بررسی جنین‌زایی غیر جنسی از تخمک‌های بارور نشده لیمو آب شیراز (*Citrus aurantifolia* L. var. Mexican lime) در محیط‌های کشت مختلف

رضا فتوحی قزوینی و سیامک شیرانی[1]

چکیده

تأثیر محیط‌های کشت مختلف حاوی مواد تنظیم کننده رشد در جنین‌زایی غیر جنسی از لیمو آب شیراز (مکزیکن لایم) مورد بررسی قرار گرفت.

میانگین جنین‌زایی از تخمک‌های بارور نشده پس از ۶۰ روز در محیط‌های مختلف کشت از صفر تا ۳۳/۷۵ درصد متغیر بود. هورمون GA_3 در غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تأثیر معنی‌دار و تحریک کنندگی در جنین‌زایی نشان داد. حضور عصاره جو نیز در محیط کشت باعث افزایش جنین‌زایی از تخمک‌ها شد، به طوری که در کمترین غلظت (۳۰۰ mg/l)، بهترین اثر را در جنین‌زایی نشان داد. در حالی که غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره جو مانع جنین‌زایی شد، ولی رشد کالوس جنین‌زا را افزایش داد. با مصرف هورمون BA در غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، جنین‌زایی افزایش نشان داد، در صورتی که در غلظت‌های بیشتر نقش بازدارندگی داشت. نمو جنین‌ها در محیط‌های کشت مختلف نیز بررسی گردید. شاخص میانگین طول ریشه‌چه به ساقه‌چه روی محیط کشت MT به همراه ۰/۱ mg/l جیبرلین ۱/۲۲±۰/۲۲ بود، که برای جنین‌زایی، تکامل جنین‌ها و تبدیل به گیاهچه به عنوان مناسب‌ترین محیط غذایی تعیین شد.

واژه‌های کلیدی: *مکزیکن لایم، جنین‌زایی غیر جنسی، مواد تنظیم کننده رشد*

مقدمه

جنین‌زایی از تخمک بارور نشده یا گسترش نیافته در برخی از گونه‌های مرکبات گزارش شده است (۷). منشأ جنین غیر جنسی با حفظ صفات مادری و بدون ویروس بودن، سلول‌های خورش است (۱). روش‌های کشت بافت، با انگیزش جنین و باززایی گیاه در مرکبات، برای انجام پژوهش‌های به‌نژادی و برنامه‌های به‌زراعی اهمیت بسیاری دارد (۳). کشت تخمک‌های بارور نشده از مرکبات، نخست به منظور به دست آوردن گیاهان

۱. به ترتیب دانشیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.7.1]

با منشأ بافت خورش که بدون ویروس‌اند، از ارقام چند جنینی (Polyembryonic) صورت گرفت. جنین‌زایی از بافت خورش نه تنها در گونه‌های چند جنینی طبیعی گزارش شده است، بلکه از گونه‌های تک جنینی نیز تحت شرایط خاص تولید می‌شود (۷). بررسی‌های اخیر نشان داده است که استعداد جنین‌زایی در بافت‌هایی غیر از تخمک و بافت خورش نیز وجود دارد (۳). تولید جنین غیر جنسی از کشت آبدانک‌های میوه نارنگی ساتسوما (۱۱) و از بافت خامه برخی از گونه‌های مرکبات، گزارش شده است (۳).

تشکیل جنین در مرکبات توسط اسید نفتالین استیک (NAA) و کینتین و ترکیبات پیچیده‌ای از قبیل شیره نارگیل، عصاره مخمر و عصاره جو تسریع می‌شود (۱). به گونه‌ای که در نارنگی ساتسوما، NAA با غلظت ۱ mg/l به تنهایی تولید جنین‌های نابجا را از بافت کالوس تحریک کرده است (۱۱). مور (۷) تأثیر مواد تنظیم کننده رشد مختلف را در جنین‌زایی تخمک‌های بارور نشده گریپ فروت رقم مارش بررسی کرد. در این بررسی هورمون‌های اسید ایندول استیک (IAA) و ۸-آزاگوانین یا AG (8-azaguanine) هیچ تأثیری بر جنین‌زایی نداشت. هم‌چنین، هورمون‌های بنزیل آدنین (BA) و ۸-آزاایندول یا AZI (8-azaindole)، نیز جنین‌زایی را تحریک ننمودند. در صورتی که هورمون اسید جیبرلیک (GA_3) در غلظت‌های بالاتر نقش بازدارنده داشت (۷). در آزمایش دیگر، حضور هورمون GA_3 و آدنین سولفات به طور معنی‌داری تولید ریشه را در بافت‌های سازمان نیافته جنین‌های کوچک حاصل از پرتقال شاموتی تحریک کرد (٦). وجود هورمون اسید ابسیسیک (ABA) در محیط کشت، جنین‌زایی را از تخمک‌های بارور نشده گریپ فروت افزایش داد (۷). در پرتقال، بیشترین جنین‌زایی از تخمک‌های بارور نشده روی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (۸) (MS) همراه با ۵۰۰ mg/l عصاره جو یا ME (Malt extract) و ٦-بنزیل آمینو پیورین (BAP) به غلظت ۰/۰۰۳ mg/l، حاصل شد (۳). در انبه، جنین‌زایی غیر جنسی از کالوس‌های بافت خورش، فقط در محیط کشت محتوی هورمون ٤،۲-اسید دی‌کلروفنوکسی استیک (2,4-D) با غلظت ۱ mg/l به دست آمد (١٤). در آزمایشی دیگر در پرتقال، بالاترین درصد جنین‌زایی تخمک‌ها روی محیط کشت محتوی دامینوزید یا DZ (Daminozide) و 2,4-D با عصاره جو (ME) در روشنایی به دست آمد (۵). در نارنگی رقم کینو، از کالوس‌های جنین‌زا، روی محیط MS همراه با BA (۳ mg/l)، NAA (۰/۵ mg/l) و ME (۵۰۰ mg/l)، بیشترین شمار جنین تولید شد (٤). سینگ و همکاران (۱۵) گزارش کردند که لاکتوز میزان جنین‌زایی را بیشتر از گلیسرول افزایش می‌دهد. در پژوهشی که نسبت نیترات به آمونیم را در جنین‌زایی کالوس‌های پرتقال بررسی نمود، نسبت ۵۰٪ تا ۹۰٪، بهترین اثر را داشت (۱۳).

مواد و روش‌ها

میوه‌های رسیده لیمو آب شیراز پیش از ضدعفونی با مواد شوینده تجارتی (ریکا) شست‌شو شد. سپس به دو صورت، استفاده از محلول ۳۰٪ وایتکس به مدت ۱۵ دقیقه و سه نوبت شست‌شو با آب استریل، و دیگری ۳۰ ثانیه غوطه‌وری در الکل اتیلیک ۹٦٪ و بعد شعله‌ور ساختن سطح میوه روی شعله در داخل هود استریل ضدعفونی گردید. در زیر بینوکولار و در شرایط استریل، تخمک‌های گسترش نیافته میوه‌ها (شکل ۱) استخراج، و ۲۰ عدد در هر پتری‌دیش و با اختصاص چهار پتری برای هر تیمار، روی چهارده نوع محیط کشت مختلف کشت شدند (جدول ۱). دو ماه پس از کشت درصد جنین‌زایی روی محیط‌های غذایی محاسبه شد. آزمایش در چارچوب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا شد، و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ و ۱٪ انجام گرفت.

پس از جوانه‌زنی تخمک‌ها، وضعیت رشد و نمو جنین‌ها تا تشکیل گیاهچه کامل روی محیط‌های کشت شش‌گانه (جدول ۲)، در یک آزمایش کاملاً تصادفی و در چهار تکرار بررسی شد.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.7.1]

جدول ۱. فهرست محیط‌های کشت برای جنین‌زایی تخمک‌های گسترش نیافته لیمو آب شیراز

شماره	محیط کشت	شماره	محیط کشت
۱	MS[1]	۸	MT + BA (0.1 mg/l)
۲	MT[2]	۹	MT + BA (5 mg/l)
۳	MS + ME[3] (500 mg/l)	۱۰	MT + BA (10 mg/l)
٤	MT + ME (500 mg/l)	۱۱	MT + GA_3 (0.1 mg/l)
٥	MT + ME (300 mg/l)	۱۲	MT + GA_3 (0.01 mg/l)
٦	MT + ME (700 mg/l)	۱۳	MT + GA_3 (0.001 mg/l)
۷	MT + BA (0.01 mg/l)	۱٤	MT + GA_3 (0.01 mg/l) + BA (0.1 mg/l) + ME (500 mg/l)

۱. موراشیگ و اسکوگ (۸)　　۲. موراشیک و توکر (۹)　　۳. عصارهٔ جو

جدول ۲. محیط‌های کشت برای رشد و نمو جنین تا تشکیل گیاهچه

شماره	ترکیب محیط کشت
۱	NAV[1]
۲	NAV + 1550 mg/l glutamine
۳	MT + 500 mg/l ME
٤	MT + 0.001 mg/l GA_3
٥	MT + 0.1 mg/l GA_3
٦	MT + 1 mg/l GA_3

۱. ناوارو (۱۰)

توسعه کالوس‌های تولید شده از تخمک و یا جنین‌ها روی محیط کشت MT همراه با سه غلظت ۵۰۰، ۷۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره ارزیابی گردید. نمونه‌ها در شرایط ۱۰۰۰ لوکس روشنایی برای ۱٦ ساعت در شبانه روز و دمای ثابت ۲٦±۱°C نگهداری شد. زیرکشت (Subculture) جنین‌زایی به فاصله هر هشت هفته، و کالوس هر چهار هفته، در چارچوب طرح کامل تصادفی و چهار تکرار انجام گرفت.

تبدیل داده‌ها از طریق فرمول $\text{Arc}\sin\sqrt{X}-1$ انجام شد، زیرا داده‌ها به صورت درصدی محاسبه گردید و از نظر آماری فاقد توزیع نرمال بود (۲ و ۸)، و سپس تجزیه و تحلیل‌های آماری روی داده‌های تبدیل شده صورت گرفت.

نتایج

جنین‌زایی

اختلاف جنین‌زایی تخمک‌های بارور نشده لیمو آب شیراز در محیط‌های کشت مختلف، در سطح ۱٪ از لحاظ آماری معنی‌دار شد، و محیط کشت MT همراه با عصاره جو، با غلظت ۳۰۰mg/l، دارای بیشترین درصد جنین‌زایی، و در سطح احتمال ۱٪ با دیگر تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود، به طوری که نسبت به محیط حاوی ۵۰۰ mg/l و ۷۰۰mg/l عصاره جو باعث افزایش بیشتر درصد جنین‌زایی شد (جدول ۳). بنابراین، افزودن عصاره جو به MT بر جنین‌زایی تأثیر داشت (شکل ۲). اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ در تیمار هورمونی GA_3

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.7.1]

جدول ۳. مقایسه اثر محیط‌های کشت به کار رفته برای جنین‌زایی و کالوس‌زایی تخمک‌های بارور نشده لیمو آب شیراز

محیط کشت	درصد جنین‌زایی	درصد کالوس‌زایی
MS	۱۶/۲۵^{cde}	۲/۵^{fg}
MT	۲/۵^{hi}	۱/۲۵^{g}
(500 mg/l) ME + MS	۷/۵^{fghi}	۰^{g}
(500 mg/l) ME + MT	۵^{hi}	۶/۲۵^{cd}
(300 mg/l) ME + MT	۳۳/۷۵^{a}	۸/۷۵^{b}
(700 mg/l) ME + MT	۱۳/۷۵^{cdef}	۳/۷۵^{ef}
(0.01 mg/l) BA + MT	۱۷/۵^{bcd}	۲/۵^{fg}
(0.1 mg/l) BA + MT	۱۸/۷۵^{bc}	۰^{g}
(5 mg/l) BA + MT	۰^{i}	۰^{g}
(10 mg/l) BA + MT	۰^{i}	۰^{g}
(0.1 mg/l) GA_3 + MT	۲۳/۷۵^{b}	۷/۵^{bc}
(0.01 mg/l) GA_3 + MT	۱۳/۷۵^{cdef}	۵^{de}
(0.001 mg/l) GA_3 + MT	۸/۷۵^{efgh}	۱۱/۲۵^{a}
(500 mg/l)ME + (0.1 mg/l)BA + (0.01 mg/l)GA_3 + MT	۰^{i}	۰^{g}

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشابهی می‌باشند، در سطح ۱٪ آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

مشاهده گردید، و مشخص شد که GA_3 به طور معنی‌داری در جنین‌زایی مؤثر است. محیط کشت دارای ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA به طور معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ باعث افزایش درصد جنین‌زایی شد. در حالی که BA در غلظت‌های زیادتر بازدارنده جنین‌زایی بود (جدول ۳). افزون بر این، در جنین‌زایی تخمک‌ها هیچ گونه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بین غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده نشد. محیط کشت MT دارای GA_3 با اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ نسبت به محیط کشت MT دارای BA جنین‌زایی را افزایش داد.

افزایش غلظت GA_3، در مقایسه با افزودن عصاره جو، در جنین‌زایی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد، و مشخص شد که تأثیر عصاره جو در جنین‌زایی، با اثر GA_3 یکسان است.

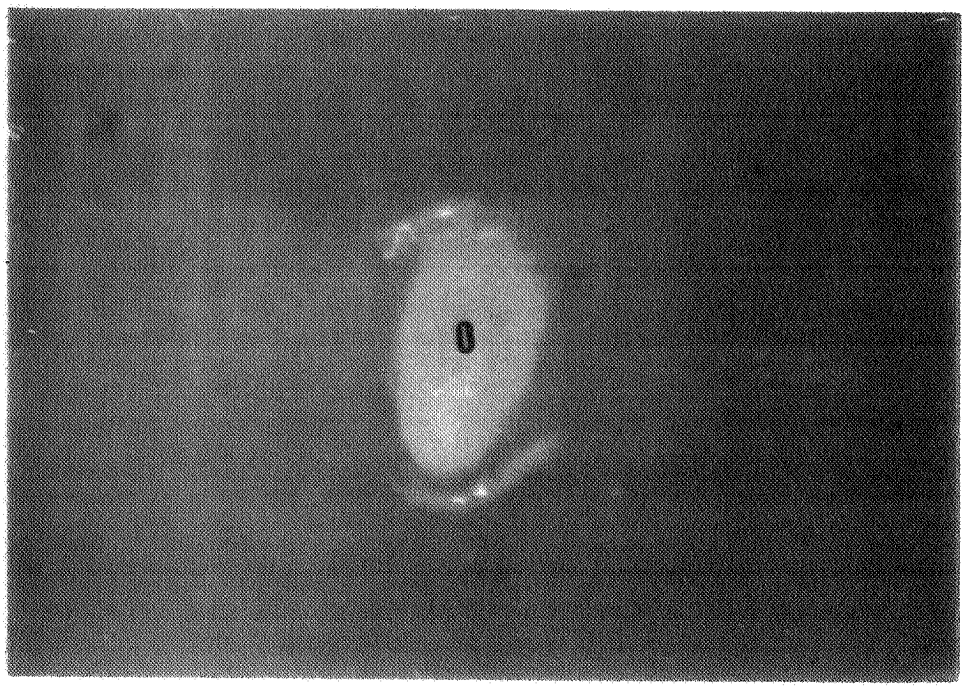
کالوس‌زایی

اثر عصاره جو بر کالوس‌زایی از تخمک‌های لیموی آب شیراز از لحاظ آماری معنی‌دار شد، که نشان می‌دهد عصاره جو بر کالوس‌زایی تأثیر داشته است. محیط کشت MT دارای عصاره جو با غلظت ۳۰۰ mg/l، در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌دار با محیط‌های دیگر نشان داد، و نسبت به محیط‌های MT با ۵۰۰ و ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره جو افزایش بیشتر درصد کالوس‌زایی را موجب شد (جدول ۳). محیط کشت MT به همراه ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر GA_3 دارای بیشترین درصد کالوس‌زایی (۱۱/۲۵٪) بود، و در سطح احتمال ۱٪ با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌دار داشت، به طوری که نسبت به دیگر غلظت‌های به کار رفته GA_3 باعث افزایش بیشتر کالوس‌زایی شد (جدول ۳).

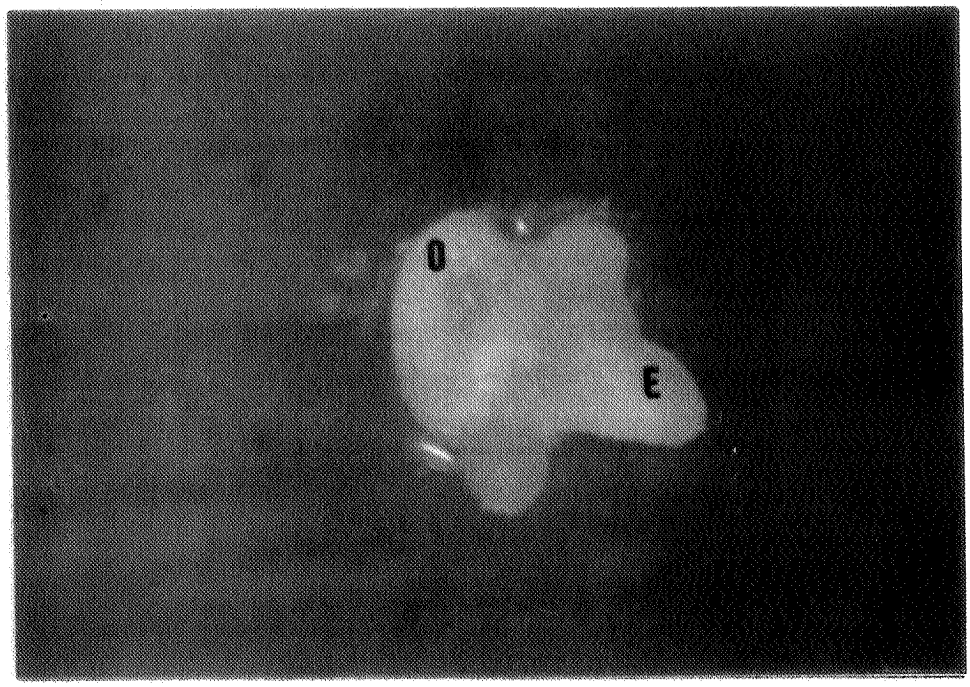
افزایش BA به محیط کشت MT، اختلاف معنی‌داری را در

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.7.1]



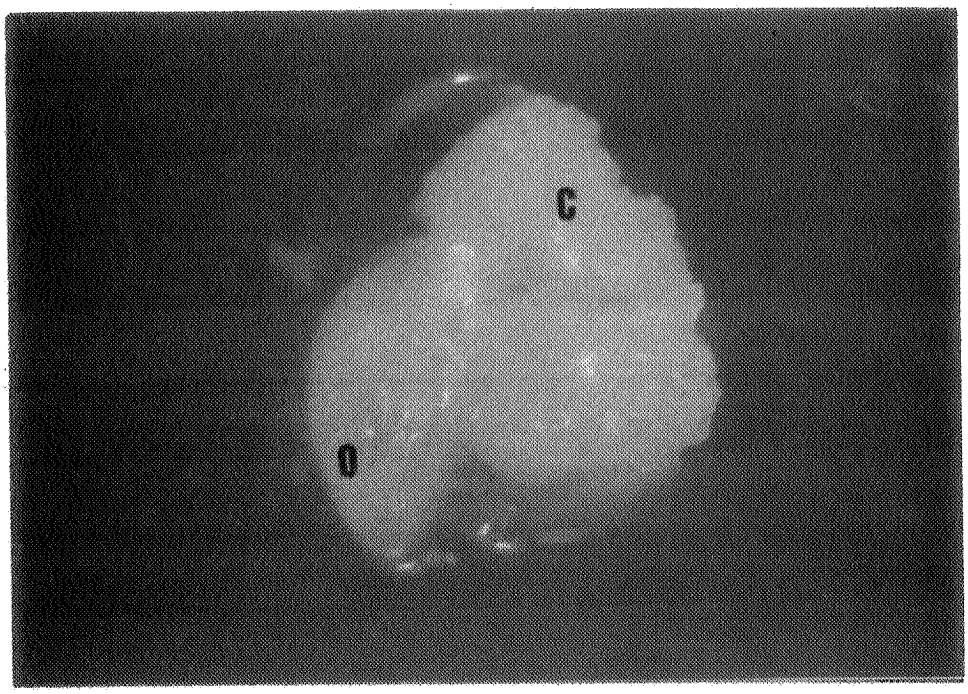
شکل ۱. تأثیر محیط‌های کشت بر درصد جنین‌زایی تخمک‌های بارور نشده لیموی آب شیراز



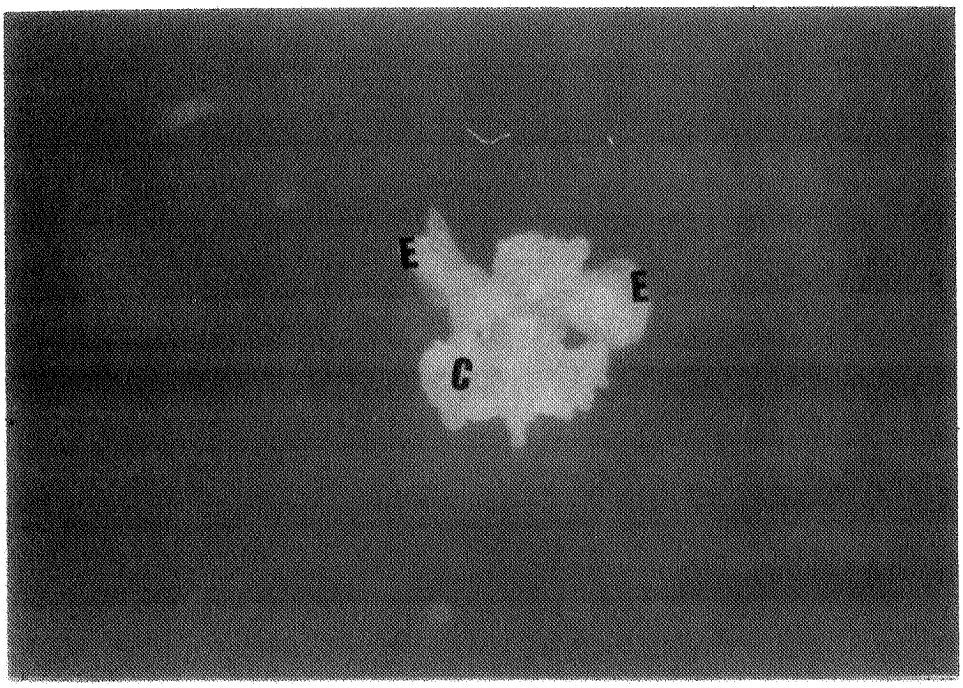
شکل ۲. تأثیر محیط‌های کشت بر درصد کالوس‌زایی تخمک‌های بارور نشده لیموی آب شیراز

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.7.1]



شکل ۳. تخمک بارور نشده لیمو آب شیراز



شکل ٤. جنین‌زایی غیر جنسی از تخمک‌های بارور نشده لیمو آب شیراز

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.7.1]

جدول ٤. بررسی وضعیت رشد و نمو جنین‌های انتقال یافته

محیط کشت	میانگین طول ساقه (cm)	میانگین طول ریشه به میانگین طول ساقه
NAV	۰/۸۸±۰/۱۸	۷/۲۱±۰/۹
1550 mg/l glutamine + NAV	٤/۷٦±۰/۲٥	۱/۰۹±۰/۰۳
(500 mg/l) ME + MT	۰/۳۳±۳/٤	۱/۲۷±۰/۰۹
(0.001 mg/l) GA_3 + MT	۲/۷٥±۰/۲۱	۱/٥۱±۰/۱۳
(0.1 mg/l) GA_3 + MT	۳/٦٦±۰/٤۲	۱/۲۲±۰/۲۲
(1 mg/l) GA_3 + MT	٤/۹٥±۰/٥۲	۰/۲۱±۰/۰۸۹

سطح احتمال ۱٪ در کالوس‌زایی موجب نشد. از کشت تخمک‌های بارور نشده به میزان ناچیزی (حدود ۲۰mg) کالوس از تیمارهای محیط کشت MT به همراه عصاره جو و GA_3 تولید گردید (شکل ۳)، که به محیط کشت MT دارای ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره جو انتقال، و با چندین بار زیر کشت رفتن مقدار آنها افزایش یافت. ویژگی این محیط کشت این بود که از جنین‌زایی کالوس‌ها جلوگیری می‌کرد و باعث افزایش کالوس‌ها می‌شد. در حالی که کالوس‌ها روی محیط کشت MT با مقادیر کمتر عصاره جو جنین‌زایی را گسترش داده و توده‌ای سبز رنگ از جنین را تولید نمودند (شکل ٤).

رشد جنین‌های انتقال یافته

پس از جوانه‌زنی تخمک‌ها، جنین‌ها برای رشد و نمو و تبدیل به گیاهچه کامل به محیط‌های کشت (جدول ۲) انتقال یافتند، و برای بررسی وضعیت رشد جنین‌های تکامل یافته، نسبت میانگین طول ریشه و طول ساقه و میانگین طول ساقه محاسبه شد (جدول ٤). رشد ساقه روی محیط‌های کشت GA_3 MT+۰/۱mg/l و NAV+۱۵۵۰mg/l glutamine زیادتر گردید، و نه تنها طول ساقه در این دو محیط کشت نسبت به تیمارهای دیگر بیشتر شد، بلکه نسبت طول ریشه به طول ساقه در آنها به عدد یک نزدیک‌تر بود (جدول ٤).

انتقال و سازگاری

گیاهچه‌های ۵-٦ برگی پس از گسترش کافی در داخل لوله‌های کشت، به درون گلدان‌های ضدعفونی شده با خاک استریل انتقال یافتند. به منظور عادت‌دهی با شرایط خارج از انکوباتور، درپوش‌هایی با قطر دهانه ۱۰ سانتی‌متر به مدت دو هفته در بالای گلدان قرار گرفت. تدریجاً سوراخ‌هایی در بالای درپوش‌ها ایجاد گردید. با ادامه آبیاری و کوددهی با محلول MS، پس از سه هفته گیاهچه‌ها بدون آلودگی با شرایط گلخانه سازگار شدند.

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره جو و GA_3 به طور مؤثری باعث افزایش جنین‌زایی گردید، که با پژوهش‌های انجام شده در دیگر گونه‌های مرکبات هم‌خوانی دارد (۱، ۳، ٤، ٥، ٦ و ۷). پس از گذشت حدود شش هفته، بهترین درصد جنین‌زایی از تخمک‌های بارور نشده ۳۳/۷٥٪ بود، که در مقایسه با نتایج جنین‌زایی تخمک‌های گسترش نیافته پرتقال والنسیا، لیمو شیرین، گریپ فروت، نارنگی ساتسوما، که به ترتیب ۲۰، ۱/٤، ٦ و ۰/٥ درصد می‌باشد، نسبت زیادی است (۷ و ۱۲). در پژوهشی در جنین‌زایی لیمو آب شیراز، درصد جنین‌زایی ۷/٤ به دست آمد، که در مقایسه با نتایج این آزمایش کم است (۱۲). شاید این اختلاف درصد را بتوان به تأثیر تنظیم کنندگان رشد بر ژنوتیپ و ارقام مختلف لیمو آب نسبت داد.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.7.1]

در این پژوهش بهترین درصد کالوس‌زایی ۱۱/۲۵ به دست آمد. در گونه‌های دیگر مرکبات مقادیر بیشتری گزارش شده است، اگرچه در مکزیکن‌لایم درصد کالوس‌زایی صفر بوده است (۱۲).

در این آزمایش، BA در غلظت‌های زیادتر، بر جنین‌زایی تأثیر بازدارندگی نشان داد، که با نتایج پژوهش‌های انجام گرفته در مورد گونه‌های دیگر مرکبات هم‌خوانی دارد (۷). در نارنگی رقم کینو، از کالوس‌های جنین‌زا روی محیط کشت دارای ۵۰۰ میلی‌گرم عصاره جو بیشترین شمار جنین تولید شده است (٤)، که با نتایج این پژوهش هم‌خوانی دارد. زیرا رشد کالوس روی محیط کشت محتوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره جو صورت می‌گیرد، و در غلظت‌های پایین‌تر (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) جنین‌زایی تحریک می‌شود. از بهترین محیط‌های کشت برای رشد و نمو جنین، MT با هورمون GA_3 در غلظت ۰/۱ بود، که به لحاظ تولید ریشه و ساقه متعادل با نتایج به دست آمده توسط کوچبا و همکاران (٦) در پرتقال شاموتی هم‌خوانی دارد.

برخی از جنین‌های حاصل از تخمک‌ها، و یا جنین‌هایی که به طور غیر مستقیم از کالوس تولید شدند، قابلیت نمو و تبدیل به گیاهچه را نداشتند. این جنین‌ها با رنگ زرد متمایل به سبز قابلیت تولید کالوس را از خود نشان دادند، که مشابه این جنین‌ها نیز در گونه‌های دیگر مرکبات به نام جنین‌های دروغی (Seudoembryos) گزارش شده است (۷).

سپاسگزاری

این طرح بخشی از یک پروژه ملی است که بدین وسیله، از کمیسیون بیوتکنولوژی و شورای پژوهش‌های علمی کشور و نیز دانشگاه گیلان، برای تأمین هزینه و ایجاد امکانات و تسهیلات انجام آن قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

۱. باقری، ع. و م. صفاری. ۱۳۷٦. *مبانی کشت بافت‌های گیاهی*. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

۲. یزدی صمدی، ب.، ع. رضایی و م. ولی‌زاده. ۱۳۷٦. *طرح‌های آماری در پژوهش‌های کشاورزی*. انتشارات دانشگاه تهران.

3. Carimi, F., M. C. Tortorici, F. D. Pasquale and F. G. Crescimanno. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from undeveloped ovules and stigma/style explants of sweet orange navel group [*Citrus sinensis* (L.) Osb.]. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 54: 183-189.

4. Gill, M., Z. Singh, B. S. Dhillon, S. S. Gosal and S. Zora. 1994. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration on calluses derived from seedling explants of kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour. X *Citrus deliciosa* Tenora). J. Hort. Sci. 69(2): 231-236.

5. 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 Tiss. Org. Cult. 6: 139-147.

6. Kochba, J., J. Button, P. Spiegel-Roy, C. H. Bornman and M. Kochba. 1974. Stimulation of rooting of *Citrus* embryoids by gibberellic acid and acenine sulphate. Ann. Bot. 38: 795-802.

7. Moore, G. A. 1985. Factors affecting *in vitro* embryogenesis from undeveloped ovules of mature citrus fruit. J. Am. Soc. Hort. Sci. 110(1): 66-70.

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

9. Murashige, T. and D. P. H. Tucker. 1969. Growth factor requirements of Citrus tissue culture. Proc. First Intern. Citrus Symp. 3: 1155-1161.

10. Navarro, L. 1984. Citrus tissue culture. Proc. FAO/NORWAY Symp. on Plant Tissue Culture (Micropropagation of selected root crops, palms, citrus, and ornamental species). PP. 113-154, Rome.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.7.1]

11. Nihamasa, N. and M. Iwamasa. 1990. *In vitro* plantlet formation from juice vesicle callus of Satsuma (*Citrus unshiu* Mare.) Plant Cell Tiss. Org. Cult. 20: 137-140.
12. Perez, R. M., A. M. Galiana, L. Navarro and N. Duran-Vila. 1998. Embryogenesis *in vitro* of several *Citrus* species and cultivars. J. Hort. Sci. Biotechnol. 73(6): 796-802.
13. Randall, P. N. 1994. Growth of embryogenic sweet orange callus on media varying in the ratio of nitrate of ammonium nitrogen. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 39: 1-5.
14. Richard, E. L. 1984. *In vitro* somatic embryogenesis from nucellar callus of monoembryonic mango. HortSci. 19(5): 715-717.
15. Singh, A. K., N. Nito, M. Iwamasa and S. Subhsdrabahdhu. 1992. Influence of lactose and glycerol on growth and somatic embryogenesis of citrus callus. Acta Horticulturae 321: 606-609.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.7.1]