

Rozmnażanie *Platanus* × *acerifolia* Willd. i *Salix alba* L. cv. 'Tristis' metodą kultur tkankowych in vitro

MARIA WITOMSKA i ADAM KRZEWSKI

Instytut Produkcji Ogrodniczej, Zakład Roślin Ozdobnych, SGGW — AR
w Warszawie

(Przyjęto dn. 12.03.1980)

M. Witomska, A. Krzewski (*Institute of Horticultural Production,
Department of Ornamental Plants, Warsaw Agricultural University, Nowo-
ursynowska 166, 02-975 Warszawa, Poland*) Acta Agrobotanica 34 (2): 239-251,
1982

Reproduction of Platanus × *acerifolia* Willd. and *Salix alba* L. cv. 'Tristis'
by tissue culture in vitro

Abstract

The experiments were performed to establish the conditions of *Platanus* × *acerifolia* Willd. and *Salix alba* L. cv. 'Tristis' reproduction by tissue culture. Two experiments were run. Leaf buds of *Platanus* and inflorescence buds of *Salix* were used. Growth of callus from *Platanus* and *Salix* in dependence on the concentration of growth substances (BA and NAA) and light and darkness conditions were compared. Rooted explants of *Salix alba* L. cv. 'Tristis' were obtained. The best results were obtained with *Platanus* × *acerifolia* in which rhizogenesis of amorphic callus occurred after two months of the experiment. Darkness was not a necessary condition for root formation. After three months of the experiment completely developed *Platanus* × *acerifolia* plants were obtained composed of a foliated shoots and a bundle of roots. They could be planted out on a sterile permanent substrate.

WSTĘP

Przy określaniu warunków wzrostu kalusa drzew i różnicowania z niego organów in vitro należy uwzględnić specyficzne potrzeby badanych gatunków i odmian, np.: Brown i Sommer (1975) podali skład 22 pożywek dla wzrostu i organogenezy kalusa u *Coniferae*. W badaniach nad kompozycją pożywek uwzględnia się między innymi takie zjawisko, jak brązowienie pożywki spowodowane sekrecją utlenionych związków fenolowych. Niweluje się je dodając PVP (poliwinylpiperolidon) i witaminę C (Walkey, 1972; Brown i Lawrence, 1968). Substancje wzrostowe z grupy auksyn i cytokinin dodaje się do pożywek

w zakresie od 0.01 do 25 mg l⁻¹, zależnie od rodzaju eksplantatu oraz zamierzonego typu regeneracji.

Ważnym czynnikiem, oprócz składu chemicznego pożywek, jest światło. Inicjacja kalusa roślin drzewiastych, przeznaczonego do organogenezy, powinna przebiegać w ciemności (Winton, 1972; Winton i Mathes, 1973; Konar, 1974). Reakcja eksplantatów na światło jest zróżnicowana i specyficzna. Organogenezę kalusa *Pseudotsuga menziesii* otrzymano na świetle, po uprzednim przetrzymaniu eksplantatów w ciemności przez jeden tydzień (Winton i Verhagen, 1977). Natomiast z kalusa *Fraxinus* sp. wyrosły pędy po ośmiu tygodniach całkowitego zaciemnienia, a korzenie dopiero po wyniesieniu obiektów na działanie światła w cyklu 16 godzin na dobę (Winton, 1971). W przypadku kultury kalusa *Pseudotsuga menziesii* i u kilku gatunków *Pinus* sp., organogeneza zarówno pędów, jak i korzeni nastąpiła przy piętnastogodzinnym dniu (Sommer, 1975; Brown i Sommer, 1977).

Celem niniejszej pracy było ustalenie warunków rozmnażania in vitro *Platanus* × *acerifolia* Willd. i *Salix alba* L. cv. 'Tristis'.

MATERIAŁ I METODY

Pąki liściowe *Platanus* × *acerifolia* Willd. i pąki kwiatostanowe *Salix alba* L. cv. 'Tristis' pobrano z roślin znadujących się na terenie parku SGGW-AR w Ursynowie.

Po obmyciu pąków w bieżącej wodzie, preparowano z nich merystemy pozbawione łusek okrywających. Na odkażenie chemiczne eksplantatów składało się płukanie w 70% etanolu, następnie kąpiel w 3% monochloraminie przez 30 minut. Bezpośrednio po odkażeniu, fragmenty roślin płukano pięciokrotnie wodą destylowaną autoklawowaną. Eksplantaty wyszczepiano do probówek na pożywkę Murashige — Skooga (1962) (M-S) zestaloną agarem.

Probówki przenoszono do pomieszczenia o temperaturze 25-30°C i wilgotności 80%. Co siedem dni przeprowadzano obserwacje zdrowotności eksplantatów, charakteru wzrostu, wielkości tkanki kalusowej, typu i intensywności różnicowania.

Doświadczenie 1 (tab. 1)

Pąki liściowe platana i pąki kwiatostanowe wierzby wyszczepiono na pożywkę bez 2,4-D natomiast z BA (1 mg l⁻¹). Do pożywki dodano witaminę C (0.1 mg l⁻¹). Połowę obiektów wyszczepionych na tej pożywce pozostawiono na świetle ciągłym, zaś drugą połowę w warunkach całkowitej ciemności. Po sześciu tygodniach od założenia doświadczenia

eksplantaty przeszczepiono na pożywki zawierające regulatory wzrostu w zakresie od 0.01 do 0.1 mg l⁻¹, zachowując podział na eksplantaty pozostawione w ciągłym oświetleniu lub w ciemności. Kolejnych transplantacji na identyczną pożywkę dokonano po dziesięciu i po szesnastu tygodniach doświadczenia.

Doświadczenie 2 (tab. 2)

Pąki liściowe platana wyszczepiono na zmodyfikowaną pożywkę M-S pozbawioną 2,4-D, zaś wzbogaconą witaminą C (0,1 mg l⁻¹). Uwzględniono cztery kombinacje, zależnie od stężenia BA i NAA. Początkowo wszystkie obiekty umieszczono w świetle ciągłym. Po czterech tygodniach doświadczenia dokonano transplantacji na identyczne pożywki, pozostawiając oświetlenie ciągle bez zmian. Po siedmiu tygodniach połowę eksplantatów z każdej kombinacji przeniesiono ze światła do ciemności. Po upływie następnych czterech tygodni (12 tygodni doświadczenia) obiekty ukorzenione w ciemności wyniesiono ponownie na światło.

WYNIKI

Doświadczenie 1 (tab. 1)

W czasie dwóch pierwszych miesięcy doświadczenia zaobserwowano rozwój pąków *Platanus acerifolia* Willd. oraz rozrastanie się tkanki kalusowej u wszystkich zdrowych obiektów platana. Na świetle rozwijające się listki, jak i tkanka kalusowa zieleniały i nabierały zdrowego wyglądu. W miarę upływu czasu starszy kalus brązowieł. Rozwinięte listki pokrywały się świeżą niezróżnicowaną tkanką kalusową w kolorze jasnozielonym (Fot. 1).

Dużo wolniej rozwijały się pąki platana w ciemności. Rozwinięte listki traciły zieloną barwę, a kalus u nasady pąków przybrał konsystencję wodnistej białej galarety. Pierwsze korzenie pojawiły się w kombinacjach 2A, 3B, 4B po dwóch miesiącach doświadczenia. Duża ilość świeżego, białego kalusa zapowiadała dalszą organogenezę. Po trzech miesiącach najlepiej ukorzeniły się obiekty trzymane w ciemności z kombinacji: BA — 0,1 mg l⁻¹, plus NAA — 0,01 mg l⁻¹ (3B) (Fot. 2) oraz BA — 0,01 mg l⁻¹, NAA 0,01 mg l⁻¹ (4B). Kolejne transplantacje powodowały zamieranie prawie wszystkich korzeni. Ponowna ryzogeneza następowała u bardziej żywotnych obiektów w ciągu dwóch tygodni po przeszczepieniu. Powstałe po pięciu miesiącach doświadczenia korzenie przybrały formę cienkich igiełek. Wiązki takich korzeni zanotowano w kombinacjach: 1A, 3A, 1B, 2B, 4B, przy czym kombinacja BA i NAA (po 0,1 mg l⁻¹) w ciemności (1B) okazała się najlepsza. W tych warun-

Tabela 1—Table 1

Wpływ różnych koncentracji substancji wzrostowych oraz czynnika świetlnego na regenerację kalusa i ukorzenie eksplantatów *Platanus*×*acerifolia* Willd. i *Salix alba* L. cv. 'Tristis' w ciągu czteromiesięcznej uprawy in vitro. Doświadczenie 1. (po 100 sztuk eksplantatów w każdym sposobie traktowania)

Influence of various growth substance concentrations and of the light factor on callus regeneration and rooting of *Platanus*×*acerifolia* Willd. and *Salix alba* L. cv. 'Tristis' in the course for four-month culture in vitro. Experiment 1 (100 explants in each combination)

Gatunek Species	Warunki światłowe Light conditions	Zainicjowany kalus w war. NAA 2 mg l ⁻¹ BA 1 mg l ⁻¹ , szt. Callus initiated under: NAA 2 mg l ⁻¹ BA 1 mg l ⁻¹ , explants	Nazwa kombinacji Treatment	Stężenie w Concentra- tion mg l ⁻¹		Liczba ukorze- nionych eks- plantatów w ciągu: No. of rooted explants in the course of:	
				BA	NAA	11	16
<i>Platanus</i> × <i>acerifolia</i>	światło light	87	1A	0,1	0,1	1	4
		87	2A	0,01	0,1	5	5
			3A	0,1	0,01	1	2
	ciemność darkness		4A	0,01	0,01	—	—
		96	1B	0,1	0,1	2	12
		96	2B	0,01	0,1	3	4
<i>Salix alba</i> cv. 'Tristis'	światło light		3B	0,1	0,01	5	5
			4B	0,01	0,01	9	9
		30	1C	0,1	0,1	—	—
	ciemność darkness	30	4C	0,01	0,01	2	—
		31	1D	0,1	0,1	—	—
		31	4D	0,01	0,01	2	2

kach korzenie z włóśnikami powstały nawet po upływie sześciu miesięcy od założenia doświadczenia.

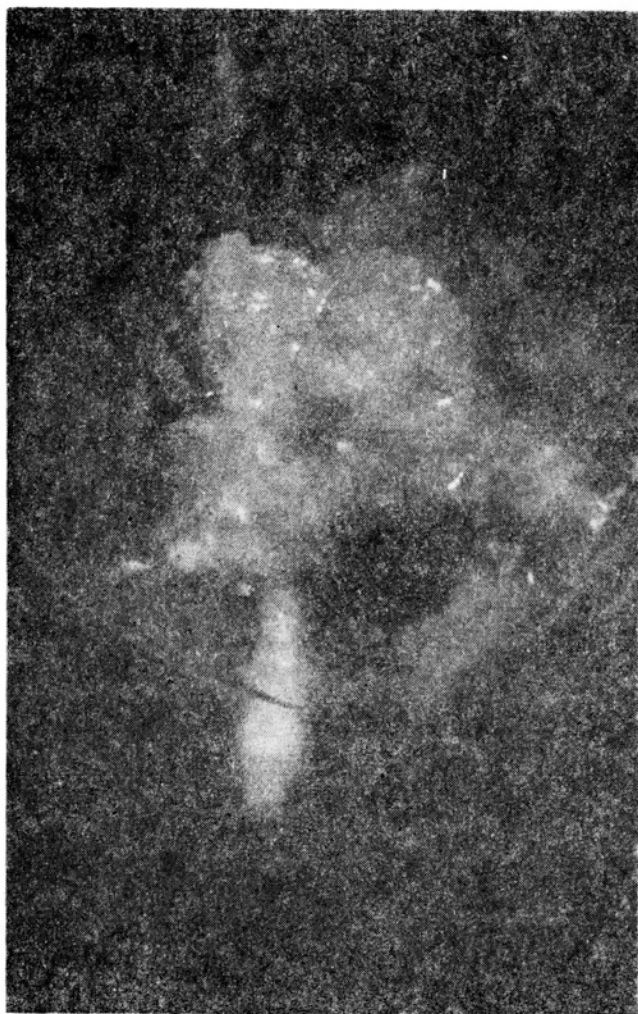
Salix alba L. cv. 'Tristis' badana jako drugi obiekt w tym doświadczeniu wykazała dużą podatność na zakażenia, wrażliwość na chloraminę oraz małą aktywność w tworzeniu tkanki kalusowej. U większości eksplantatów długie pąki kwiatostanowe zamierały ku dołowi. Jedynie w strefach tuż nad pożywką tkanka pęczniała, utrzymywała wigor i zieloną barwę. W drugim tygodniu uprawy u niewielu obiektów pojawiły się grudki kalusa. Eksplantaty wierzby wyglądały podobnie zarówno na



Fot. 1. Pąk *Platanus*×*acerifolia* Willd. w drugim miesiącu uprawy w warunkach oświetlenia stałego. Pow. 4×

Phot. 1. *Platanus*×*acerifolia* Willd. in the second month of culture under continuous light. ×4

światle, jak i w ciemności. Kalus przyrastał bardzo wolno. Korzenie pojawiły się w kombinacjach z BA i NAA (po $0,01 \text{ mg l}^{-1}$) w ciemności (4D) oraz BA i NAA (po $0,01 \text{ mg l}^{-1}$) na świetle (4C) po dwóch miesiącach doświadczenia, przy czym u dwóch obiektów z kombinacji 4D wyrosły korzenie o długości 4 cm (fot. 3). Uległy one zniszczeniu w trakcie dalszych przeszczepień. W dalszych etapach doświadczenia nowe korzenie wierzby nie wyrosły, nie zaobserwowano również organogenezy pędu.

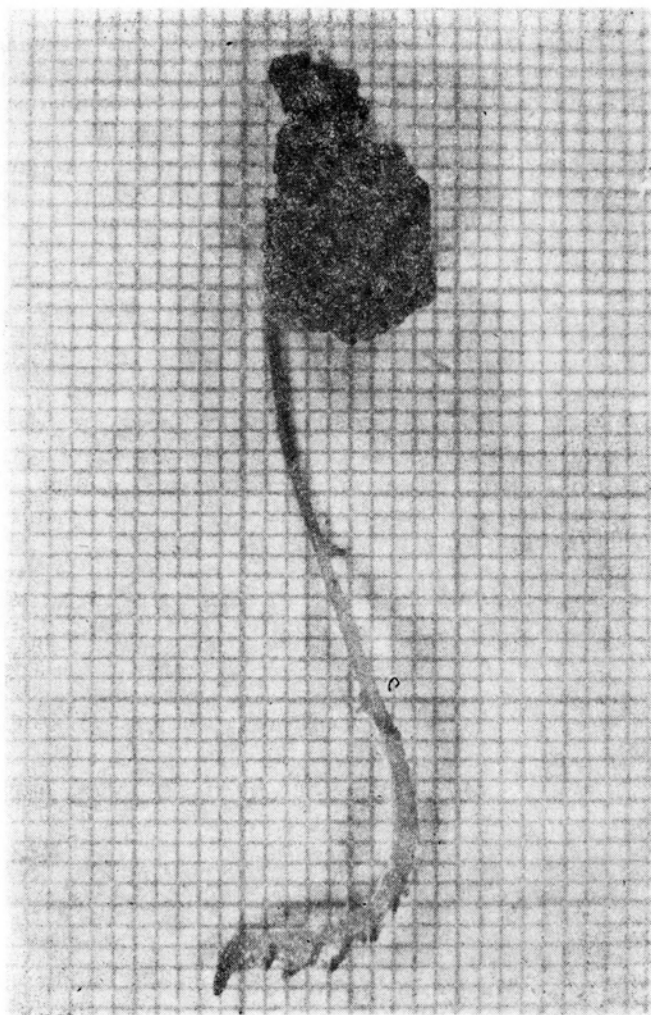


Fot. 2. Korzenie zregenerowane z kalusa *Platanus acerifolia* Willd. na pożywce z BA $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ i z NAA $0,01 \text{ mg l}^{-1}$ w czwartym miesiącu doświadczenia w ciemności (kombinacja 3B). Pow. $4\times$

Phot. 2. Roots regenerated from *Platanus acerifolia* Willd. callus on medium with BA $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ and NAA $0,01 \text{ mg l}^{-1}$ in the fourth month of the experiment in darkness (combination 3B). $\times 4$

Doświadczenie 2 (tab. 2)

Po pięciu tygodniach uzyskano rośliny składające się ze skróconego, ulistnionego pędu i z grudki jasnego kalusa w strefie bazalnej. Najbujniejszy rozwój liści i objętościowy przyrost kalusa zanotowano w kombinacji z BA i NAA po $0,1 \text{ mg l}^{-1}$. W kombinacji drugiej i trzeciej



Fot. 3. Ukorzeniony eksplantat *Salix alba* L. cv. 'Tristis' po 15 tygodniach uprawy w ciemności. Kombinacja z BA $0,01 \text{ mg l}^{-1}$ i z NAA $0,01 \text{ mg l}^{-1}$ (4D). Pow. $3\times$
Phot. 3. Rooted explant of *Salix alba* L. cv. 'Tristis' after 15 weeks of culture in darkness. Treatment with BA $0,01 \text{ mg l}^{-1}$ and NAA $0,01 \text{ mg l}^{-1}$ (4D). $\times 3$

rozwinęły się bujne liście, zaś kalus przyrastał znacznie wolniej niż w pierwszej. Obiekty z ostatniej kombinacji z BA i NAA w ilościach po $0,01 \text{ mg l}^{-1}$ odznaczały się po pięciu tygodniach doświadczenia najslabszym wzrostem i brakiem liści.

Po upływie jedenastu tygodni doświadczenia pojawiły się pierwsze korzenie. Formy ich były zróżnicowane w zależności od tego, czy rygo-geneza następowała na świetle, czy w ciemności. Obiekty trzymane na

Tabela 2—Table 2

Wpływ różnych koncentracji substancji wzrostowych na regenerację kalusa w warunkach oświetlenia ciągłego oraz na ukorzenie eksplantatów w warunkach światła i ciemności. Początkowa liczba eksplantatów w kombinacji: 80 sztuk.

Doświadczenie 2, *Platanus*×*acerifolia* Willd.

Influence of various growth substances concentrations on callus regeneration under conditions of continuous illumination and on explant rooting under conditions of light and darkness. Initial number of explants in treatment—80. Experiment 2,

Platanus×*acerifolia* Willd.

Stężenie w mg l ⁻¹		Zregenerowany kalus na świetle w ciągu 6 tyg. Callus regene- ration in light in the course of 6 weeks	Warunki świetlne od 7 tyg. Light conditions from 7th week	Nazwa kombinacji Treatment	Liczba ukorzenio- nych eksplan- tatów w doświadczeniu: No. of rooted explants in experiment	
BA	NAA				12 tyg. (weeks)	18 tyg. (weeks)
0,1	0,1	68	światło light	1D	1	4
			ciemność darkness	1N	6	1
0,01	0,1	69	światło light	2D	1	—
			ciemność darkness	2N	4	—
0,1	0,01	15	światło light	3D	2	3
			ciemność darkness	3N	5	—
0,01	0,01	4	światło light	4D	—	—
			ciemność darkness	4N	3	—

światło ciągłym wytworzyły korzenie długie i pojedynczo wyrastające z grudki kalusa, niezależnie od rozwijających się pędów. Tego typu organogenezę zaobserwowano w kombinacjach 1D, 2D, 3D (fot. 4). W kombinacji 4D eksplantaty najslabiej rosły i nie wykształciły korzeni.

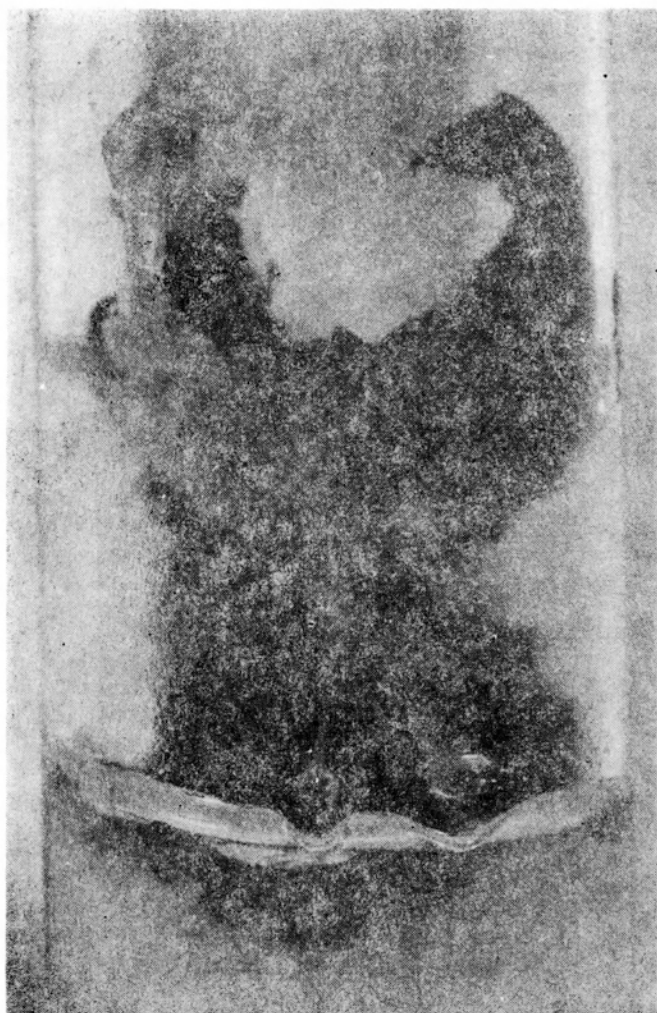
Odmienne zachowały się eksplantaty umieszczone w ciemności. Bez dostępu światła liście straciły barwę i zasychały. Kalus powstał delikatniejszy i mniej bujny. Nowe, wybijające pędy były etiolowane. Korzenie

zainicjowane w ciemności wyrastały z nasady pędów, niezależnie od kalusa (fot. 5). Takie korzenie powstały w kombinacjach 1N, 2N, 3N, 4N. Eksplantaty, które zdołały się ukorzenieć w ciągu trwającego 4 tygodnie zaciemnienia umieszczono ponownie na świetle. Uczyniono to w celu zregenerowania części pędowej u organizmów posiadających już korzenie. Był to najskuteczniejszy sposób uzyskania kompletnych roślin, składających się z ulistnionego pędu i korzeni wyrastających z nasady tego pędu.



Fot. 4. Eksplantat *Platanus*×*acerifolia* Willd. po trzech miesiącach uprawy na świetle. Korzeń wyrasta z grudki kalusa, niezależnie od pędu. Pożywka z BA 0,1 mg l⁻¹ i z NAA 0,1 mg l⁻¹. Pow. 4×

Phot. 4. *Platanus*×*acerifolia* Willd. explant after three months of culture under illumination. The root grows out of a callus lump independently of the shoot. Medium with BA 0,1 mg l⁻¹ and with NAA 0,1 mg l⁻¹. 4×



Fot. 5. Kompletna roślina *Platanus*×*acerifolia* Willd. po trzech miesiącach doświadczenia. Korzenie zainicjowane w ciemności wyrastają z nasady rozwiniętego pędu.

Pożywka z BA $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ i z NAA $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ (1N). Pow. $4\times$

Phot. 5. Complete *Platanus*×*acerifolia* Willd. plant after 3 months of experiment. The roots initiated in darkness grow out of the base of the developed shoot.

Medium with BA $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ and NAA $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ (1N). $\times 4$

Obiekty przeniesione z ciemności na światło, w porównaniu z odpowiadającymi im eksplantatami pozostającymi przez cały czas na świetle, odznaczały się większym wigorem, posiadały bardziej jednolity kalus i zdrowsze liście.

Eksplantaty trzymane przez cały czas na świetle wykształciły róż-

norodny, wielopostaciowy kalus. Obiekty te zatraciły wygląd rozwiniętych roślinek, gdyż starsze liście zasychały, a starsze korzenie zalała nieodróżnicowana tkanka.

DYSKUSJA

Obok egzogennych substancji wzrostowych czynnikiem, od którego zależy wzrost i różnicowanie kalusa jest światło. W ciemności powstaje jasny, delikatny kalus, podatny na różnicowanie. Ma to znaczenie szczególnie w doświadczeniach nad wielomiesięcznymi kulturami tkankowymi. Kalus inicjowany w świetle szybko zabarwia się na zielono, łatwo traci wigor i brązowieje. Podobne spostrzeżenia poczynili Winton i Mathes (1973), Winton (1972) i Wolter i Skoog (1966). Światło ma wyraźnie dodatni wpływ na przebieg doświadczeń z pąkami izolowanymi *in vitro*. Fakt ten wykorzystano w niniejszej pracy, w której ukorzenione eksplantaty platana zregenerowały część pędową po trwającym jeden miesiąc okresie zaciemnienia. Jest to zgodne z informacją Dutchera i Powella (1972), którzy stwierdzili, że pąki *Malus domestica* nie tracą zdolności do ponownego wybicia po 10 miesiącach uprawy w ciemności. Wyższe natężenie światła przyspiesza rozwój części pędowej, przy czym zaleca się stosowanie dnia 15-16 godzinowego (Walkey, 1972; Navarro i in., 1975; Jones i in., 1977).

W niniejszym doświadczeniu ciemność nie była konieczna dla ukorzenienia. Ryzogeneza u *Salix alba* L. cv. 'Tristis' i u *Platanus* × *acerifolia* Willd. zachodziła zarówno w warunkach oświetlenia ciągłego, jak i w ciemności. Najbardziej prawidłowo uformowane korzenie z włóśnikami uzyskano po czterech tygodniach zaciemnienia. Podobne wyniki uzyskał Nanda i in. (1968), ukorzeniając eksplantaty *Populus nigra*. Ustalono wówczas, że dla ryzogenezy niezbędne jest minimum 3-dniowe zaciemnienie. Przy wzrastającym okresie zaciemnienia zwiększyła się liczba i łączna długość korzeni. Podobnie w doświadczeniu Oliemana van der Meer i in., (1971) światło hamowało ukorzenienie eksplantatów różanecznika, a ciemność stymulowała ryzogenezę. W sprzeczności z powyższymi są wyniki, jakie uzyskali Winton (1971) z jesionem (*Fraxinus* sp.) oraz Walkey (1972) i Jones i in. (1977) z jabłonią (*Malus domestica*). Otrzymali oni korzenie w warunkach oświetlenia ciągłego.

Opisane różnice w wynikach poszczególnych autorów jak i fakt, że w niniejszej pracy ryzogeneza powiodła się zarówno w świetle, jak i w ciemności można tłumaczyć różnym stężeniem endogennych regulatorów wzrostu u poszczególnych gatunków roślin oraz specyficzną podatnością różnych eksplantatów na zawarte w pożywkach egzogenne substancje wzrostowe. Nie bez znaczenia jest też pora roku i faza rozwojowa rośliny.

ny, z której pobierano eksplantaty, a także dobór specyficznych regulatorów z grupy auksyn i cytokinin.

Wpływ tych czynników na powodzenie uprawy roślin drzewiastych *in vitro* wymaga dalszych badań.

STRESZCZENIE

Celem eksperymentu było sprawdzenie czy można rozmnażać *Platanus* × *acerifolia* Willd. i *Salix alba* L. cv. 'Tristis' za pomocą kultur tkankowych. Założono dwa doświadczenia. Wykorzystano pąki liściowe platana i pąki kwiatostanowe wierzbby wypreparowane z łusek okrywających. Eksplantaty wyszczepiono na pożywkę stałą Murashige — Skooga, wzbogaconą witaminą C. Użyto regulatory wzrostu NAA i BA w ilościach od 0,01 do 2 mg l⁻¹ pożywki. Zastosowano kombinacje ze światłem i ciemnością, jako czynnikami badanymi. Otrzymano zakorzenie się u eksplantatów *Salix alba* L. cv. 'Tristis'. Najlepsze wyniki osiągnięto w przypadku *Platanus* × *acerifolia* Willd., gdzie nastąpiła ryzogeneza amorficznego kalusa po dwóch miesiącach doświadczenia. Wykazano, że ciemność nie jest warunkiem koniecznym do wytworzenia korzeni. Ustalono, że optymalne warunki sprzyjające ukorzenieniu grudki amorficznego kalusa platana, to ciemność i zawartość w pożywce BA w ilości 0,1 lub 0,01 mg l⁻¹ oraz NAA w ilości 0,01 mg l⁻¹ pożywki. Otrzymano całkowicie wykształcone rośliny *Platanus* × *acerifolia* Willd. składające się z ulistnionego pędu i wiązki korzeni.

LITERATURA

- Brown C., Lawrence H. L., 1968. Culture of pine callus on a defined medium. *Forest Sci.* 14: 62-64.
- Brown C., Sommer H. E., 1975. An atlas of gymnosperms cultured in vitro: 1924-1974. Georgia Forest Research Council.
- Brown C., Sommer H. E., 1977. Bud and root differentiation in conifer cultures. *Tappi* 60.
- Dutcher R. D., Powell L. E., 1972. Culture of apple shoots from buds in vitro. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97: 511-514.
- Jones O. P., Hopgood M. E., O'Farrel D., 1977. Propagation in vitro of M. 26 apple rootstocks. *J. Hort. Sci.* 52: 235-238.
- Konar R. N., 1974. In vitro studies on *Pinus*. I. Establishment and growth of callus. *Physiol. Plant* 32: 193-197.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nanda K. K., Purohit A. N., Mehrotra K., 1968. Effect of sucrose, auxins and gibberelic acid on rooting of stem segments of *Populus nigra* under varying light conditions. *Plant Cell Physiol.* 9: 735-743.
- Navarro L., Roistacher C. N., Murashige T., 1975. Improvement of shoot tip grafting in vitro for virus-free *Citrus*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100: 471-479.
- Olieman van der Meer A. W., Pierik R. L. M., Roest S., 1971. Effects of sugar, auxin and light on adventitious root formation in isolated stem explants of *Phaseolus* and *Rhododendron*. *Med. Fakulteit Landbouwet. Gent*, 36: 511-518.

- Sommer H. E., 1975. Differentiation of adventitious buds on Douglas-fir embryos in vitro. Proc. In. Plant. Propagators' Soc. 25: 125-127.
- Walkey D. G., 1972. Production of apple plantlets from auxillary bud meristems. Can. J. Plant Sci. 52: 1085-1087.
- Winton L. L., 1971. Tissue culture propagation of European Aspen. Forest Sci. 17: 348-350.
- Winton L. L., 1972. Callus and cell culture of Douglas-fir. Forest Sci. 18: 151-154.
- Winton L. L., Mathes M. S., 1973. Aspen Callus. [In:] Tissue Culture Methods and Applications. Academic Press, New York, 161-165.
- Winton L. L., Verhagen S. A., 1977. Shoots from Douglas-fir cultures Can. J. Bot. 55: 1246-1250.
- Wolter K. E., Skoog F., 1966. Nutritional requirements of *Fraxinus* callus cultures. Amer. J. Bot. 53: 263-269.