mejora genética de estas plantas.

BIBLIOGRAFIA

- AHLOOWALIA, B. S. 1978 «Novel megrass genotypes regenerated from embryo callus culture». Abstr. 4th Intern. Congr. Plant tissue and Organ Culture. Calgary. No 1723.
- Anónimo. 1975. «Insolation culture of rice protoplasts». Sci. Sínica 18, 779-784.
- BINGHAM, E. T, HURLEY, L. V., KOOTZ, D. M., SANNDERS, J. N., 1975 Crop. Sci. 15, 719-721.
- CARLSON, P. S., 1973. «Methionine-Sulfoximine mutans of tobacco». Science. 180, 1366-1368.
- CAILLOUX, M. 1984. «Plant tissue culture, rapid propagation, induced mutations and the potential role of protoplasts techniques». in Vose ' & Blixt. ed. Crop Breeding. A contemporary basis. Pergamon press.
- CARLSON, P. S., 1973. «The use of protoplasts for genetic research». Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70, 598-602.
- CHEN, CH. CHEN., L. F. & ROSS, J. G., 1982. «Plant regeneration from cultured immature inflorescences of orchardgrass (*Dactylis glomerata*). Euphitica 31, 19-23.
- CHI-KUEI, T. YING-CHIEN, C. YUN-LO, C. SU-HSUEN. W., 1978. Proc. Symp. Plant tissue culture. 317-324.
- CHAPHAM, D. 1971. «In vitro development of callus from the pollen of *Lolium* and *Hordeum*. Z. Pflanzenzüchts, 65. 4, 285-292.
- CONGER, B. V. & MC. DONNELL, R. E., 1983. «Plantlet formation from cultured inflorescences of *Dactylis glomerata*. Plant cell tissue organ culture, 3.247-255.
- DALE, P. J. 1984. Tissue culture and forage crop improvement. Span, 27.2.f
- DALE, P. J., 1980. «a method for in vitro storage of *Lolium multiflorum*» Ann. Bot. 45, 497-502.
- DALE, P. J., CHEYNE, V. A., DALTON, S. J., FAY, M. F., JONES, M. LL. & PIKE, C. S. 1982. «Tissue culture for the conservation and creation of genetic variability in forage grass and legumes». Meeting of the fodder crops section of Eucarpia. Aberysturyth, 124-132.
- DALE, P. J., CHEYNE, V. A., & DALTON, S. J., 1980. «Pathogen elimination and in vitro plant storage in forage grasses and legumes». in Tissue culture methods for plant pathologist. Infra D. A. & Melgeson. J. P. ed.
- DALE, P. J. & JONES, M. G. K., 1982. in Fujiwara, A. ed. Proc. 5th Int. Cong. Plant tissue and cell culture, Tokyo. 579-580.
- DALE, P. J., THOMAS, F. BREHELL, R. I. S. & WERNICKE, W. 1981. «Embryogenesis from cultured immature inflorescences and nodes of *Lolium multiflorum*». Plant cell, tissue organ culture. 1, 47-45.
- DALTON, S. J. & DALE, P. J., 1981. «Induced tillering of *Lolium multiflorum* in vitro». Plant cell tissue and organ culture. 1, 57-64.
- FLAVELL, R. & MATHIAS, R. 1984. «Prospects for transforming monocot crops plants. Nature, 307, 109.
- GREEN, C. E., 1978. «In vitro plant regeneration in cercals grasses». 411-418. in T. A. Thorpe. ed. Frontiers of plant tissue culture. Univ. of Calgary. Alberta. Canadá.
- HANNING, G. E. & CONGER, B. V., 1982. «Embryoid and plantlet formation from leaf segments of *Dactylis glomerata*. Theor. Appl. Genet. 63, 155-159.
- HANZEL, J. J., MILLER, J. P., BRINKMAN, M. A., FENDOS, E. 1984. «Genotype and media effects on callus formation and regeneration in Basley». Crop. Sci. 25, 27-31.
- HEINZ, D. J. KRISHNAMUSTHI, J. M. NICKELL, L. G. & MARETZKI, A., 1977. «Cell tissue and organ culture in sugar cane improvement». in J. Reinert & Y. P. J. Bajaj. ed. Plant cell tissue and organ culture. Springer-Verlag. Berlín.
- HENSAW, G. C. 1984 «Tissue culture for disease elimination and germplasm storage. in Vose and Blixt. ed. Crop Breeding. A contemporary basis. Pergamon press.

- JOLLANS, J. L., 1981. ed. «Grass land in the British economy». C. A. S. Paper 10. Univ. of Reading.
- JONES, M. G. R., DALE, P. J. 1982. «Reproductible regeneration of callus from suspension culture protoplasts of the grass *Lolium multiflorum*». Z. Pflanzenphysiol. 105:267-274.
- KAO, N. J., CAMBORG, D. L., MICHAYLUK, M. R., KELLER, W. A., MILLER, R. A., 1973. «The effect of sugars and inorganic salts on cell regeneration and sustained division in plant protoplasts. Coll. Intern. C.N.R.S. 212, 207-213.
- KASEN, W., LORVE, B. & CONGER, V., 1979. «Root and shoot formation from callus cultures of tall tissue. Crop. Sci. vol. 9. 397-400.
- KASPERBAWER, M. J., BUCHNER, R. C. & BUSH, L. P. 1979. «Tissue culture of annual ryegrass. Tall fescue F₁ Hybrids. Callus establishment and plant regeneration. Crop. Sci. 19, 457-460.
- KASPERBAWER, M. J., BUCKNER, R. C. & SPRINGER, W. D., 1980. «Haploid plants by anther-panicle culture of tall-fescue. Crop. Sci. 20, 103-106.
- KEYES, G. J. COLLINS, G. B. TAYLOR, N. L., 1980. «Theor. appl. genet. 58, 265-271.
- LIN, M. C. & CHEN, W. H., 1978. «Tissue and cell culture as aid to sugar cane breeding. II. Performance and yield potential callus derived lines». Euphytica. 27, 273-282.
- LO, P. F. CHEN, C. M. & ROSS, J. G., 1980. «Vegetative propagation of temperate estorage grasses through callus culture. Crop Sci. 20, 363-370.
- LU, C. Y., VASIL, V., VASIL, I. K., 1981. «Isolation and culture of protoplasts of *Panicum maximum* Laeg (Guinea grass): Somatic embryogenesis and plantlet formation Z. Pflanzenphysiol. 104. 311-318.
- MARETZKI, A. & NICKELL, L. G., 1973. «Formation of protoplasts from sugar cane cell suspensions and the regeneration of cell cultures from protoplasts. Coll. Intern. C.N.R. 212. 51-63.
- MC. DONNELL, R. E., CONGER, B. V., 1984. «Callus induction and plantlet formation from nature embryo explants of Kentucky bluegrass. crop. Sci. 24, 573-578.
- MOREL, G. M., 1964. «Tissue culture, new means of clonal propagation in orchids». Am. Orchid. Soc. Bull. 33, 473-478.
- MURASHIGE, T., 1974. «Plant propagation through tissue cultures». Annu. Rev. of Plant. Physiol. 25, 135-166.
- NAVARRO, L., ROISTACHER, C. N., MURASHIGE, T., 1975. «Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus free citrus. Proc. Am. Soc. Hort. Sci, 100, 471-479.
- NIIZEKI, M. & KITA, F., 1973. «Studies in plant cell and tissue culture. III. In vitro induction of callus from anther culture of forrage crops». J. Fae. Agr. Hokkaido Univ. Sapporo, 57, 3, 293-300.
- NITZCHE, W., 1970. «Herstellung haploider pflanzen aus Festuca-Lolium Bastarden. Naturwissenschaften, 57, 4, 199-200.
- PAGNIER, M. & DEMALY, Y. 1979. «Obtention d'individus androgenetiques par culture in vitro d'antheres de Ray-grass d'Italie (*Lolium multiflorum*). Ann. Anelior. Plants. 29, 6, 631-637.
- RIVES, H. W. & MC. COY, T. J., 1981. «Tissue Culture variability in wheat: Callus induction and plant regeneration». Crop. Sci. 22, 546-550.
- SHARP, W. R., REED, S. M. & EVANS, D. A., 1984. «Production and application of haploid plants». in Vose and Blixed. Crop Breeding a contemporary basis. Pergamon press.
- SHARMA, H. C., GILL, B. S. & SEARS, R. G., 1984. «Inflorescence culture of wheat. Agropyron hybrids. Callus induction, plant regenerations and potential in overcoming sterility baniers». Plant Cell Tissue Organ Culture, 3, 247-255.
- SIVA REDDY, V., LEEHAVATHI, S. & SEN, S. K., 1985. «Influence of genotype and culture medium on minoscore callus induction and freen plant regeneration in anthers of *Oryza sativa*. Phisiol. Plant. 63, 309-314.
- SUNDERLAND, N. & DUNWELL, J. M., 1977. «Anther and pollen culture». in H. E. Street. ed. Plant Tissue and Cell Culture. Blackwell. Sci. Publ. Oxford.

- THOMAS, E., KING, P. J., POTRYKUS, I., 1979. «Improvement of crop plant via single cells in vitro». An assessment. Z. Pflanzenzücht. 82, 1-30.
- VASIL, V., WANGO, D. X. & VASIL, I. K., 1984. «Isolation and Culture of Embryogenic Protoplasts of Cereals and Grasses. in Vasil, I. K. ed. Cell Culture and somatic Cell Genetics of Plants. 1. Academic. Press.
- VASIL, I. K., SCOWCRAFT, W. R., FREY, K. J., 1984. «Plant improvement and somatic cell Genetics». Academic. Press. London.
- VASIL, V. & VASIL, I. K., 1980. «Isolation and culture of cercal protoplasts. II. Embryogenesis and planlet formation from protoplast of *Pennisetum americanum*». Theor. Appl. Venet. 56. 97-99.
- VASIL, I. K., WAMP, D. X. & VASIL, I. K., 1983. «Plant regeneration from protoplasts of *Pennisetum purpureum*». Schum (Napier grass). Z. Pflanzenphysiol. III, 233-234.
- VOSE, P. B. & BLIXT, S. G., 1984. Crop. Breeding, a contemporary basis. Pergamon Press. London.
- ZENKTELLER, M. MISIMA, E., PONITKA, A., 1975. «Induction of androgenic embrioids in the in vitro cultures anthers of several species». Experimentia 31, 3, 289-291.

TISSUE CULTURE AND BREEDING IN FORAGES

SUMMARY

Tissue culture of forages have some technical difficulties, overall in haploids and protoplasts culture. However meristem and callus culture have direct applications in preservation and selection of new cultivars.