تولید کلون‌های عاری از ویروس ارقام نارنگی ساتسوما از تخمک‌های نابارور

رضا فتوحی قزوینی[۱]، یوسف حمیداوغلی[۱] و یونس ابراهیمی[۲]

چکیده

برای تهیه گیاهان عاری از بیماری ویروسی تریستزا، از ارقام نارنگی ساتسوما (ایشی کاوا، سوجی یاما و میوگاوا)، تخمک‌های نابارور از گیاهان مشکوک به بیماری، از باغ مهدشت ساری، روی چهار محیط غذایی مختلف کشت شد.

جنین‌زایی از بافت نوسلوس تخمک‌ها از دو رقم ایشی‌کاوا و سوجی یاما، روی محیط کشت MS به ترتیب برابر ۳۱٪ و ۲۵٪، و روی محیط کشت MT از رقم ایشی کاوا ۴۰/۵٪ بود. تخمک‌های بارور نشده رقم میوگاوا روی محیط های کشت به کار رفته جنین‌زایی نداشتند. نمو جنین‌های نوسلار ایشی کاوا و سوجی یاما روی محیط کشت $MT+GA_3+ME$ به ترتیب ۸۳٪ و ۹۵٪ بود. در محیط کشت $MT+GA_3+ADE+ME$، تمایز جنین‌ها، تولید برگ و تشکیل گیاهچه دیده شد. رشد گیاهچه‌ها از مرحله دو برگی، در شدت نور ۱۵۰۰ لوکس دو برابر رشد آن در شدت ۸۰۰ لوکس بود. با آزمون پیوند جوانه‌های ارقام سوجی‌یاما و ایشی‌کاوا روی نهال های حساس و عاری از ویروس کی لایم، علایمی دال بر آلودگی به بیماری تریستزا در گیاهان پیوندی مشاهده نگردید.

واژه‌های کلیدی: *بیماری تریستزا، نارنگی ساتسوما، تخمک‌های نابارور، جنین‌زایی، نوسلار*

مقدمه

یکی از مسائل مهم پرورش مرکبات ایران، آلوده بودن بسیاری از ارقام به بیماری‌های ویروسی است. برخی از ارقام زیرکشت، از بدو ورود به ایران (سال‌های ۱۳۰۹-۱۳۱۴) به ویروس آلوده بوده‌اند (۱). نارنگی ساتسوما[۳] و ارقام آن از قبیل ایشی کاوا[۴]، سوجی یاما[۵] و میوگاوا[۶] نیز حدود ۷۰ سال در ایران به صورت آلوده به بیماری خطرناک تریستزا باقی مانده است.

مقاومت نارنگی ساتسوما نسبت به بیماری تریستزا، و نیز پیوند این نارنگی روی پایه مقاوم نارنج سه برگ[۷] موجب گردید تا علایم بیماری به سادگی قابل تشخیص نباشد. اگر چه تهیه پایه بذری بدون ویروس میسر است، ولی چون نارنگی

۱. استادیار باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۲. پژوهشگر باغبانی، مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور

3. *Citrus unshiu* Marce (Satsuma)

4. Ishikawa 5. Sugiyama 6. Myogawa 7. *Poncirus trifoliata* L. Raf.

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1380.5.2.3.5]

ساتسوما دارای ارقام بی بذر است، اصلاح و تهیه گیاهان بدون ویروس با استفاده از بذر ممکن نیست.

با این حال، جنین‌زایی غیرجنسی با استفاده از فناوری کشت بافت، امکان تولید گیاهان بدون ویروس و شبیه پایه مادری را در مرکبات امکان پذیر می‌سازد (۱۸، ۱۹ و ۲۳). جنین‌زایی از بافت نوسلوس تخمک‌های نابارور در ارقام چند جنینی مرکبات در برخی از منابع گزارش شده است، اما هیچ گزارشی درباره جنین‌زایی مستقیم از دیگر بافت‌های مرکبات دیده نمی‌شود.

جنین‌زایی عموماً روی محیط کشت MT (۱۷) انجام می شود. شواهد نشان می دهد عواملی از قبیل ترکیبات آلی و نوع ماده گیاهی به کار رفته می‌تواند بر جنین‌زایی تأثیر بگذارد. عصاره جو(ME[1]) به میزان ۵۰۰ میلی گرم در لیتر، برای تحریک جنین‌زایی بافت نوسلوس در تعدادی از ارقام مرکبات مؤثر بوده است(۱۵). اکسین به طور جدی از جنین‌زایی جلوگیری می‌نماید، ولی ممانعت‌کننده‌های اکسین، جنین‌زایی را تسهیل می‌کنند (۳). مصرف هم‌زمان اکسین و سایتوکنین از جنین‌زایی جلوگیری می‌نماید. هم چنین، BA و کنیتین اگر چه جنین‌زایی را متوقف نمی‌کنند، ولی درصد تشکیل جنین را کاهش می‌دهند (۷ و ۸). در برخی از ارقام، استفاده از متیل آمینوپیورین و غلظت کم اسید جیبرلیک (GA_3) در تشکیل جنین مفید بوده، ولی غلظت زیادتر اسید جیبرلیک از جنین‌زایی جلوگیری می‌کند (۹ و ۲۲). قندها جنین‌زایی را آسان نموده، و گلیسرول به تنهایی، یا همراه با کازئین، آن را تحریک می‌نماید (۴ و ۵).

امکان جنین‌زایی از تخمک های تکامل نیافته میوه‌های نارس (۵)، تخمک‌های جدا شده از جوانه گل (۱۰)، تخمک‌های نابارور میوه‌های رسیده (۱۵)، و یا از بافت ناحیه هیپوکوتیل و طوقه گیاهچه‌هایی که توان چندجنینی دارند (۶)، گزارش شده است. با این حال، از کشت تخمک‌های تکامل نیافته ارقام فاقد توان چندجنینی، جنین‌های رویشی تولید نگردید (۱۵)، ولی از کشت بافت نوسلوس آنها جنین‌زایی گزارش شده است (۱۴).

بنا به گزارش‌های منتشر نشده مؤسسه تحقیقات مرکبات، امروزه تعدادی از درختان ارقام مختلف نارنگی ساتسوما در ایران مشکوک به بیماری تریستزا هستند. حساسیت بسیاری از ارقام تجارتی مرکبات به این بیماری، و احتمال گسترش آن در نقاط مختلف کشور به سبب استقبال کشاورزان از ارقام نارنگی ساتسوما، انگیزهٔ این پژوهش برای دست‌یابی به گیاهان بدون ویروس از ارقام تجارتی ایشی کاوا، میوگاوا و سوجی یاما بوده است. در این گزارش، با توجه به بی بذر بودن میوه (پارتنوکارپ)، از طریق کشت تخمک‌های نابارور، مواردی چون تعیین بهترین زمان برای جداسازی تخمک بارور نشده ارقام نارنگی ساتسوما، گزینش مناسب‌ترین محیط های کشت برای جوانه‌زنی تخمک و تکامل جنین‌ها، تعیین شرایط بهینهٔ رشد گیاهچه‌ها و سپس انتقال آن به گلدان، و چگونگی آزمون گیاهچه ها برای تأیید بدون ویروس بودن، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

میوه‌های نارس ۸ و ۱۶ هفته‌ای ارقام میوگاوا، سوجی یاما و ایشی کاوا از نارنگی ساتسوما که همگی مشکوک به آلودگی بیماری ویروسی بودند، از باغ مهدشت ساری متعلق به بنیاد مستضعفان تهیه گردید. برای جداسازی تخمک های نابارور، میوه‌های نارس به مدت ۲۰ دقیقه با محلول رقیق شده وایتکس تجارتی به غلظت ۲۰ درصد، در زیر هود استریل ضد عفونی و در دو نوبت با آب استریل شست‌شو داده شدند.

ترکیبات شیمیایی گوناگونی مانند نمک‌های معدنی، ویتامین‌ها، مواد رشد، عصاره جو، سوکروز، آگار و گلوتامین در محیط های کشت به کار رفت. محیط های کشت MS(۱۶)، MT(۱۷)، MT+ ۱mg/l GA_3، MT + ۱mg/l GA_3+ ۵۰۰ mg/l ME (۱۱) MT + ۱mg/l GA_3 + ۴۰mg/l ADE + ۵۰۰mg/l ME

1. Malt extract

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1380.5.2.3.5]

(۱۲) و MS + ۳mg/l NAA (۲۰)، با توجه به نوع کشت مواد گیاهی مورد استفاده قرار گرفت. اسیدیته محلول های غذایی در pH=۵/۷±۰/۱ تنظیم و سپس ۱۰ گرم آگار به آن اضافه شد، و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو گردید. تعداد ۶۰ عدد تخمک نابارور از میوه‌های ۸ و ۱۶ هفته‌ای نارنگی ارقام میوگاوا، سوجی یاما و ایشی‌کاوا در پتری دیش‌های ۹۰ میلی‌متری روی چهار محیط کشت MS، MT، MT+ME و MT+GA_3 در شرایط فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی، با شدت نور ۸۰۰ لوکس، در دمای ۱±۲۶ درجه سانتی‌گراد کشت شد.

درصد جوانه‌زنی تخمک‌ها مبنای ارزیابی برای انتخاب گردید. جنین‌های حاصل از رشد تخمک های نابارور، ده هفته پس از کاشت، در شرایط استریل به محیط کشت MT+GA_3+ME منتقل و برای دو ماه نگهداری شدند. پس از رشد بیشتر، جنین‌ها به محیط کشت MT+GA_3+ADE+ME انتقال و برای دو ماه دیگر در این محیط کشت نگهداری گردیدند. تا این مرحله، شرایط رشد برای همه ارقام یکسان بود. گیاهچه‌ها (در مرحله دوبرگی) به محیط کشت MS انتقال یافته و در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی، با دو تیمار شدت نوری ۸۰۰ و ۱۵۰۰ لوکس نگهداری گردیدند.

پس از هشت هفته گیاهچه های دارای ۵-۸ برگ به گلدان‌های ضد عفونی شده حاوی پیت ماس استریل منتقل شدند. پس از سه ماه، پیوندک‌های حاصل از نهال‌های تولید شده (۴ نهال سوجی یاما و ۱۶ نهال ایشی کاوا)، روی نهال‌های کی لایم، تهیه شده از مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور پیوند زده شد. علایم بیماری ویروسی تریستزا روی پایه‌های کی لایم، یک ماه پس از پیوند مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج و بحث

کشت تخمک‌های نابارور

جنین‌های رویشی حاصل از تخمک‌های نابارور نهال‌های نوسلار تولید می‌نمایند. این گونه نهال‌ها شبیه پایه مادری بوده و می‌توانند عاری از ویروس باشند. تخمک‌های جدا شده از میوه‌های با سن هشت هفته (شکل ۱)، ده هفته پس از کشت، روی هیچ یک از محیط های غذایی جوانه نزدند. در صورتی که جوانه‌زنی تخمک‌های جدا شده از میوه‌های ۱۶ هفته‌ای پس از ۱۰ هفته قابل ارزیابی بود (جدول ۱). امکان جوانه‌زنی (تولید جنین رویشی) از تخمک‌های میوه‌های ۱۶ هفته‌ای (میوه رسیده) با آنچه مور (۱۵) گزارش کرد، مطابقت داشت. هم‌چنین، در پرتقال واشنگتن ناول (۲) و پرتقال والنسیا (۶) نیز تخمک‌های حاصل از میوه بالغ جوانه زدند. درصد جوانه‌زنی هر یک از ارقام میوگاوا، سوجی یاما و ایشی کاوا روی محیط های کشت چهارگانه در جدول آورده شده است. همان گونه که در جدول مشاهده می‌شود، جوانه‌زنی دو رقم ایشی کاوا و سوجی یاما روی محیط کشت MS برابر ۳۱ و ۲۵ درصد، و میزان جوانه‌زنی تخمک‌های رقم ایشی کاوا روی محیط کشت MT برابر ۴۰/۵ درصد بوده است. تخمک‌های رقم سوجی یاما روی محیط MT جوانه‌زنی نداشتند. رقم میوگاوا با عدم جوانه زنی روی محیط‌های کشت مورد استفاده، وضعیت کاملاً متفاوتی را نسبت به دو رقم سوجی یاما و ایشی کاوا نشان داد. جوانه‌زنی همه ارقام روی محیط های کشت MT+ME و MT+GA_3 صفر بود. در حالی که جوانه‌زنی تخمک‌های برخی از ارقام مرکبات روی محیط کشت MT محتوی ME مثبت گزارش شده است (۱۵). محیط MT+ ۱۰ mg/l GA_3 نیز برای جوانه‌زنی مؤثر تشخیص داده شد (۱۰).

درصد جوانه‌زنی تخمک‌های نابارور حاصل از میوه‌های ۱۶ هفته‌ای هر یک از ارقام در محیط های کشت مورد استفاده، و تعداد جنین های رویشی حاصل از کشت تخمک های نابارور در ارقام مختلف متغیر بود. به طور میانگین از تخمک رقم ایشی کاوا ۳۵ عدد و از سوجی یاما ۲۸ عدد جنین رویشی شمارش گردید (شکل ۲). تعداد جنین‌های رویشی از هر تخمک در گزارشی دیگر بین ۲۵ تا ۴۰ عدد از هر تخمک پرتقال والنسیا و واشنگتن ناول گزارش شده است (۶). جنین‌ها قبل از جدا شدن و بازکشت، در وضعیت رشد متفاوت بودند، و به شکل‌های

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1380.5.2.3.5]

جدول ۱. درصد جوانه‌زنی تخمک‌های نابارور حاصل از میوه‌های ۱۶ هفته‌ای هر یک از ارقام در محیط‌های کشت

ارقام نارنگی	MS	MT	MT+ME	MT+GA_3
ایشی کاوا	۳۱	۴۰/۵	۰	۰
سوجی یاما	۲۵	۰	۰	۰
میو گاوا	۰	۰	۰	۰

گرد، قلبی، کشیده و نیز به صورت جنین‌های دروغین مشاهده شدند (شکل ۳). در مشابهت با نتایج این آزمایش، جنین‌های دروغین از کشت تخمک‌های نابارور پرتقال والنسیا و شاموتی نیز قبلاً گزارش گردیده بود (۶ و ۱۱). در مرحله جوانه‌زنی، از ۶۵٪ تخمک‌های رقم ایشی کاوا روی محیط کشت MS، کالوس تولید شد (شکل ۴).

کشت نوسلار

هنگامی که تعداد ۱۰۰ جنین نوسلار حاصل از رشد تخمک‌های نابارور رقم ایشی کاوا و ۵۰ جنین نوسلار رقم سوجی یاما، پس از ۱۰ هفته کاشت، از محیط کشت‌های MT، MT+ME، MT+GA_3 به محیط MT+GA_3+ME منتقل گردیدند، در طول مدت دو ماه، به ترتیب به میزان ۸۳٪ و ۹۵٪ رشد نمودند. سپس نمو تعداد ۲۰ جنین از هر رقم ایشی کاوا و سوجی‌یاما روی محیط کشت MT+GA_3+ADE+ME مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۵). در گزارش‌های دیگری نقش مؤثر GA_3 و ME در نمو اولیه جنین و نیز وجود ADE همراه GA_3 و ME برای تشکیل برگ‌ها و ریشه اولیه تأیید شده است (۱۳و۱۵).

تشکیل گیاهچه و رشد آن

از رقم سوجی یاما ۱۴ جنین (۷۰ درصد) تدریجاً تمایز یافته و تولید برگ نمودند، در صورتی که در رقم ایشی کاوا ۱۰ جنین (۵۰ درصد) به مرحله تولید برگ رسیدند. نکته قابل توجه در این دو رقم این بود که حدود ۴۰ درصد جنین ها اعم از تمایز یافته یا نیافته (شکل‌های ۶ و ۷) دارای ریشه شده بودند. جنین رقم ایشی کاوا در مرحله آخر تکامل (کوتیلدونی) شروع به تشکیل ریشه نمود (شکل ۶). مشابه همین وضعیت در رقم سوجی یاما ملاحظه گردید (شکل ۷). جنین‌های کشت شده روی محیط کشت MT+GA_3+ADE+ME، پس از تولید برگ (رقم ایشی کاوا ۵۰ درصد و رقم سوجی یاما ۴۵ درصد)، در آخرین مرحله رشد (لپه‌ای) تدریجاً آثار رشد ریشه را نشان دادند (شکل ۸). در نهایت، وقتی گیاهچه‌ها در مرحله دو برگی به محیط کشت MS منتقل گردیدند، وضعیت رشد گیاهچه‌ها و توسعه برگ‌ها در شدت نور ۱۵۰۰ لوکس در مقایسه با شدت نور ۸۰۰ لوکس دو برابر بود (شکل ۹). مشابه این نتیجه در وضعیت مطلوب رشد گیاهچه‌های پرتقال والنسیا در ۲۰۰۰ لوکس دیده شد (۶)، در حالی که شدت‌های کمتر تا ۱۰۰۰ لوکس (۲۱) نیز در رشد گیاهچه‌ها در بعضی ارقام مرکبات مفید بوده است. از بین سه رقم ساتسوما، رقم ایشی کاوا در تمام مراحل رشد بهترین سازگاری را با شرایط فراهم شده نشان داد، و از رقم کند رشد سوجی یاما تعداد چهار گیاهچه تهیه شد. در این آزمایش شرایط محیط های کشت برای میو گاوا مناسب نبود، و از این رقم گیاهچه‌ای تولید نگردید.

پس از پیوند جوانه های حاصل از ارقام سوجی یاماو ایشی کاوا روی نهال‌های حاصل از کی لایم، علایمی دال بر آلوده بودن گیاهان پیوندی به بیماری ویروسی تریستزا مشاهده نگردید. پیشنهاد می‌شود با توجه به پیچیده بودن علایم بیماری‌های ویروسی، در صورت وجود امکانات، آزمون‌های دقیق‌تری روی نهال‌های حاصل صورت گیرد.

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1380.5.2.3.5]

شکل ۱:تخمکهای تلقیح نشده از میوه های بی بذر، ۱۶ هفته پس از گرده افشانی

شکل ۲:جنین های حاصل از کشت تخمکهای تلقیح نشده دو رقم ایشی کاوا (الف) و سوجی یاما (ب)

[DOR: 20.1001.1.24763594.1380.5.2.3.5]
[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-19]

شکل ۳:جنین های حاصل از تخمک تلقیح نشده ۱۰هفته پس از کاشت در مراحل مختلف رشد

G= جنین گرد، H= جنین قلبی شکل، T= جنین کشیده، P= جنین دروغی

شکل ۴: تشکیل کالوس جنین زا از تخمک‌های تلقیح نشده

رقم ایشی کاوا ۱۰ هفته پس از کاشت

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1380.5.2.3.5]

شکل ۵: مراحل تمایز جنین و تشکیل برگ و ریشه از رقم ایشی کاوا روی محیط کشت MT+GA$_3$+ADE+ME

شکل ۶: قبل از تشکیل برگهای حقیقی، از جنین در مرحله کوتیلدنی رقم ایشی کاوا، ریشه ظاهر شده است.

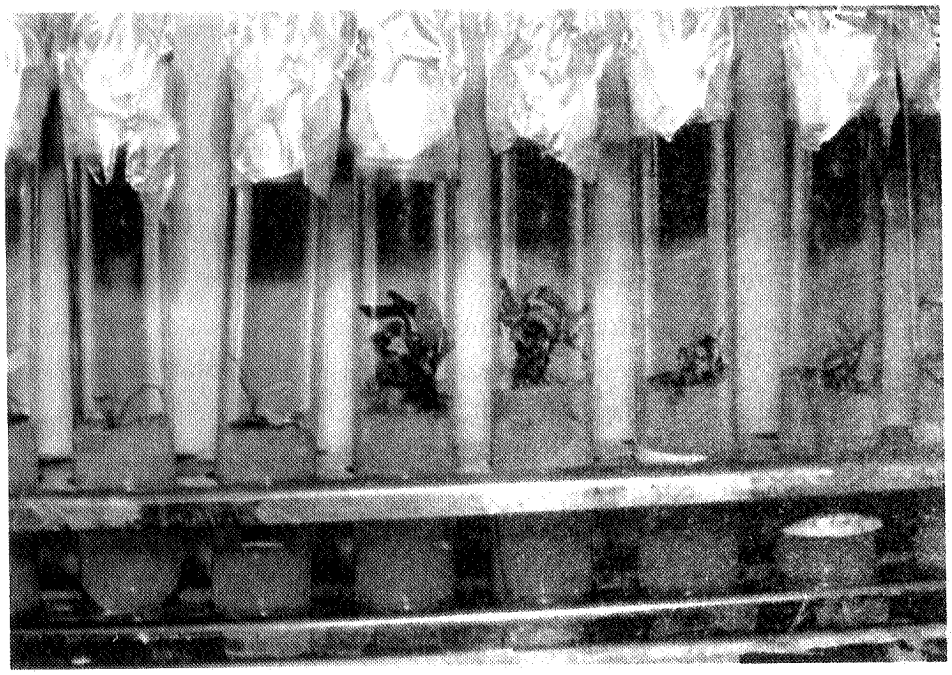
[DOR: 20.1001.1.24763594.1380.5.2.3.5]
[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-19]

شکل ۷: تشکیل ریشه از جنین توسعه یافته رقم سوجی یاما قبل از آنکه برگها ظاهر شوند.

شکل ۸: رشد جنین در رقم ایشی کاوا با تشکیل برگهای اولیه و شروع رشد ریشه

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1380.5.2.3.5]



شکل ۹. گیاهچه‌های کامل در محیط کشت MS، در دو شدت نور ۸۰۰ و ۱۵۰۰ لوکس. گیاهچه‌های بزرگ در تیمار نوری ۱۵۰۰ لوکس قرار داشته و تخلیه اتیلن صورت گرفته است.

سپاسگزاری

هزینه اجرای این طرح از اعتبارات پژوهشی دانشگاه گیلان تأمین شده که بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه گیلان سپاسگزاری می‌گردد. هم‌چنین از همکاری مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور نیز قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

۱. ابراهیمی، ی. ۱۳۵۹. *سیر تکاملی مرکبات در ایران*. مؤسسه اصلاح بذر و نهال، کرج.

۲. فتوحی قزوینی، ر. و ی. حمیداوغلی. ۱۳۷۷. کشت تعلیق سلولی، جداسازی و امتزاج پروتوپلاست دو گونه بی بذر پرتقال واشنگتن ناول و نارنگی ساتسوما. مجله علوم کشاورزی ایران ۲۹(۲): ۲۶۷-۲۷۴.

3. Ben-Hayyim, G. and Y. Goffer. 1989. Plantlet regeneration from a NaCl-selected salt-tolerant callus culture of Shamouti orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Plant Cell Rep. 7: 680-683.

4. Ben-Hayyim, G. and H. Neumann. 1983. Stimulatory effect of glycerol on growth and somatic embryogenesis in *Citrus* callus culture. Z. Pflanzenphysiol. 110: 331-337.

5. Deng, Z. A., W. C. Zhang and S. Y. Wan. 1990. High frequency of somatic embryogenesis and plant regeneration from nucellar calli and protoplasts in *Citrus*. Acta. Biol. Exp. Sinica. 23: 135-143.

6. Fotouhi Ghazvini, R. 1996. Tissue Culture and Frost Tolerance Studies in *Citrus* spp. Ph.D. Thesis., Univ. of Salford, UK.

7. Fotouhi Ghazvini, R. and T. A. Villiers. 1995. Factors affecting the formation of embryogenic callus and embryogenesis from undeveloped ovules of Valencia and Washington Navel orange. Congress On *In Vitro* Biology, May 20-24, 1995, Denver, Ca., USA.

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1380.5.2.3.5]

8. Gmitter, F. G. and G. A. Moore. 1986. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of *Citrus*: Embryo production, germination, and plant survival. Plant Cell Tissue and Organ Culture 6: 139-147.

9. Hidaka, T. and I. Kajiura. 1988. Plantlet differentiation from callus protoplasts induced from *Citrus* embryos. Sci. Hort. 34: 85-92.

10. Kobayashi, S., H. Ushimya and I. Ikeda. 1983. Plant regeneration from "Trovita" orange protoplast. Jap. J. Breed. 33(2): 119-122.

11. Kochba, J., P. Spiegel-Roy and H. Safran. 1972. Adventive plants from ovules and nuceli in *Citrus*. Planta (Berl.) 106: 237-245.

12. Kunitake, H., H. Kagami and M. Masahiro. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu*). Sci. Hort. 47: 27-33.

13. Ling Jing, T., N. Nobumasa and M. Iwamasa. 1989. Plant regeneration from protoplasts of calamondin (*Citrus madurensis*). Sci. Hort. 40: 325-333.

14. Litz, R. E. and V. S. Jaiswal. 1991. Micropropagation of tropical and subtropical fruits. pp. 247-263. *In*: P. C. Debergh and R. H. Zimmerman (Eds.), Micropropagation Technology and Application. Kluwer Academic, Netherlands.

15. Moore, G. A. 1985. Factors affecting *in vitro* embryogenesis from undeveloped ovules of mature *Citrus* fruits. J. Am. Soc. Hort. Sci. 110: 66-70.

16. Murashige, T. and F. A. Skoog. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

17. Murashige, T. and D. P. H. Tucker. 1969. Growth factor requirements of *Citrus* tissue culture. Proc. 1st Int. *Citrus* Symp. 3: 1155-1161.

18. Navarro, L. 1988. Application of shoot-tip grafting *in vitro* to woody species. Acta Hort. 227: 43-55.

19. Navarro, L. 1990. Shoot-tip grafting *in vitro* of woody species and its influence on plant age. *In*: R. Rodriguez, T. R. Sanchez and D. Durzan (Eds.), NATO ASI Series A 186: 117-123.

20. Sim, G. E., C. J. Goh and C. S. Loh. 1989. Micropropagation of *Citrus mittis* Blanco, multiple bud formation from shoot and root explants in the presence of 6-benzylamino purine. Plant Sci. 59: 203-210.

21. Spiegel-Roy, P. and A. Vardi. 1984. *Citrus*. pp. 255-272. *In*: P. V. Ammirato, D. A. Evans, W. R. Sharp and Y. Yamada (Eds.), Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 3, Collier Macmillan, London.

22. Starrantino, A. and F. Russo. 1980. Seedlings from undeveloped ovules of ripe fruits of polyembryonic *Citrus* cultivars. Hort. Sci. 15: 269-297.

23. Torres, K. C. 1989. Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops. Van Nostrand Reinhold, New York.

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1380.5.2.3.5]