

# Capítulo 4

## Agentes gelatinizadores en el cultivo de tejidos

L. Szabados\*

V. M. Núñez\*\*

L. M. Tello\*\*\*

G. Mafla\*\*\*

J. Roa\*\*\*

W. M. Roca\*\*\*

---

\* Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. Dirección actual: Biological Research Center, Institute of Plant Physiology, Szeged, Hungría.

\*\* Department of Agronomy and Plant Genetics, St. Paul, Minnesota, E. U.

\*\*\* Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

## Introducción

El éxito del cultivo de tejidos vegetales depende sustancialmente del medio de cultivo empleado. Para establecer un sistema de cultivo de tejidos, se elabora primero un medio de cultivo óptimo que se ajuste a los principales requerimientos nutricionales de la especie vegetal, al tipo de explante, y al sistema de cultivo. La efectividad de un cultivo depende tanto de los ingredientes básicos —nutrimentos, azúcar y hormonas— como del agente gelatinizador (Romberger y Tabor, 1971; Bending, 1974; Lorz et al., 1983).

El agar comercial contiene muchas impurezas que pueden alterar las características químicas y físicas del medio, afectando así directamente los tejidos y células cultivados (Kohlembach y Wernicke, 1978; Singha et al., 1985).

Se han sugerido varias alternativas para el agar en el cultivo de tejidos. Los agentes gelatinizadores propuestos para el cultivo de protoplastos son, p. ej., agarosa (Lorz et al., 1983; Adams y Townsend, 1983; Shillito et al., 1983; Thompson et al., 1986), alginato (Adaoha-Mbanaso y Roscoe, 1982), y gelrita (en inglés, Gelrite) (Szabados y Roca, 1986). En el cultivo de anteras de arroz, un medio líquido resultó mucho mejor que el medio sólido de agar (Sunderland y Roberts, 1979; Wernicke y Kohlembach, 1976). El algodón como soporte en medio líquido afectó especialmente el crecimiento y el endurecimiento in vitro de las plantas, en comparación con el agar (Sakina, 1984). El medio líquido suele usarse cuando el agar se considera una limitación en algunos sistemas de cultivo (Kohlembach y Wernicke, 1978; Lee et al., 1986).

Estos resultados indican que el tipo y la concentración de los agentes gelatinizadores pueden afectar sustancialmente la efectividad de varios cultivos de tejidos y sistemas de cultivo como la micropropagación, la inducción de raíces, el cultivo de protoplastos, y el cultivo de anteras.

Se investigó el efecto que varios agentes gelatinizadores tenían en el éxito de los siguientes cultivos de tejidos y de células: la iniciación del cultivo de meristemas; la micropropagación, la sobrevivencia y el crecimiento del callo; la regeneración de callos derivados del cultivo de anteras; y la eficiencia del 'plaqueo' en los cultivos de suspensión celular y en las colonias derivadas de protoplastos. Se halló que la gelrita (Kelco Div. de Merck & Co.) es un agente gelatinizador efectivo para solidificar los medios de cultivo de tejidos en los sistemas ensayados y en las especies estudiadas: estilosantes o 'stylo' (*Stylosanthes guianensis*), yuca (*Manihot esculenta*), y arroz (*Oryza sativa*).

## *Stylosanthes*

### **Cultivos de callos y de suspensiones celulares**

Se hicieron cultivos de callos y de suspensiones celulares de *S. guianensis*, accesiones CIAT 136 y CIAT 184, y se establecieron según los procedimientos descritos anteriormente (Meijer y Broughton, 1981; Meijer y Steinbiss, 1983; Szabados y Roca, 1986). Los cultivos de callos derivados de hojas se iniciaron y mantuvieron en medios de inducción de callo (Medio MD-A), bajo 12 horas de iluminación diaria (3000 lux de tubos fluorescentes Sylvania). El medio de inducción de callo contenía sales MS (Murashige y Skoog, 1962) y vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968), y fue complementado con 1 mg/litro de ANA y 1 mg/litro de BAP, y solidificado con agar Difco al 0.7%, a menos que se especifique otro contenido. Los cultivos de suspensión de células provenían de callos friables y se mantuvieron en un medio líquido MS-A, con agitación continua (12 rpm). Para el plaqueo de los cultivos de suspensión celular, se mezcló 1 ml de esa suspensión (de dos días de edad) con 9 ml del medio sólido MS-A, previamente derretido a 40 °C, y la mezcla se transfirió de inmediato a cajas Petri. Se registró el número de colonias celulares en desarrollo en las cajas Petri y la eficiencia de plaqueo se calculó 3 semanas después de la siembra en placa.

### **Regeneración de plantas**

Trozos de callo de 3 a 5 mm de *S. guianensis* de 30 días de edad se transfirieron a un medio de regeneración MS-B sólido (Meijer y Broughton, 1981) y se cultivaron en las mismas condiciones de cultivo que los callos. Este medio de regeneración contenía sales MS, vitaminas B5, y 1 mg/litro de BAP, y fue solidificado con agar al 0.7%, a menos que se indique otra cosa. Se contó el número de callos que formaron brotes, y la frecuencia de regeneración se calculó después de 30 días de incubación.

### **Cultivo de protoplastos**

Los protoplastos de *S. guianensis* CIAT 136 se aislaron del mesófilo foliar de plantas germinadas in vitro. Los protoplastos aislados se cultivaron en un medio D2a líquido, en la oscuridad y a 27 °C, como se describió en Szabados y Roca (1986). Las colonias derivadas de protoplastos fueron transferidas a un medio sólido 3 semanas después de la iniciación de los cultivos. Se contaron las colonias celulares en crecimiento y la eficiencia del plaqueo se calculó 3 semanas después de la siembra en placa.

## Yuca

### Cultivo de meristemas y micropropagación

Los cultivos de meristemas de yuca (*Manihot esculenta*) provenían de yemas apicales de plantas de dos variedades, M Col 22 y M Col 1505, cultivadas en invernadero. Después de la excisión, los meristemas de 0.2 mm se cultivaron en un medio de micropropagación estándar (Roca, 1984). Este medio contenía macronutrientes y micronutrientes MS junto con 1 mg/litro de tiamina-HCl, 100 mg/litro de m-inositol, 2% de sacarosa, 0.02 mg/litro de ANA, 0.05 mg/litro de BAP, y 0.05 mg/litro de  $AG_3$ . El medio se solidificó con agar Difco al 0.6%, a menos que se especifique otra cosa. Los cultivos de meristemas se desarrollaron en fotoperíodos de 12 h (3000 lux de tubos fluorescentes Sylvania), a 28 °C durante el período de luz y a 25 °C durante el período de oscuridad. Las plantitas se micropropagaron mediante cortes nodales, cada 2 meses. Roca (1984) describe los procedimientos detallados para el cultivo de meristemas y para la micropropagación.

La evaluación de los cultivos de meristemas se basó en mediciones de peso fresco de plantitas regeneradas. La micropropagación se evaluó por el peso fresco y la longitud de los brotes, y por el número de nudos y raíces de las plantitas. Estas evaluaciones se hicieron en cultivos de 30 días.

### Embriogénesis somática

La inducción de la embriogénesis somática se basó en procedimientos descritos anteriormente (Szabados et al., 1987). Se incubaron hojitas inmaduras de plantas propagadas in vitro en un medio de inducción, a 27 °C, en la oscuridad. El medio de inducción era un medio MS semisólido, complementado con 8 mg/litro de 2,4-D.

## Arroz

### Cultivo de anteras

La técnica del cultivo de anteras de arroz fue la de Nuñez et al. (1987). Anteras de cinco variedades de arroz (*Oryza sativa*) se sometieron inicialmente a un tratamiento frío en el medio de inducción (8 °C durante 10 días). Luego los cultivos se incubaron durante 5 semanas a 25 °C, en la

oscuridad. El medio de inducción contenía papa al 10%, 4 mg/litro de ANA, 1 mg/litro de KIN, y 5% de sacarosa. Después de 30 días, microcállos de un tamaño de 1 a 2 mm fueron trasferidos a un medio de regeneración e incubados bajo 16 horas de iluminación diaria (2500 lux de tubos fluorescentes Sylvania), a 25 °C. El medio de regeneración era MS semisólido, complementado con 1 mg/litro de ANA, 4 mg/litro de KIN, y 3% de sacarosa. La tasa de supervivencia de los callos trasferidos y la frecuencia de regeneración de plantas se evaluó después de 30 días de incubación en un medio de regeneración.

## Preparación de Medios de Cultivo

Se utilizó casi siempre un medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) que contenía diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento y de otros aditivos. Los agentes de solidificación se agregaron a los medios ya preparados antes de la esterilización de éstos. Se usaron los siguientes agentes gelatinizadores:

- a: Bacto-agar (Difco), 0.7%;
- a-3: Bacto-agar (Difco), 0.8%; purificado en tres lavados consecutivos de agua destilada;
- as: Agarosa (Sigma, tipo VII), 0.6%;
- ge: Gelrita (Gelrite, Kelco, Division of Merck), 0.12%;
- li: Medio líquido, con soporte de algodón o de papel filtro.

Todos los medios fueron esterilizados en el autoclave durante 15 min, a 260 °C, y a 20 libras de presión.

## Resultados

### Crecimiento del callo de *Stylosanthes guianensis*

Los cultivos de callo procedían de trozos de hoja joven que se mantuvieron en un medio MS semisólido. Los aumentos de peso fresco y de peso seco se determinaron después de 30 días de crecimiento. Cuando se compararon varios agentes gelatinizadores, se detectaron diferencias notorias en el crecimiento del callo tanto en peso fresco como en peso seco. La gelrita y la agarosa resultaron ser significativamente superiores a cualquiera de los otros agentes gelatinizadores. El agar tres veces lavado propició un crecimiento mejor que el agar sin lavar, aunque no tan bueno como el obtenido con gelrita (Figura 4.1, A).

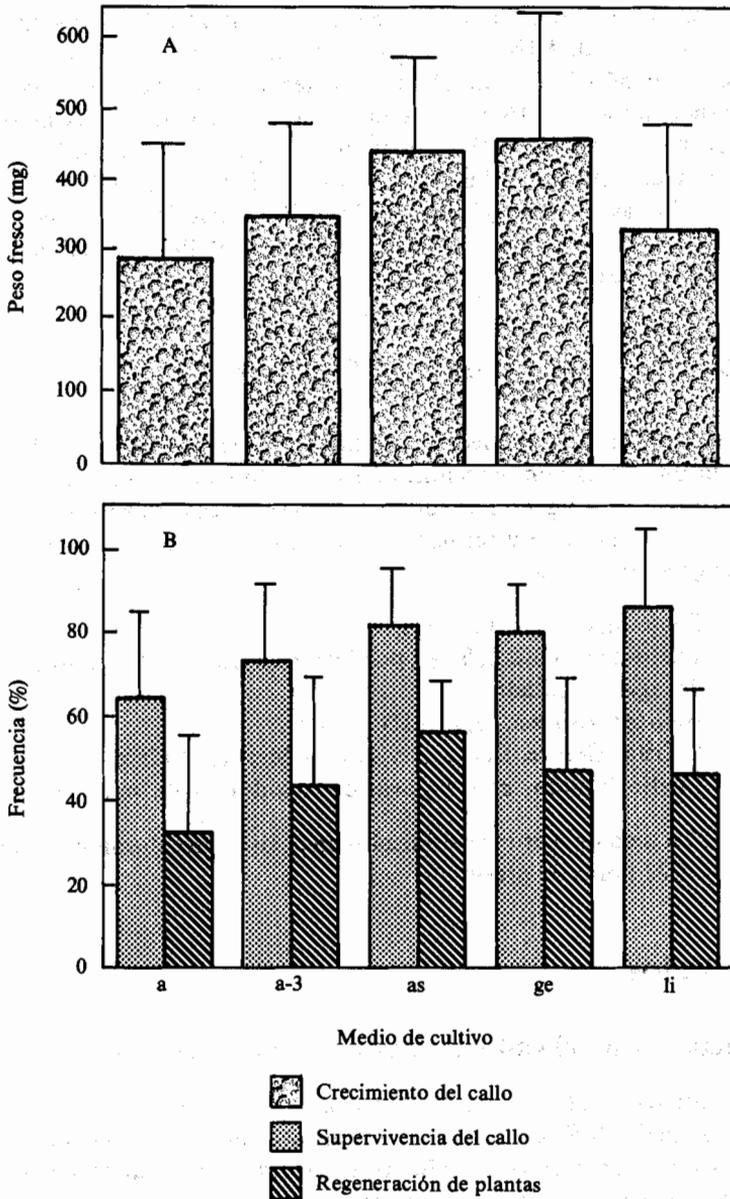


Figura 4.1. Efecto de varios agentes gelatinizadores en el crecimiento del callo de *S. guianensis* y en la regeneración de plantas de esa leguminosa. A) Incremento de peso fresco del callo después de 30 días de cultivo. B) Supervivencia del callo y porcentaje de regeneración de plantas. a = agar; a-3 = agar lavado tres veces; as = agarosa; ge = gelrita; li = medio líquido con soporte de algodón.

## **Regeneración de plantas de *S. guianensis***

La regeneración del callo de *S. guianensis* se indujo al trasferir trozos pequeños de callo a un medio MS semisólido. La agarosa, la gelrita y los medios líquidos se consideraron superiores al agar tanto para lograr la supervivencia del callo como para elevar la eficiencia de su regeneración (Figura 4.1, B).

## **Plaqueo de suspensiones celulares de *S. guianensis***

Cuando las suspensiones celulares finas y gruesas se aplicaban en placa, en medio sólido, la eficiencia del plaqueo de la suspensión gruesa fue siempre mayor que la de la suspensión fina. Sin embargo, la eficiencia de plaqueo de ambas suspensiones celulares fue afectada por el agente gelatinizador empleado. Con gelrita se obtuvo la eficiencia de plaqueo más alta, y con agar sin purificar de Difco la más baja. El agar comercial lavado produjo un aumento de la eficiencia de plaqueo similar al de la agarosa. El efecto favorable de la purificación del agar sugiere que la baja eficiencia del plaqueo obtenida con el agar comercial es causada, en parte, por las impurezas que éste contiene.

La gelrita fue siempre mejor que otros agentes solidificadores. Cuando se comparó con el agar, la gelrita cuadruplicó la eficiencia de plaqueo de la suspensión celular fina y elevó en 4% la de la suspensión celular gruesa (Figura 4.2, A). El efecto de diferentes agentes gelatinizadores fue siempre más notorio en suspensiones celulares finas; en las suspensiones celulares gruesas se obtuvo sólo un pequeño porcentaje de aumento en la eficiencia del plaqueo cuando se usó agar purificado o agarosa (Figura 4.2, B). La concentración de gelrita de 0.045% a 0.14% no afectó significativamente la eficiencia del plaqueo.

## **Plaqueo de las colonias celulares derivadas de protoplastos de *S. guianensis***

Se usó un medio líquido en el período inicial de cultivo de los protoplastos; luego, las microcolonias fueron trasferidas a un medio sólido.

La eficiencia del plaqueo de las colonias celulares derivadas de protoplastos fue afectada enormemente por el tipo de agente de solidificación. El Bacto-agar comercial fue inferior a cualquiera de los otros agentes gelatinizadores; aunque el lavado de este agar mejoró significativamente la eficiencia de laminación de las colonias celulares, fue sin embargo, menos

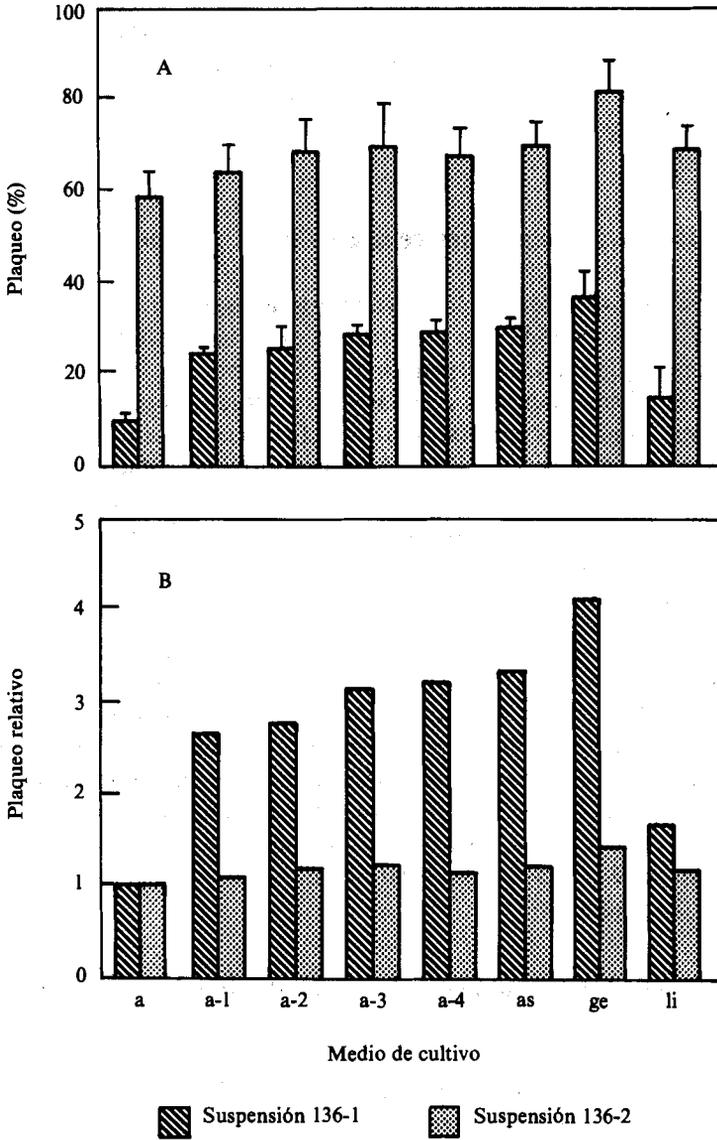


Figura 4.2. Eficiencia de 'plaqueo' (A) y 'plaqueo' relativo (B) de una suspensión celular fina (136-1) y de otra gruesa (136-2) de *S. guianensis*, cultivadas en medios que contenían diferentes agentes gelatinizadores (a, a-3, etc., ver Figura 4.1; a-1, a-2, a-4 = agar lavado una, dos, o cuatro veces).

eficiente que la gelrita. La agarosa, el agar purificado y el medio líquido con soporte de papel filtro mostraron una efectividad similar (Figura 4.3).

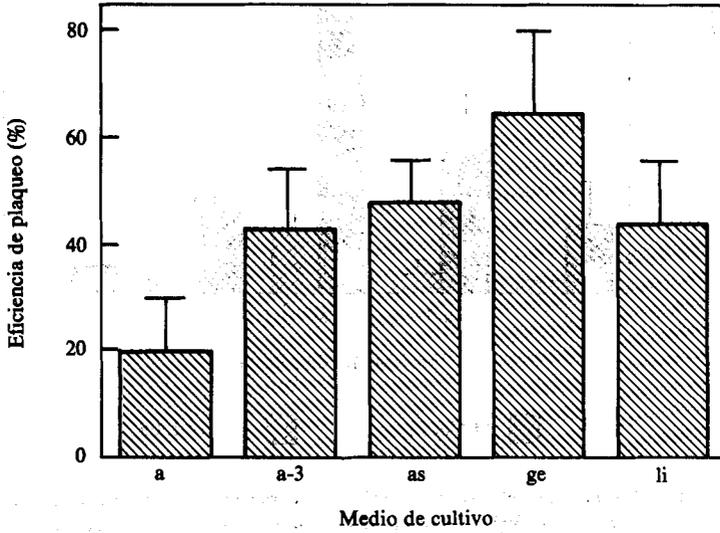


Figura 4.3. Eficiencia de plaqueo de las colonias celulares de *S. guianensis* derivadas de protoplastos obtenidos del mesófilo foliar, en medios solidificados con cuatro agentes gelatinizadores diferentes (a, a-3, etc., ver Figura 4.1).

### Cultivo de meristemas de yuca

Se aislaron meristemas de yuca de plantas cultivadas en invernadero y se cultivaron en medios con diferente agente de solidificación. Se hallaron diferencias altamente significativas en el aumento de peso fresco de los brotes obtenidos de los dos genotipos examinados: M Col 22 y M Col 1505 (Figura 4.4). Aunque los meristemas de M Col 22 crecieron mucho más rápidamente que los de M Col 1505, en ambos la solidificación con agarosa resultó superior pues el aumento de peso fresco fue de cuatro a cinco veces más rápido con ésta que con el agar. La solidificación con gelrita y con el medio líquido fueron también mejores que con el agar, pero no alcanzaron la eficiencia de la agarosa.

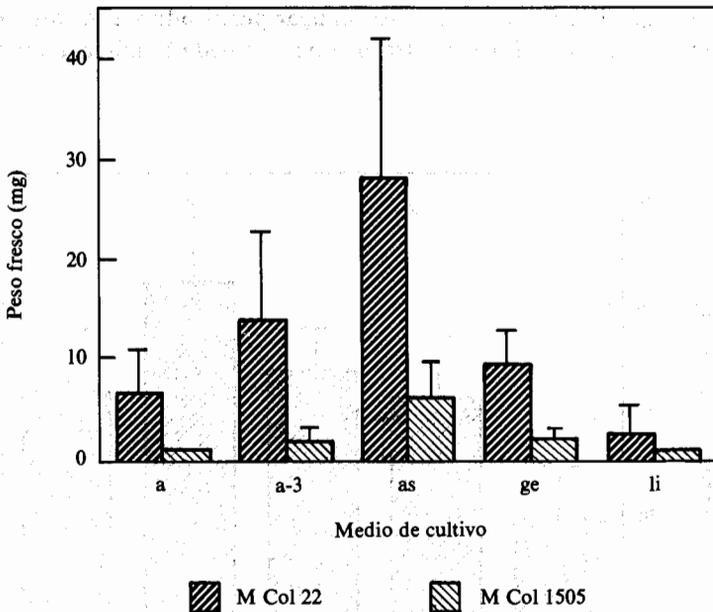


Figura 4.4. Diferencias en el peso fresco de la parte aérea de dos variedades de yuca (M Col 22 y M Col 1505) que se desarrollaron de ápices meristemáticos en medios solidificados con cuatro agentes gelatinizadores (a, a-3, etc., ver Figura 4.1).

### Micropropagación de la yuca

Cultivos de ápices de yema de la yuca fueron micropropagados mediante esquejes de nudo, y se evaluó el efecto de los agentes gelatinizadores en la tasa de propagación en términos del peso fresco de los brotes, de su longitud, del número de nudos y del número de raíces formadas durante 4 semanas de cultivo (datos no presentados). Se hallaron diferencias significativas en el peso fresco y en la longitud de los brotes. La gelrita y la agarosa estimularon mejor el crecimiento de estos cultivos. Ninguna diferencia significativa se detectó en el número de nudos y de raíces formadas. Estas observaciones sugieren que, aunque los cultivos de yuca pueden crecer con más vigor en medios con agarosa y gelrita, el agente gelatinizador no afecta la tasa final de propagación.

## Embriogénesis somática de la yuca

Se indujo la formación de embriones somáticos en las hojas inmaduras de yuca en un medio de alto contenido de 2,4-D. Leves diferencias se observaron en la frecuencia de formación de embriones cuando ésta dependía de la acción de diferentes agentes gelatinizadores. La desviación estándar de las frecuencias de formación de embriones fue siempre muy alta, y no fue posible establecer diferencias significativas entre los diferentes agentes gelatinizadores (Figura 4.5).

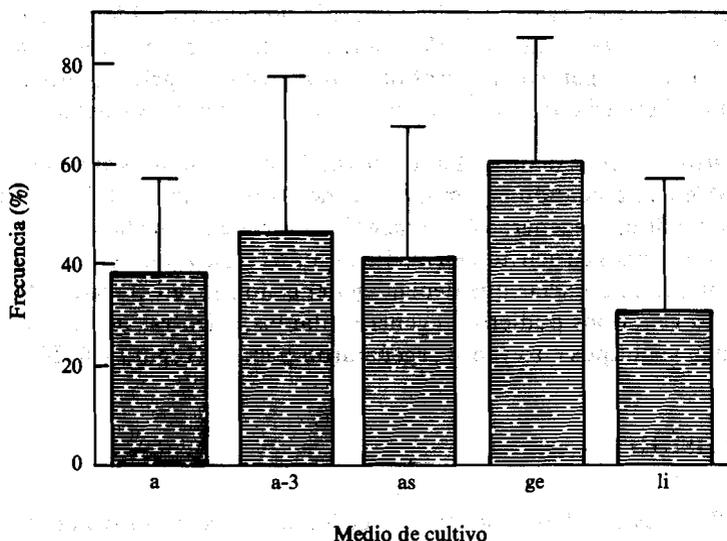


Figura 4.5. Frecuencia de formación de embriones somáticos en explantes foliares inmaduros de yuca cultivados con diferentes agentes gelatinizadores (a, a-3, etc., ver Figura 4.1).

## Cultivo de anteras de arroz

Se transfirieron individualmente callos derivados de anteras de arroz a un medio de regeneración, solidificado mediante diversos agentes gelatinizadores.

Tanto la supervivencia de los callos transferidos como la frecuencia de regeneración de las plantas revelaron diferencias notorias al estar aquéllos expuestos a diferentes agentes gelatinizadores.

**Supervivencia de callos de anteras.** La supervivencia de los callos de todos los genotipos de yuca ensayados aumentó cuando se usó agarosa o gelrita como agente de solidificación o un medio líquido con soporte de algodón, con respecto a esa supervivencia en el cultivo desarrollado en medio de agar solidificado. La tasa promedio de supervivencia del callo fue aproximadamente 1.7 veces mayor en agarosa y 1.5 veces mayor en gelrita y en el medio líquido que en el agar estándar (Figura 4.6, A).

Se observaron diferencias en la supervivencia de los callos, y éstas dependían del genotipo; las más grandes se detectaron en los callos de la línea pura (Col 1 x M312A), cuya supervivencia aumentó más de diez veces si se cultivaban en agarosa, gelrita o medio líquido. Una diferencia menor se detectó en la línea Tox 1010-4-1: sólo un pequeño porcentaje de aumento de la supervivencia se obtuvo en agarosa o en gelrita, y no se halló ninguna diferencia (respecto al agar estándar) del cultivo en medio líquido.

**Regeneración de plantas.** La regeneración de las plantas aumentó considerablemente cuando se empleó un medio de agarosa. La frecuencia promedio de esa regeneración aumentó 2.3 veces en el medio de agarosa y de 1.8 a 2.0 veces en gelrita y en medio líquido (Figura 4.6, A). También se han hallado diferencias que dependen del genotipo; en el medio de agar sólo tres genotipos pudieron regenerar plantas, mientras que en agarosa los cinco genotipos ensayados regeneraron plantas (Figura 4.6, B).

## Discusión

Se halló en este trabajo que muchos de los sistemas de cultivo ensayados son afectados por la naturaleza del agente gelatinizador empleado. Mejoras significativas se lograron en siete tipos diferentes de cultivo, además de los nueve ensayados, cuando el agar usado tradicionalmente fue remplazado por agarosa o gelrita o cuando se lavó el agar con agua destilada. En todos los experimentos, la gelrita o la agarosa parecían ser mucho mejores como agentes gelatinizadores.

Se halló en este ensayo que 0.15% de gelrita podía solidificar eficazmente el medio MS que se usaba con más frecuencia. El cambio de la concentración de gelrita entre 0.045% y 0.2% no afectó la eficiencia de plaqueo de los cultivos de células de *S. guianensis*. Esta observación contrasta con la que se hizo en el medio de agar al 0.7%: las diversas concentraciones de agar redujeron la formación de brotes y la tasa de propagación de diversas especies (Romberger y Tabor, 1971; Debergh, 1933; Singha, 1984).

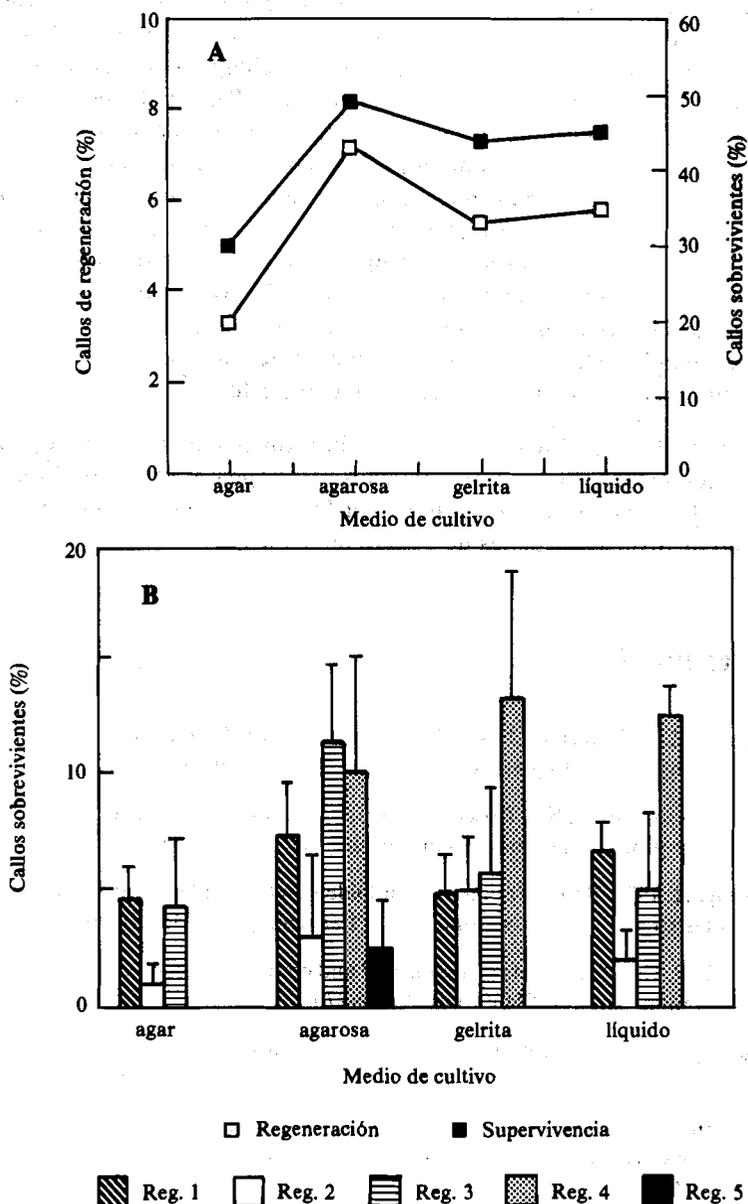


Figura 4.6. Efecto de tres agentes gelatinizadores en un cultivo de anteras de arroz. A) Supervivencia del callo y callo de regeneración. B) Callo de regeneración de cinco líneas F1 (en medio líquido con soporte de algodón). Reg. = regeneración.

Los cambios hechos en la concentración del agar pueden afectar la eficiencia de los cultivos de tejidos vegetales porque alteran las tasas de difusión y, por ende, la disponibilidad de los componentes del medio de cultivo (Romberger y Tabor, 1971; Debergh, 1983; Singha et al., 1985). Aparentemente, la gelrita no ejerce ese efecto en las células cultivadas en el rango de concentración examinado. En algunos sistemas de cultivo, los medios líquidos favorecieron mayores eficiencias de plaqueo que el medio sólido (Kohlembach y Wernicke, 1978; Lee et al., 1986). En muchos de los sistemas de cultivo ensayados se emplearon medios líquidos que tenían papel filtro o algodón como soporte físico de los tejidos. Este sistema ofrecería algunas incomodidades en el manejo de los cultivos, como removerlos cuando están enraizados, o tener difícil acceso a meristemas o explantes delicados que se sumerjan en el soporte.

Los resultados obtenidos en este laboratorio sugieren que la gelrita puede remplazar eficazmente a muchos otros agentes gelatinizadores y a medios líquidos, sin afectar —antes bien, bien mejorando— la eficiencia de cultivo de diversos sistemas de cultivo de tejidos.

## Referencias

- Adams, T. L. y Townsend, J. A. 1983. A new procedure for increasing efficiency of protoplast planting and clone selection. *Plant Cell Reports* 2:165-168.
- Adaoha-Mbanaso, E. N. y Roscoe, D. H. 1982. Alginate: An alternative to agar in plant protoplast culture. *Plant Science Letters* 25:61-66.
- Bending, H. 1974. Regeneration von haploiden und diploiden pflanzen aus protoplasten von *Petunia hybrida* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 74:327-356.
- Debergh, P. C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plantarum* 59:270-276.
- Gamborg, O. L.; Miller, R. A. y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- Kohlembach, H. W. y Wernicke, W. 1978. Investigation on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. *Z. Pflanzenphysiol.* 86:463-472.
- Lee, M.; Wetzstein, H. Y. y Sommer, H. E. 1986. The effect of agar vs. liquid medium on rooting in tissue-cultured sweetgum. *HortScience* 21:317-318.
- Lorz, H.; Larking, P. J. y Scowcroft, W. R. 1983. Improved protoplast culture and agarose media. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 2:217-226.

- Meijer, E. G. M. y Broughton, W. J. 1981. Regeneration of whole plants from hypocotyl-, root-, and leaf-derived tissue cultures of the pasture legume *Stylosanthes guyanensis*. *Physiol. Plant.* 52:280-284.
- y Steinbiss, H. H. 1983. Plantlet regeneration from suspension and protoplast cultures of the tropical pasture legume *Stylosanthes guyanensis* (Aubl.) Sw. *Ann. Bot.* 52:305-310.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Núñez, V. M.; Martínez, C. P.; Narváez, J. y Roca, W. M. 1987. Obtención de líneas homocigotas de arroz (*Oryza sativa* L.) tolerantes a la toxicidad de aluminio utilizando el cultivo de anteras. *Soc. Ing. Agron. del Llano (Colombia)* 4:47-54.
- Roca, W. M. 1984. El cultivo de meristemas para la conservación de germoplasma de yuca in vitro: Guía de estudio. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 44 p.
- Romberger, J. A. y Tabor, C. A. 1971. The *Picea abis* shoot apical meristem in culture: Agar and autoclaving effects. *Amer. J. Bot.* 58:131-140.
- Sakina, K. 1984. The effect of BA on *in vitro* plant regeneration from shoot meristems of cassava. Department of Crop Science, University of Zimbabwe.
- Shillito, R. D.; Paszkowski, J. y Potrykus, I. 1983. Agarose plating and bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast derived colonies in a number of plant species. *Plant Cell Reports* 2:244-247.
- Singha, S. 1984. Influence of two commercial agars on *in vitro* shoot proliferation of "Almey" crabapple and "seckel" pear. *HortScience* 19:227-228.
- ; Townsend, E. C. y Oberly, G. H. 1985. Mineral nutrient status of crabapple and pear shoots cultured *in vitro* on varying concentration of three commercial agars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110:407-411.
- Sunderland, N. y Roberts, M. 1979. Cold pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anthers. *Ann. Bot.* 43:405-414.
- Szabados, L. y Roca, W. M. 1986. Regeneration of isolated mesophyll and cell suspension protoplasts to plants in *Stylosanthes guianensis*, a tropical forage legume. *Plant Cell Reports* 5:174-177.
- ; Hoyos, R. y Roca, W. M. 1987. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. *Plant Cell Reports* 6:248-251.
- Thompson, J. A.; Abdullah, R. y Cocking, E. C. 1986. Protoplast culture of rice (*Oryza sativa*) using media solidified with agarose. *Plant Science* 47:123-133.
- Wernicke, W. y Kohlembach, H. W. 1976. Investigations on liquid culture medium as a means of anther culture in *Nicotiana*. *Z. Pflanzenphysiol.* 31:330-340.