한국 대표 밀 품종의 봄파종 시기에 따른 미성숙배 채취 시기별 조직배양 효율

최창현[†] · 손재한[†] · 박진희 · 김경민 · 김경훈 · 정한용 · 손지영 · 박태일 · 강천식^{*}

국립식량과학원 밀연구팀

The Effects of Harvesting Time on the Efficiency of Tissue Culture Used Immature Embryos from Korean Wheat Cultivars

Changhyun Choi[†], Jae-Han Son[†], Jin Hee Park, Kyeong-Min Kim, Kyeong-Hoon Kim, Han-Yong Jung, Ji-Young Shon, Tae-Il Park, and Chon-Sik Kang^{*}

National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Wanju, 55365, Republic of Korea

Abstract The regeneration rate of plantlets cultivated via tissue culture is an important factor for wheat transformation. Similar to other monocotyledons, the most efficient tissue culture materials for wheat are immature embryos. However, stable year-round production of immature embryos is not possible in the field where various stress factors co-exist. In this study, we investigated the generation and subsequent plantlet incident rates of callus induced from immature embryos obtained from different sowing times in 2020 and compared these among wheat cultivars. We found that the rates of regeneration and plantlet incidence obtained using immature embryos of the Ariheuk cultivar were higher than those of other domestic cultivars, and that the tissue culture efficiency was similar to that of Bobwhite, which has been established as a cultivar with excellent transformation efficiency. Furthermore, the Baekkang cultivar showed high tissue culture efficiency only when sown from early to mid-March, whereas Keumkang showed higher tissue cultivation efficiency only by sowing in mid- and late February. Among the five cultivars assessed in this study, Jopum showed the lowest tissue culture efficiency. It is anticipated that the findings of this study will contribute to enhancing the transformation efficiency of domestic wheat varieties.

Keywords wheat, tissue culture, immature embryo, regeneration, Korean wheat cultivar

Received on September 28, 2020. Revised on September 28, 2020. Accepted on October 12, 2020.

* Corresponding Author (E-mail: kcs1209@korea.kr, Tel: +82-63-238-5454, Fax: +82-63-238-5463)

[†] Author Contributions: Changhyun Choi and Jae-Han Son contributed equally.

서 언

밀은 국내 제2 주곡작물로서 현재 40개 품종이 개발되었다. 그러나 기후변화 및 소비자 기호도 변화 등에 빠르게 대응하기 위하여 정밀하고 효율적인 밀 품종 육종 기술인 유전자교정 (genome editing)이 각광받고 있다. 그럼에도 불구하고 밀 유전자교정에 관한 연구의 높은 장벽은 6배체로 인한 게놈의 복잡성 및 크기뿐만 아니라 밀 형질전환 시스템의 제한성 역시 관련된다 (Choi et al. 2018).

대부분 식물 조직배양에 영향을 미치는 요인은 캘러스를 유도할 조직(explant) 부위(Vasil 1994) 및 유전자형(Hess and Carman 1998, Alikina et al. 2016), 캘러스 및 재분화율 배지 조성(Mathias and Simpson 1986), explant를 얻을 식물의 스트레스 상태 여부(Carman et al. 1998, Dodig et al. 2008, Mitić

et al. 2009) 등이 해당된다. 다른 작물과 마찬가지로, 밀의 조직배양 역시 유전자형과 explant의 종류 및 상태가 조직배양 효율에 큰 영향을 미친다(Ganeshan et al. 2006, Khan et al. 2015). 다양한 연구자들에 의해 조직배양의 배지 조성 및 배양 환경 등에 관한 연구가 진행되었지만, 불행하게도 국내 품종에 관한 연구는 없다(Mamrutha et al. 2014, Choi et al. 2015, Jones 2015).

일반적으로 밀은 연구자 사이에서 형질전환이 어렵다고 여겨지고 있다. 유전적 요인부터 재배환경까지 다양한 이유가 있겠으나 가장 큰 이유는 캘러스로부터 재분화가 잘 형성되지 않는 점이다. 질 좋은 배발생 캘러스 유도율이 높은 재분화율을 보이기 때문에 질 좋은 캘러스를 유도하기 위한 explant 선정이 중요하다(Mitić et al. 2006). 가장 좋은 explant는 미성숙배(immature embryo)로 알려져 있다. 그러나 미성숙배를 채취할 밀(donor plant)을 스트레스 없이 건강히, 그리고 연중으로 미성숙배를

얻기 위한 시간과 노력이 너무 크다(Repellin et al. 2001). 이러한 문제를 해결하기 위한 밀 조직배양 연구자들의 노력도 끊임없이 진행되고 있다. 대량으로 수확한 밀 성숙종자의 성숙배를 활용하는 방안(Rahman et al. 2008)과 어린 잎조직을 활용하는 방안(Ahuja et al. 1982, Chung & Khurana 2003), 미성숙 화기(immature inflorescences)를 통한 질 좋은 캘러스 유도(Ozias-Akins and Vasil 1982, Karesa et al. 2004, Kavas 2008) 등이 모색된 바 있으나, 조직배양 효율이 높지 않거나 미성숙배를 활용할 때와 마찬가지로 질 좋은 explant를 얻는 과정의 문제점이 존재하였다.

위에서 언급한 밀 조직배양의 문제점과 아울러, 최근 기후변화로 출수기 및 개화기에 기온 변화가 발생하고 있다. 이러한 변화에 대응하기 위하여 다양한 환경 조건에서 생산된 미성숙배의 조직배양 효율에 관한 연구가 진행되고 있다(Marchnska et al. 1999, Kavas et al. 2008, Benderradji et al. 2012, Wang et al. 2014). 본 연구에서도 변화하는 기상에 따른 국내 밀 품종의 적정 미성숙배 채취 시기를 알아보기 위하여 비가림 및 무가온 비닐하우스에서 국내 밀 품종의 미성숙배를 이용한 조직배양 효율을 분석하였다. 본 연구에서 사용된 밀 품종은 금강, 백강, 조품, 아리흑을 사용하였다. 국내 밀 품종 중 가장 대표적인 금강은 중강력분용으로 육성되어 백립계로써 국내에 가장 많이 보급되었다. 또한 백강은 백립계이면서 강력분용으로 육성되었으며 최근 빵용밀로 보급되고 있다. 조품은 적립계이면서 국내 품종 중 가장 빠르게 출수하여 꽃대가 올라오는 품종으로 중력분용으로 육성되었지만 현재 보급되지 않는다. 아리흑은 국내 유일한 유색밀 품종으로써 기능성 통밀 품종으로 개발되어 통상으로 계약재배되어 보급되고 있다. 이 대표적 특성을 지닌 4 개 품종과 밀 형질전환이 잘 되는 것으로 알려진 Bobwhite와의 조직배양 효율을 분석함으로써, 앞으로 국산밀의 정밀육종을 위한 필수적인 밀 형질전환이 더욱 안정적으로 수행될 것이라 여겨진다.

재료 및 방법

공시 재료 및 미성숙배 생산

국산 밀 품종은 국립식량과학원 밀연구팀에서 2019년 증식한 금강, 조품, 백강, 아리흑의 기본식물을 이용하였고, 밀 형질전환의 모델 품종인 Bobwhite의 SH98-26 계통을 활용하였다(Choi et al. 2004). 각 종자는 젖은 filter paper가 놓여있는 페트리디쉬에 치상하여 20°C 인큐베이터에서 5일간 두어 발아 및 제1본엽의 생장을 유도하였다. 출수 및 개화를 돕기 위하여 발아된 종자는 냉장고(4°C, 암실)에 2주간 두어 과성을 소거하였다.

원예상토를 담은 와그너포트에 과성을 소거한 어린 밀 싹을 이식하여 비가림 및 무가온 비닐하우스에서 재배하였다(Fig. 1A). 비닐하우스는 매일 오전 9시에 개방하였으며, 오후 5시에 폐쇄하였다. 이삭의 절반가량이 개화된 시점을 개화기로 판단하여 라벨 꼬리표를 달아 구분하였으며, 개화 후 12일 또는 13일에 미성숙배 직경 크기가 1 mm인 이삭을 잘라 미성숙배 채취에 이용하였다(Fig. 1B). 수확한 이삭은 2% 치아염소산 나트륨에 20분간 소독한 후 멸균수에서 3차례 세척한 다음 멸균 상태를 유지하며 미숙배를 채취하였다(Fig. 1C).

캘러스 유도, 재분화 유도 및 재분화를 조사

밀 조직배양은 Fennell et al. (1996)의 방법을 기초로 하여 수행하였다. 채취한 미숙배는 배반(scutellum)이 위가 되도록

Fig. 1. Schematic diagram of wheat tissue culture process. The wheat plants growing in the rain-covered and unheated green house (A). The spikes of wheat with name-tag marked flowering date (B). Rescue of immature embryos from 12~13days old kernels after flowering (C). The embryos were put on the MSE3 medium as scutellum side up. The picture of callus induced on MSE3 medium for 10 days (D). Calli induced on MS2% medium for 2 weeks (E). Plantlets growing on MS2% medium in Magenta™ box (F).

캘러스 유도 배지(MS 기본배지, 2.5 mg/L 2,4-D, 60 g/L sucrose, 0.15 g/L L-asparagine, 3 g/L phytagel)에 치상 후 캘러스 유도상 (24°C±1°C, 암실)에서 2주 간격으로 계대배양을 통해 약 30일간 캘러스를 유도하였다(Fig. 1D).

유도된 캘러스 덩어리는 재분화 배지(MS 기본배지, 20 g/L sucrose, 3 g/L phytagel)로 옮기어 24°C (±1°C), 광(14 hr 광/10hr 암) 조건에서 재분화를 유도하였다. 2주 간격으로 계대 배양 하여 6주간 수행하였다(Fig. 1E). 2주 간격으로 3차례 계대 배양 후 미성숙배로부터 발생한 캘러스에서 크기가 0.5 mm 이상 shoot이 발생한 캘러스 수를 조사하여 치상한 미성숙배 당 재분화된 캘러스 비율로 조사하였다. 아울러 재분화된 캘러스 에서 shoot의 개수를 조사하여 재분화된 캘러스 당 plantlet 형성 율로 조사하였다(Fig. 1F).

통계분석

유의성 검정은 시험구당 100개 이상의 미성숙배로부터 얻은 캘러스의 재분화 및 plantlet 발생율을 조사하였으며 Student's *t*-test 분석을 통해 유의성을 판별하였다.

결과 및 고찰

봄 파종 시기에 따른 품종별 개화시기 변화

다양한 밀 계통의 조직배양 효율을 여러해 동안 분석한 Mitic et al. (2009)의 결과에 따르면, 절간신장기와 출수기 기간에 일시적 고온을 겪은 밀 식물체로부터 얻은 미성숙배의 조직배양 효율이 대조구에 비해 50% 가량 낮아짐 확인하였다. 이렇듯 미성숙배를 채취하기 위한 공여식물(donor plant)의 재배 환경이 조직배양에 미치는 영향이 크다. 본 연구에서는 국내 대표 밀 품종별 미성숙배 최적 채취시기를 알아보고자 파종시기를 달리 하여 밀 품종별 미성숙배 채취시기에 변화를 주었다. 국산밀 품종 4 종류와 Bobwhite 품종을 춘화처리 후 2월부터 3월까지 1주일 간격으로 파종하였다(Fig. 1A). 2월까지의 최저기온이 영하로 떨어지는 경우가 있어서, 야간에는 무가온 비닐하우스의 모든 창구를 닫아 급격한 기온 하강을 막았으며, 오전 일과 시작 과 동시에 비닐하우스를 열어 외부와 기온을 동일하게 하였다. 바깥 외기와 무가온 비닐하우스내의 낮기온 최고온도 차이는 없었 으며 최저온도가 영하의 온도로 내려간 경우는 없었다(data not shown). 개화된 모든 이삭에 꼬리표를 달아 개화된 날짜를 표기하 였다(Fig. 1B). 품종 및 파종 시기별 40% 이상 꽃이 핀 시기를 개화기로 정하고 개화시기를 비교 하였다(Table 1, Fig. 2A).

2월 첫주에 파종하였을 때 파성이 II로 유사한 조품, 금강, 백강은 5월 3일에서 2일 내로 대부분 개화하였다(Cha et al.

Table 1. Change of flowering date by different sowing time for five wheat cultivars.

Sowing date (m/dd)	Flowering date (m/dd)				
	Bobwhite	Keumkang	Baekgang	Ariheuk	Jopum
2/06	5/10	5/04	5/03	5/22	5/04
2/13	5/12	5/05	5/05	5/24	5/05
2/19	5/15	5/08	5/06	5/27	5/06
2/26	5/17	5/13	5/08	6/01	5/08
3/04	5/21	5/17	5/11	6/01	5/11
3/11	5/24	5/24	5/14	n.d.	5/15
3/17	5/26	5/25	5/19	n.d.	5/18
3/23	5/29	5/25	5/27	n.d.	5/22
3/27	6/01	5/25	5/29	n.d.	5/26

Fig. 2. Graphs (A) and (B) showing the periods from sowing dates to flowering dates for five wheat cultivar. Flowering times from more than 10 spikes were estimated. Error bars denote ±SE.

2020). 파성이 III인 아리흑 경우는 5월 22일로 개화기간이 길었으며, Bobwhite는 5월 10일 이전에 개화되어 파성이 II인 국내품종과 유사한 파성을 보일 것으로 판단되었다. 이후 모든 품종에서 1주일 간격으로 파종함에 따라 개화시기도 일정한 간격으로 늦어지는 패턴을 보였다. 다만 금강의 경우는 3월 11일 파종한 경우까지는 다른 품종에 비해 파종 개화시기까지 걸리는 시간이 더 길어지는 경향을 보였다(Fig. 2A, B). 3월 11일 이후부터 금강은 5월 24 또는 25일에 동일하게 개화하여 조품과는 차이를 보였다. 백강의 경우는 3월 23일과 3월 27일 파종한 경우에 개화되는 기간 차이가 많이 좁혀진 것으로 보였다. Fig. 2B에서 보는 바와 같이 아리흑을 제외한 모든 국산밀 품종에서, 춘화처리 기간을 제외한 파종한 날로부터 개화까지 필요한 기간은 최소 60일 임을 확인할 수 있었다. 아리흑의 경우는 파종기부터 개화기까지 가장 긴 기간이 필요했으며 2월 26일 이후 파종한 경우부터는 모두 6월 1일 개화를 하는 것으로 나타났다. 하지만 3월 11일에 파종한 경우는 아예 출수를 하지 않아서 개화된 이삭을 볼 수 없었다(data not shown). Bobwhite와 조품은 파종 시기에 따라 일정한 간격으로 개화기간이 단축되는 양상을 보였다(Fig.

2B). 본 결과를 통해 각 품종별 미숙배 채취시기를 예측할 수 있을 것으로 판단한다.

품종별 미숙배 채취 시기에 따른 조직배양 효율

미성숙배는 개화 후 12~13된 이삭으로부터 채취하여 캘러스 유도에 사용하였다. 캘러스 형성은 모든 파종 시기 및 품종에서 100% 가깝도록 차이 없이 생성되었다(data not shown). 배발생 캘러스(embryogenic callus)와 비배발생 캘러스(rooty callus)는 숙달된 연구자의 외관검사로 구분하기도 하지만, 정밀한 분석을 위해서는 외관검사만으로는 구분하기가 어렵다. 따라서 본 연구에서 샘플간 조직배양 효율은 재분화 과정에서 shoot이 발생하는 정도(캘러스 당 재분화를 및 plantlet 발생 정도)로 대체하였다.

재분화와 plantlet 발생율간에는 높은 상관관계가 있었으며(data not shown), 재분화의 경우 품종 및 파종 시기별(개화 시기별) 차이가 크게 발생하는 반면, plantlet 발생 정도의 편차는 크지 않았다. Fig. 3A에서 보는 바와 같이 모든 기간에 걸친 품종별 재분화율을 분석한 결과 조직배양 및 형질전환 효율이 가장 좋은 것으로 알려진 Bobwhite의 경우 50% 정도의 재분화

Fig. 3. Regeneration (A, B) and plantlet induction (C, D) rates of callus induced from immature embryos of five cultivars were presented as average during whole period (A, C) and as by sowing dates (B, D). Error bars denote $\pm$ SE. Significant differences using Student's t-test: **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

효율을 보였으며, 한개의 미성숙배로부터 발생한 켈러스 덩이에서 평균 2개 가까이 밀 개체(plantlet)가 발생하였다(Fig. 3C). 국내 밀 품종의 경우 아리흑이 Bobwhite 수준으로 평균 재분화를 및 plantlet 발생을 보여, 가장 우수한 조직배양 효율을 보였으며, 그 다음이 백강밀(재분화 32%, plantlet 1.7)과 금강(재분화 21%, plantlet 1.5), 조품(재분화 13%, plantlet 1.5)의 순으로 나타났다. 전 기간에 걸친 품종별 재분화율 및 plantlet 발생을 분석한 결과이기 때문에 데이터 내에서 편차가 매우 컸다. 따라서 Student's *t*-test로 유의성 검증을 한 결과, 금강과 조품은 Bobwhite와 유의성이 있었으며, 백강과 아리흑은 Bobwhite의 재분화율 및 plantlet 발생율과 유의성이 없는 것으로 나타났다.

하지만 Fig. 3B 및 3D에서 보듯이 품종별 미성숙배 채취 시기별 조직배양 효율의 차이가 컸다. Bobwhite의 경우는 2월초에서 3월초까지 파종하여 얻은 미성숙배로부터 발생한 켈러스는 재분화율이 전체 기간 평균값보다 높은 60% 이상을 보였으며, 켈러스 당 2개체 이상의 plantlet을 얻을 수 있었다. 하지만 3월 중순에 파종하여 얻은 미성숙배에서는 20% 중반의 재분화율을 보였으며 켈러스당 plantlet 발생도 2개체를 밑돌았다. 국내 품종 중 재분화 효율이 가장 좋았던 아리흑 품종은 2월 말에 파종한 경우 재분화율이 60% 정도를 보였으며 plantlet 발생도 Bobwhite 수준으로 2개체를 유지하였으나, 3월 초에 파종한 경우 재분화 및 plantlet 발생이 낮아지고, 또 그 이후 파종한 경우는 출수가 되지 않아 더 이상 데이터를 생산할 수 없었다. 백강의 경우는 2월에 파종 시 낮은 재분화율 및 plantlet 발생을 보이다가 3월 초에 파종한 경우에 가장 높은 재분화율(약 60%)을 보였으며 3월 중순까지 높은 수준을 유지하다가 감소하였다. 금강의 경우는 2월 중순에 파종한 경우 재분화율이 40% 이상을 보이는 높은 효율을 보였으나, 나머지 기간에서는 20% 수준으로 낮은 재분화 효율을 보였으며, 전 기간에 걸쳐 plantlet 발생도 상대적으로 낮은 1.5개체 수준이었다. 조품의 경우는 봄파종에 대표적 품종으로 출수도 잘 되고 춘화처리도 필요하지 않는 장점이 있지만, 2월과 3월의 전 기간에 걸친 조직배양 효율(재분화율 20% 미만, plantlet 발생율 1.5개체 수준)은 가장 낮은 것으로 나타났다. Fig. 4는 품종별 대표 파종 시기의 재분화 상태를 보여주고 있다. Bobwhite의 경우는 전 기간 높은 재분화율을 보이고 plantlet도 많으며 shoot의 자라는 활력도 좋아 보였다. 특히 2월에 파종한 경우가 전체 재분화된 모든 샘플 중에서 가장 우수하게 보였다. 다음으로는 아리흑 품종으로 3월 5일까지 파종한 샘플에서 Bobwhite와 유사한 재분화율 및 plantlet 형성을 보였으나 3월 초 파종까지만 미성숙배를 얻을 수 있는

Fig. 4. Typical calli regenerated from five wheat cultivars. These pictures were taken on six weeks after calli were transferred to regeneration medium and condition.

단점이 있었다. 다음으로는 3월 5일에 파종한 백강 품종에서 높은 재분화율과 plantlet 발생율을 보였다. 하지만 다른 기간에는 효율이 낮게 나타났다. 금강과 조품의 경우 대부분에서 재분화율이 낮고 plantlet 발생 정도도 떨어지는 것으로 보였다. 켈러스에서는 녹점(green tissue)이 발생하여 많은 shoot이 기대되었으나, 뿌리만 발생하는 비배발생 켈러스 임이 확인되었다.

적 요

조직배양 효율, 즉 재분화율은 밀 형질전환을 위한 가장 중요한 요인이다. 가장 효율이 좋은 밀 조직배양의 재료로는 다른 단작엽 작물과 마찬가지로 미성숙배가 가장 좋다. 하지만 안정적 미성숙배 생산은 다양한 스트레스 요인이 작용하는 포장에서는 불가하다. 본 연구에서는 비가림 비닐하우스에서 국내 주요 밀 품종을 대상으로 봄 파종 시기를 달리했을 때 개화되는 시기별 미숙배를 채취하여 재분화율 및 plantlet 발생율을 분석한 결과 2020년 2월에 전기간에 파종한 아리흑 품종의 미숙배를 활용한 재분화율 및 plantlet 발생율이 높았으며, 형질전환 효율이 우수한 Bobwhite 품종과 유사한 조직배양 효율을 확인하였다. 백강

밀의 경우 3월 초에서 중순까지 파종한 경우에만 높은 조직배양 효율을 나타냈다. 금강은 2월 중하순에 파종하여 얻은 미성숙배에서만 어느정도 조직배양 효율을 보였으며, 조품은 실험에 이용한 전 기간(2월 및 3월 파종)에 걸쳐 낮은 조직배양 효율을 보였다. 본 연구결과가 국산밀 품종의 형질전환 효율을 높이는 데 일조할 것으로 기대한다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 유전자 교정 기술을 이용한 불량환경 극복 국내 밀 소재 개발, 세부과제번호: PJ014823022020)에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Ahuha PS, Pental D, Cocking EC. 1982. Plant regeneration from leaf base callus and cell suspension of *Triticum aestivum*. Z. Pflanzenzuecht 89: 139-144.
- Alikina O, Chernobrovkina M, Dolgov S, Miroshinichenko D. 2016. Tissue culture efficiency of wheat species with different genomic formulas. Crop Breed Applie Biotechnol 16: 307-314.
- Carman JG, Jefferson ME, Campbell WF. 1988. Induction of embryogenic *Triticum aestivum* L. calli. II. Quantification of organic addenda and other culture variable effects. Plant Cell Tissue Organ Cult 12: 97-110.
- Cha JK, Lee JH, Lee SM, Ko JM, Shin D. 2020. Heading date and growth character of Korean wheat cultivars by controlling photoperiod for rapid generation advancement. Korean J Breed Sci 52: 20-24.
- Choi C, Yun C, Hwang CH. 2004. The transformation of a barley cultivar, "Saechalssalbori" using particle bombardment. Korean J Breed Sci 36: 357-364.
- Choi C, Hwang CH. 2015. The barley lipid transfer protein, BLT101, enhances cold tolerance in wheat under cold stress. Plant Biotechnol Rep 9: 197-207.
- Choi C, Yoon YM, Son JH, Cho SW, Kang CS. 2018. Current status and prospect of wheat functional genomics using next generation sequencing. Korean J Breed Sci 50: 364-377.
- Chugh A, Khurana P. 2003. Regeneration via somatic embryogenesis from leaf basal. Plant Cell Tissue Organ Cult 74: 151-161.
- Dodig D, Zoric M, Mitic N, Nikolic R, Surlan-Momirovic G. 2008. Tissue culture and agronomic traits relationship in wheat. Plant Cell Tissue Organ Cult 95: 107-114.
- Fennell S, Boborova N, Ginkel MV, Crossa J, Hoisington D. 1996. Plant regeneration from immature embryos of 48 elite CIMMYT bread wheats. Theor Appl Gen 92: 163-169.
- Ganeshan S, Chodaparambil SV, Baga M, Fowler DB, Huel P, Rosnagel B, Chibber RN. 2006. In vitro regeneration of cereals based on multiple shoot induction from mature embryos in response to thidiazuron. Plant Cell Tissue Organ Cult 86: 63-73.
- Hess JR, Carman JG. 1998. Embryogenic competence of immature wheat embryos: genotype, donor plant environment, and endogenous hormone levels. Crop Sci 38: 249-253.
- Kavas M, Öktem HA, Yücel M. 2008. Factors affecting plant regeneration from immature inflorescence of two winter wheat cultivars. Biol Plant 52: 621-626.
- Kereša S, Barić M, Šarčević H, Marchetti S. 2004. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos and immature inflorescences of eight Croatian winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) Bodenkultur 54: 155-161.
- Khan UW, Ahmed R, Shahzadi I, Shah MM. 2015. Some important factors influencing tissue culture response in wheat. Sarhad J Agric 31: 199-209.
- Mamrutha HM, Kumar R, Venkatesh K, Sharma P, Kumar R, Tiwari V, Sharma I. 2014. Genetic transformation of wheat-Present status and future potential. J Wheat Res 6: 107-119.
- Mathias RJ, Simpson ES. 1986. The interaction of genotype and culture medium on tissue culture response of wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell) callus. Plant Cell Tissue Organ Cult 7: 31-37.
- Mitić N, Dodig D, Nikolić R, Ninkovic S, Vinterhalter D, Vinterhalter B. 2009. Effects of donor plant environmental conditions on immature embryo cultures derived from world-wide origin wheat genotypes. Russ J Plant Physiol 56: 540-545.
- Mitić N, Dodig D, Nikolić R. 2006. Variability of in vitro culture response in wheat genotypes, genotype and environmental effects. Genetika 38: 183-192.
- Ozias-Akins P, Vasil I. 1982. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L. (wheat): Evidence for somatic embryogenesis. Protoplasma 110: 95-105.

21. Rahman MM, Shamsuddin AKM, Asad U. 2008. In vitro regeneration from mature embryo in spring wheat. *Int J Sustain Crop Prod* 3: 76-80.
22. Repellin A, Baga M, Jauhar PP, Chibbar RN. 2001. Genetic enrichment of cereal crops via alien gene transfer: new challenges. Inorganic nutrient manipulation in the induction of embryogenic callus from immature embryos of wheat. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 6: 159-183.
23. Vasil IK. 1994. Molecular improvement of cereals. *Plant Mol Biol* 25: 925-937.