

Изменения в андрогенната реакция при тритикале (*xTriticosecale* Wittm.) в резултат на включване на извлек от батати в индукционната хранителна среда

Христо Стоянов*, Иван Белчев, Валентин Байчев

Добруджански земеделски институт – Генерал Тошево, България

*E-mail: hpstoyanov@abv.bg

Резюме

Антерната култура е бърз метод за стабилизиране на полученото генетично разнообразие в селекцията на тритикале. Същевременно големият брой албиносни регенеранти, който се получава създава трудности от практическа гледна точка. Видът и съставът на хранителната среда оказва влияние върху добива на зелени и албиносни регенеранти. С цел да се проучи влиянието на индукционна среда с включен екстракт от батати са заложени 7500 антери от шест хибридни комбинации тритикале със сорт Акорд. Формирани са 5183 калуси и ембриоиди при средна калусна индукция 68.5%. Регенерирани са 467 (6.2%) зелени и 864 (11.5%) албиносни растения. Индукционната хранителна среда с екстракт от сладки картофи значително понижава калусната индукция, както и последващата регенерация на зелени и албиносни растения. Комбинирането на двата извлека няма толкова драстично действие върху реакцията в антерна култура. Използването на извлек от батати е относително подходящо за практически цели, най-вече заради значително намалената продукция на албиносни регенеранти.

Ключови думи: албиносни регенеранти; антерна култура; екстракт от батати; индукционна хранителна среда; тритикале

Changes in the androgenic response of triticale (*xTriticosecale* Wittm.) as a result of the inclusion of sweet potato extract in the induction media

Hristo Stoyanov*, Ivan Belchev, Valentin Baytchev

Dobrudzha Agricultural Institute – General Toshevo, Bulgaria

*E-mail: hpstoyanov@abv.bg

Citation

Stoyanov, H., Belchev, I., & Baytchev, V. (2019). Changes in the androgenic response of triticale (*xTriticosecale* Wittm.) as a result of the inclusion of sweet potato extract in the induction media, *Rastenievadni nauki*, 56(5), 92-98 (Bg).

Abstract

The anther culture is a fast method of stabilizing the genetic diversity in triticale breeding. At the same time, the large number of recovered albino regenerants creates practical difficulties. The type and composition of the induction medium influences the yield of green and albino regenerants. In order to study the effect of an induction medium with sweet potato extract included, 7500 anthers of six hybrid Triticale combinations of Akord cultivar were set. 5183 calluses and embryoids were formed with a mean callus induction of 68.5%. 467 (6.2%) green and 864 (11.5%) albino plants were regenerated. The induction medium with sweet potato extract significantly reduces callus induction as well as the subsequent regeneration of green and albino plants. Combining the two extracts (potato and sweet potato) does not have significant effect on the reaction in anther culture. The use of sweet potato

extract is relatively suitable for practical purposes, mainly because of the significantly reduced production of albino regenerants.

Keywords: albino regenerants; anther culture; sweet potato extract; induction media; triticale

Създаването на генетично разнообразие посредством хибридизация и последващото му стабилизиране при тритикале е един от съществени проблеми пред селекцията на културата (Randhawa et al., 2015). Съществуват разнообразни селекционни подходи за създаване на генетично разнообразие – междусортова, междувидова, междуродова хибридизация, мутационна селекция. Всички те, обаче са свързани с продължително изравняване на голям по обем хибриден материал. Това е особен проблем при тритикале, тъй като вследствие на амфидиплоидния му характер, процесът на изравняване на хибридният материал е значително по-труден. Lelley (2006) посочва, че крехкият баланс, който съществува между пшеничните и ръжения субгеном в линиите тритикале, се нарушава изключително лесно при кръстосването им. В това отношение ефективен инструмент, който значително скъсява селекционния процес е създаването на дихаплоидни линии.

При тритикале практическо приложение и добра ефективност за получаване на дихаплоидни линии намират методите, използвани при обикновената пшеница (Wedzony et al., 2015). Въпреки възможността за кратък период от време да бъде създадено и стабилизирано голямо генетично разнообразие, съществуват и определени недостатъци – високият процент на албиносни регенеранти, по-малкият процент на спонтанно удвояване на хромозомния брой, непълната хомозиготност на получените линии (Jain et al., 1996; Eudes & Chugh, 2009; Wedzony et al., 2015).

Според Wedzony et al. (2015) получаването на множество албиносни растения при тритикале възпрепятства ефективното създаване на дихаплоидни линии чрез метода на антерната култура. Според същите автори, използването на различен състав на хранителните среди и предтритирането на изходния материал може значително да повиши процентът на зелените регенеранти. Lantos et al. (2014) съобщава за намаляване на процента на албиносните регенеранти чрез предтритирането с манитол и приложение на терми-

чен стрес. Добавянето на антиоксиданти към индукционната среда също се свързва с повишаване на честота на зелените регенеранти (Asif et al., 2013). Marciniak et al. (1998) съобщават за много добър ефект при използването на среда P2 в съчетание с малтоза. Същите автори посочват, че за практическо получаване на висок процент зелени регенеранти с добра ефективност може да се използват средите P2 и C17 с добавяне на 9% малтоза. Eudes & Chugh (2009) препоръчват използването на P2 среда в съчетание с добавена захароза. Makowska & Zimny (2015) отбелязват, че факторите, които влияят върху продукцията на албиносните регенеранти са условията на отглеждане, използвания метод, вида на индукционната и регенерационната хранителна среда. Eudes & Amundsen (2005) съобщават, че взаимодействието генотип x вид на индукционната среда има най-голямо значение за получаването на висок брой зелени регенеранти.

Използването на хранителна среда P2 се отличава с голяма практическа приложимост и икономическа ефективност при обикновената зимна пшеница (Abd El-Maksoud & Bedo, 1993). Използването и при тритикале обаче, се свързва с висок добив на албиносни регенеранти. Характерна особеност на средата е, че в състава и се включва 10% картофен екстракт (Chuang et al., 1998). Замяната на картофите с други въгледехидратни източници е възможен способ за подобряване на добива на зелени регенеранти при тритикале и за намаляване на броя на албиносните регенеранти. В това отношение съществуват голям брой скорбелни източници – батати (*Ipomoea batatas*), топинамбур (*Helianthus tuberosus*), маниока (*Manihot esculenta*), ямс (*Dioscorea* sp.), таро (*Colocasia esculenta*) и др.. Най-близки по съдържание на скорбяла до картофите са бататите. Освен това, те съдържат по-голямо количество разтворими захари на 100 g като особено високо е съдържанието на захароза (Edu-Kwarteng et al., 2012). Това ги прави подходящ източник за замяна на картофите в индукционната хранителна среда, тъй като P2

в съчетание със захароза е широко препоръчван вариант за подобряване на продукцията на ди-хеплоидни линии при тритикале (Marciniak et al., 1998; Eudes & Chugh, 2009).

Целта на настоящето изследване е да се установи изменението в андрогенната реакция при тритикале при използването на екстракт от батати в индукционната хранителна среда.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Използвани са шест кръстоски тритикале, представени в Таблица 1.

Донорните растения за антерно култивиране са отгледани при полски условия. Подбрани са класове, чийто връх се намира приблизително на височината на езичето на предпоследния лист (среден-късен еднороден стадий от развитието на микроспорите в антерите). Стъблата с подходящите класове са отрязани, поставени в съд с вода и предтретираны при ниска температура (4°C) за 7 дни. След този период класовете са отрязани и в ламинар-бокс е проведена повърхностна стерилизация със 70% етанол. От всеки клас са заложени по 30 антери върху следните хранителни среди:

1. M0 – контролна хранителна среда Potato 2 (P2) (Chuang et al., 1978), съдържаща 10% картофен екстракт;

2. M1 – хранителна среда P2 с 5% картофен екстракт и 5% извлек от батати;

3. M2 – хранителна среда P2 с 10% екстракт от батати.

Приготвянето на екстракта от батати се извършва по същия начин както и картофения

екстракт. Използвани са розови, сочни батати с произход Египет.

Епруветките със заложените антери са култивирани при 28°C, без светлина. След четвъртата седмица от култивирането, епруветките с прашниците са преглеждани периодично за формиране ембриогенни структури (калуси и ембриоиди). Калусите с размер около 2 mm са прехвърлени върху регенерационна хранителна среда 190-2 (Zhuang & Xu, 1983) и култивирани при 25°C и разсеяна светлина за 7-10 дни. След появата на малки растения-регенеранти осветеността е повишена (2000lx, 16 часа ден/8 часа нощ) до пълното им развитие (6-8 cm).

По време на култивирането са отчитани брой получени калуси (БПК), брой зелени регенеранти (БЗР) и брой албиносни регенеранти (БАР), брой регенеративни калуси (БРК) за всяка епруветка.

Андрогенната реакция е характеризирана чрез отчитане на следните параметри:

1. калусна индукция (КИ) – брой индуцирани калуси на 100 култивирани антери, %;

2. растителна регенерация (РР) – процент на зелените и албиносни растения, регенерирани от прехвърлените калуси;

3. добив (честота) на зелени регенеранти (ДЗР) – брой зелени регенеранти на 100 култивирани антери, %;

4. добив (честота) на албиносни регенеранти (ДАР) – брой албиносни регенеранти на 100 култивирани антери, %;

5. пропорция на зелени регенеранти – процент на зелените регенеранти спрямо регенерирани растения.

Таблица 1. Използвани кръстоски по произход

Table 1. Used crosses triticale by their origin

№/ No	Хибридна комбинация/ Hybrid combination	Педигре/ Pedigree
1	41/12 x Akord	F4(21/03-214 x Respekt) x Akord
2	67/12 x Akord	F4(150/05-68 x Respekt) x Akord
3	95/12 x Akord	F4(195/05-68 x Doni 52) x Akord
4	109/12 x Akord	F4(5/06-027 x Respekt) x Akord
5	113/12 x Akord	F4(5/06-027 x Doni 52) x Akord
6	148/12 x Akord	F4(110/05-66 x Respekt) x Akord

Данните са обобщени и осреднени по генотипове и вид на индукционната хранителна среда. Проведен е двуфакторен дисперсионен анализ за установяване на влиянието на генотипа и вида на индукционната хранителна среда върху показателите БПК, БЗР, БАР, БРК.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Регенерационният потенциал на индуцираните ембриогинни структури не се повлиява съществено от вида на екстракта и е в границите 24.5-28.1% (Таблица 2).

Таблица 2. Ефект на вида на екстракта в индукционната хранителна среда върху реакцията в антерна култура

Table 2. Effect of the type of the extract in the induction media on the anther culture response

Генотип/ Genotype	Хранителна среда/ Media	БКА/ NCA	БПК/ NOC	КИ, %/ CI, %	БРК/ NRC	РР, %/ PR, %	БАР/ NAR	ДАР, %/ YAR, %	БЗР/ NGR	ДЗР, %/ YGR, %	ПЗР, %/ PGR, %
41/12 x Akord	M0	390	463	118,7	98	21,2	64	16,4	34	8,7	34,7
	M1	420	456	108,6	100	21,9	61	14,5	39	9,3	39
	M2	450	279	62	51	18,3	22	4,9	29	6,4	56,9
	<i>CC/AV</i>	1260	1198	95,1	249	20,8	147	11,7	102	8,1	41
67/12 x Akord	M0	360	406	112,8	120	29,6	75	20,8	45	12,5	37,5
	M1	420	389	92,6	136	35	79	18,8	57	13,6	41,9
	M2	420	309	73,6	101	32,7	51	12,1	50	11,9	49,5
	<i>CC/AV</i>	1200	1104	92	357	32,3	205	17,1	152	12,7	42,6
95/12 x Akord	M0	450	311	69,1	84	27	47	10,4	37	8,2	44
	M1	450	299	66,4	98	32,8	62	13,8	36	8	36,7
	M2	390	228	58,5	67	29,4	41	10,5	26	6,7	38,8
	<i>CC/AV</i>	1290	838	65	249	29,7	150	11,6	99	7,7	39,8
109/12 x Akord	M0	450	277	61,6	62	22,4	50	11,1	12	2,7	19,4
	M1	420	186	44,3	54	29	41	9,8	13	3,1	24,1
	M2	420	101	24	25	24,8	20	4,8	5	1,2	20
	<i>CC/AV</i>	1290	564	43,7	141	25	111	8,6	30	2,3	21,3
113/12 x Akord	M0	420	550	131	127	23,1	97	23,1	30	7,1	23,6
	M1	420	259	61,7	74	28,6	54	12,9	20	4,8	27
	M2	390	274	70,3	57	20,8	49	12,6	8	2,1	14
	<i>CC/AV</i>	1230	1083	88	258	23,8	200	16,3	58	4,7	22,5
148/12 x Akord	M0	420	186	44,3	47	25,3	31	7,4	16	3,8	34
	M1	390	129	33,1	20	15,5	13	3,3	7	1,8	35
	M2	420	36	8,6	10	27,8	7	1,7	3	0,7	30
	<i>CC/AV</i>	1230	351	28,5	77	21,9	51	4,1	26	2,1	33,8
<i>CC/AV</i>	M0	2490	2193	88,1	538	24,5	364	14,6	174	7	32,3
	M1	2520	1718	68,2	482	28,1	310	12,3	172	6,8	35,7
	M2	2490	1227	49,3	311	25,3	190	7,6	121	4,9	38,9
	<i>CC/AV</i>	7500	5138	68,5	1331	25,9	864	11,5	467	6,2	35,1

БКА/NCA – брой култивирани антери/number of cultivated anthers; БПК/NOC – брой получени калуси/number of obtained calli; КИ/CI – калусна индукция/callus induction; БРК/NRC – брой регенеративни калуси/number of regenerative calli; РР/PR – растителна регенерация/plant regeneration; БАР/NAR – брой албиносни регенеранти/number of albino regenerants; ДАР/YAR – добив на албиносни регенеранти/number of albino regenerants; БЗР/NGR – брой зелени регенеранти/number of green regenerants; ДЗР/YGR – добив на зелени регенеранти/number of green regenerants; ПЗР/PGR – пропорция на зелени регенеранти/proportion of green regenerants; *CC/AV* – средна стойност/average value.

С най-висок добив зелени регенеранти е комбинацията с линия 67/12 – 12.5%, с висок потенциал (7-9%) са три кръстоски, а хибридите на линии 148/12 и 109/12 се представят по-умерено, съответно с 38% и 2.7%.

Комбинацията на двата екстракта не променя значимо регенерацията на зелени растения, само при кръстоската на линия 148/12 се понижава на 1.8%. Извлекът от батати намалява продукцията на зелени регенеранти, единствено при хибрида на линия 67/12 остава на нивото на контролния вариант. Средната регенерация на зелени растения не се променя значимо при ембриогенните структури от хранителна среда с картофен екстракт (7.0%) и комбинацията на двата извлека (6.8%), но се понижава в известна степен при екстракт от батати (4.9%). При използване на среда С17 Marciniak et al. (2003) съобщава за добив на зелени регенеранти между 0.9 и 27.9%, като при по-голямата част от генотиповете (14 от 19) стойностите са между 0.9 и 5%. Gonzales & Jouve (2000) посочват между 2.42 и 15.36% добив на зелени регенеранти при индукционна среда съдържаща захароза и малтоза. Висок добив на зелени регенеранти (16.8%) получават Lantos et al. (2014) при W14 индукционна среда. Banaszak (2011) отчитат между 2.8 и 6.6%.

Получените от нас резултати показват, че дори да намалява добивът на зелени регенеранти при използване на екстракт от батати, то той е в границите 1.2-11.9%. Независимо от това при контролния вариант са получени най-високи стойности имащи практическо значение.

Продукцията на албиносни регенеранти е най-висока при кръстоските на линии 113/12 и 67/12, съответно 23.1% и 20.8%, а най-малка при хибрида на линия 148/12 – 7.4%. Междинният вариант с двата извлека забележимо намалява регенерацията на безхлорофилни растения при кръстоските на линии 113/12 и 148/12, съответно на 12.9% и 3.3%; останалите кръстоски реагират със слаби изменения в положителна/отрицателна посока. При екстракта от батати стойностите се редуцират в пъти, само при хибрида на линия 95/12 продукцията на албиносни регенеранти е сходна с тази на контролния вариант. Средната регенерация на албиносни растения е с близки стойности

между контролната хранителна среда (14,6%) и комбинацията на двата екстракта (12.3%) и значително се понижава при извлек от батати (7.6%). При различни изследвания (Pauk et al., 2000; Marciniak et al., 2003; Lantos et al., 2014), броят на получените албиносни растения варира между 5.5 и 54.5% като клонят към по-високите стойности. Поради тази причина използването на екстракт от батати е ефективен способ за намаляване на броя на албиносните растения. Следва да се подчертае, че макар броят на албиносните растения да намалява, добивът на зелени регенеранти остава на същото ниво или също намалява, но в съвсем малка степен, което няма селекционна стойност.

Общо в експеримента са култивирани 7500 антери, от които са формирани 5138 калуси и ембриоиди при средна калусна индукция 68.5%. Регенерирани са 467 (6.2%) зелени и 864 (11.5%) албиносни растения (Таблица 2).

Резултатите от проведения дисперсионен анализ доказват по-горните твърдения. Изменението на броя на получените калуси се дължи на генотипа и на използвана индукционна среда, но взаимодействието на двата фактора не е доказано. Това се свързва с идентичното влияние на действието на индукционната среда върху всички генотипове. Същата тенденция се наблюдава и при броя на получените албиносни растения. На практика намаляването на добива на албиносни регенеранти се дължи както на генотипното влияние, така и на индукционната среда. Тази тенденция се запазва и по отношения на общия брой регенеративни калуси. Броят на зелените регенеранти обаче се влияе доказано при условията на проведения експеримент само от генотипа. На практика индукционната среда не влияе достоверно върху техния добив. Запазването на броя на зелените регенеранти в съчетание с намален брой албиносни растения има важно значение от практическа гледна точка, тъй като безхлорофилните растения са свързани с намаляване на ефективността на метода на антерната култура. От друга страна, от селекционна гледна точка значение имат единствено броят зелени регенеранти, поради което хранителната среда съдържаща екстракт от батати няма перспективно значение.

Таблица 3. Влияние на генотипа и вида на екстракта в индукционната хранителна среда върху андрогенната реакция

Table 3. Influence of genotype and type of extract in induction media on the androgenic reaction

Източник на вариране/ Source of variation	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Брой получени калуси/Number of obtained calli					
Genotype (G)	14704,844	5	2940,969	17,384	,000
Media (M)	6055,100	2	3027,550	17,896	,000
G * M	2623,501	10	262,350	1,551	,123
Error	39248,278	232	169,174		
Total	62267,824	249			
Брой албиносни регенеранти/Number of albino regenerants					
Genotype (G)	434,137	5	86,827	10,041	,000
Media (M)	192,440	2	96,220	11,127	,000
G * M	104,337	10	10,434	1,207	,288
Error	2006,206	232	8,647		
Total	2732,016	249			
Брой зелени регенеранти/Number of green regenerants					
Genotype (G)	298,064	5	59,613	11,792	,000
Media (M)	22,491	2	11,245	2,224	,110
G * M	10,358	10	1,036	,205	,996
Error	1172,873	232	5,055		
Total	1503,904	249			
Брой регенеративни калуси/Number of regenerative calli					
Genotype (G)	1259,590	5	251,918	14,171	,000
Media (M)	343,559	2	171,779	9,663	,000
G * M	146,558	10	14,656	,824	,605
Error	4124,255	232	17,777		
Total	5859,104	249			

ИЗВОДИ

Обобщените резултати от проведеното изследване с 6 F₁ кръстоски относно влиянието на вида на екстракта в индукционната хранителна среда показват, че:

1) индукцията на калуси и ембриониди последователно намалява при частично или пълно заместване на картофения екстракт с извлек от батати;

2) растителната регенерация не се повлиява от вида на екстракта;

3) регенерацията на зелени растения не се променя съществено при частично заместване

на картофения екстракт, но се понижава при пълно заместване с извлек от батати;

4) регенерацията на албиносни растения следва горната тенденция, но понижението е много по-голямо;

5) пропорцията на зелени регенеранти се увеличава при включване на екстракт от батати, но без повишаване на броя на получените зелени регенеранти. Установените закономерности правят използването на извлек от батати относително подходящо за практически цели, най-вече заради значително намалената продукция на нежеланите албиносни регенеранти при антерна култура от тритикале. От селекцион-

на гледна точка индукционната среда P2 с 10% картофен екстракт има по-голямо значение.

ЛИТЕРАТУРА

- Adu-Kwarteng, E., Sakyi-Dawson, E. O., Ayernor, G. S., Truong, V. D., Shih, F. F., & Daigle, K.** (2014). Variability of sugars in staple-type sweet potato (*Ipomoea batatas*) cultivars: the effects of harvest time and storage. *International journal of food properties*, 17(2), 410-420.
- Asif, M., Eudes, F., Goyal, A., Amundsen, E., Randhawa, H., & Spaner, D.** (2013). Organelle antioxidants improve microspore embryogenesis in wheat and triticale. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(5), 489-497.
- Abd El-Maksoud, M. M., & Bedo, Z.** (1993). Genotypes and genotype \times medium interaction effects on androgenic haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Cereal Research Communications*, 21(1), 17-24.
- Banaszak, Z.** (2010). Breeding of triticale in DANKO. *Tagung der 61. Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs*, 65-68.
- Chuang, C. C., Ouyang, T. W., Chia, H., Chou, S. M., & Ching, C. K.** (1978, May). A set of potato media for wheat anther culture. In *Proc. Symp. Plant Tissue Culture* (pp. 51-56). Peking: Science Press.
- Eudes, F., & Amundsen, E.** (2005). Isolated microspore culture of Canadian 6 \times triticale cultivars. *Plant cell, tissue and organ culture*, 82(3), 233-241.
- Eudes, F., & Chugh, A.** (2009). An overview of triticale doubled haploids. In: Touraev A, Forster BP, Jain S(eds), *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Springer, Dordrecht.
- González, J. M., & Jouve, N.** (2000). Improvement of anther culture media for haploid production in triticale. *Cereal Research Communications*, 65-72.
- Jain, S. M., Sopory, S. K., & Veilleux, R.** (Eds.). (1996). *In Vitro Haploid Production in Higher Plants: Volume 2: Applications* (Vol. 24). Springer Science & Business Media.
- Lantos, C., Bóna, L., Boda, K., & Pauk, J.** (2014). Comparative analysis of in vitro anther-and isolated microspore culture in hexaploid Triticale (X *Triticosecale* Wittmack) for androgenic parameters. *Euphytica*, 197(1), 27-37.
- Lelley, T.** (2006). Triticale: a low-input cereal with untapped potential. *Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement: cereals*. Edited by R.J Singh and PP Jauhar. CRC Press, Taylor & Francis Group, London, UK, 395-430.
- Makowska, K., & Zimny, J.** (2015). Albinism—common phenomenon during cereal androgenesis. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, 96(1).
- Marciniak, K., Banaszak, Z., & Wędzony, M.** (1998). Effect of genotype, medium and sugar on triticale (x*Triticosecale* Wittm.) anther culture response. *Cereal Research Communications*, 26(2), 145-151.
- Marciniak, K., Kaczmarek, Z., Adamski, T. & Surma, M.** (2003). The anther-culture response of triticale line x tester progenies. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 8(2), 343-351.
- Pauk, J., Puolimatka, M., Tóth, K. L., & Monostori, T.** (2000). In vitro androgenesis of triticale in isolated microspore culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61(3), 221.
- Ponitka, A., & Ślusarkiewicz-Jarzina, A.** (2007). The effect of liquid and solid medium on production of winter triticale (x *Triticosecale* Wittm.) anther-derived embryos and plants. *Cereal research communications*, 35(1), 15-22.
- Randhawa, H. S., Bona, L., & Graf, R. J.** (2015). Triticale breeding—progress and prospect. In *Triticale* (pp. 15-32). Springer, Cham.
- Xingzhi, W., & Han, H.** (1984). The effect of potato II medium for triticale anther culture. *Plant Science Letters*, 36(3), 237-239.
- Wędzony, M., Żur, I., Krzewska, M., Dubas, E., Szechyńska-Hebda, M., & Wąsek, I.** (2015). Doubled haploids in triticale. In *Triticale* (pp. 111-128). Springer, Cham.
- Zhuang, J. J., & Xu, J.** (1983). Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus. *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement*. Science Press, Beijing, 431.