

مقاله کوتاه

مقایسه پایه های مختلف مرکبات برای ریز پیوندی^۱ COMPARISON OF DIFFERENT CITRUS ROOTSTOCKS FOR MICROGRAFTING

علیرضا شهسوار^۲

چکیده

ریزپیوندی، یکی از روش های پیشرفته در تولید درختان پیوندی مرکبات عاری از بیماری است. در این مطالعه ریزپیوندی پرتقال^۱ و اشنگتن ناول^۲ در شرایط کشت بافت روی پایه های نارنج، لیمو ترش، پونسیروس، ترویرسیترنج، سیتروملو و فلائینگ دراگون مورد بررسی قرار گرفت و اثر این پایه ها در افزایش درصد پیوندهای موفق تعیین گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که پایه ترویرسیترنج بیشترین درصد پیوندهای موفق (۴۰٪) را در مقایسه با سایر پایه ها دارد. پایه نارنج پس از سیترنج موفقیت به نسبت خوبی (۳۳/۳٪) را نشان داد. در حالی که پایه پونسیروس هیچ موفقیتی نداشت. مقایسه دان نهال ها^۳ از نظر آمادگی آن ها برای ریزپیوندی در یک فاصله زمانی مشخص از کاشت بذر (۲۰ روز) نیز نتایج قابل ملاحظه ای را نشان داد. در این بررسی پایه ترویرسیترنج بیشترین درصد دان نهال آماده از نظر میزان تندش بذر و رشد دان نهال تا رسیدن به ارتفاع مناسب برای ریزپیوندی (۸۱/۸٪) را ۲۰ روز پس از کاشت بذر تولید کرد که این درصد اختلاف به نسبت زیادی را با پایه بعدی یعنی پونسیروس (۵۰/۸٪) نشان داد. پایه فلائینگ دراگون کمترین درصد دان نهال (۶/۷٪) را تولید کرد. در رابطه با قطر پایه ها در محل پیوند نیز نتایج نشان داد که پایه ترویرسیترنج با میانگین قطر ۱/۷ میلیمتر، بیشترین قطر پایه را در محل پیوند دارا می باشد در حالی که لیموترش کمترین قطر (۱/۱۲ میلی متر) را دارد. در یک نتیجه گیری کلی از این پژوهش باید عنوان کرد که پایه ترویرسیترنج از نظر درصد پیوندهای موفق، و همچنین آمادگی پایه برای پیوند در بین پایه های مورد آزمایش بهترین نتیجه را نشان داده و به عنوان پایه ای مناسب برای ریزپیوندی قابل توصیه است.

واژه های کلیدی: پایه، ریزپیوندی، کشت بافت، مرکبات.

مقدمه

مرکبات از مهمترین درختان میوه نیمه گرمسیری محسوب می شوند و نقش مهمی در اقتصاد کشورهای تولید کننده دارند. یکی از مهمترین عوامل محدود کننده در تولید مرکبات، وجود بیماری های ویروسی، شبه ویروسی و مایکوپلاسمایی است که با تاسف، افزایش مرکبات به روش کپیوند^۴ باعث گسترش این بیماری ها از راه تولید نهال آلوده می شود. برای برطرف کردن این مشکل و تولید مرکبات عاری از بیماری پژوهش هایی

۱- تاریخ دریافت: ۸۲/۸/۱۲

۲- مربی بخش علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز، جمهوری اسلامی ایران.

۳- Budding

۴- Seedling

صورت گرفته و روش هایی ابداع شده است (۱، ۱۲). در این رابطه موراشیگی و همکاران^۱ (۸) روشی به نام ریزپیوندی نوک شاخساره ای^۲ ابداع کردند و به این ترتیب توانستند بر این مشکل چیره شوند. اگرچه این روش راهی مناسب برای تولید مرکبات عاری از بیماری محسوب می شود اما یکی از بزرگترین مشکلات موجود، پایین بودن درصد ریزپیوندهای موفق است. تاکنون در جهان پژوهش هایی برای افزایش درصد ریزپیوندهای موفق انجام شده است. ناوارو و همکاران^۳ (۱۱) گزارش کردند که پایه^۴ ترویرسیترنج^۴ برای پرتقال، نارنگی، گریپ فروت و کومکوات^۵ پایه مناسبی بوده و باعث افزایش ریزپیوندهای موفق می گردد اما برای لمون، بادرنگ^۶ و لیمو مناسب نیست. ادريس و بورگر^۷ (۲) نشان دادند که میزان موفقیت پیوند هنگامی که لیموی مکزیکی^۸ روی پایه های کاریزوسیترنج^۹ و ساکاتن سیتروملو^{۱۰}، پیوند شود یکسان است اما اگر همین پیوندک روی ترویرسیترنج زده شود نتایج مطلوبی بدست نمی دهد. همچنین پایه های کاریزوسیترنج و سیتروملو برای پرتقال^{۱۱} و النسیا^{۱۲} بسیار مناسب هستند ولی پایه ترویرسیترنج برای این نوع پرتقال مناسب نیست. آیوانو و همکاران^{۱۳} (۴) پیوندک های لمون را روی ۲۰۰۰ پایه نارنج، سیتروملو و راف لمون^{۱۴} ریزپیوند زدند. درصد موفقیت روی پایه^{۱۵} سیتروملو ۴۱٪، نارنج ۳۷٪ و راف لمون ۲۹٪ بود.

ناوارو (۹) اظهار داشت که ارتفاع و قطر پایه شاخص های مناسبی برای تشخیص زمان آمادگی پایه برای پیوند محسوب می شوند. او پیشنهاد کرد که دان نهال های ترویرسیترنج هنگامی که به بلندی ۳ تا ۵ سانتی متر و قطر ۱/۶ تا ۱/۸ میلی متر در محل پیوند رسیده باشند، برای پیوند آماده هستند. براساس پژوهش های ناوارو و همکاران (۱۱) بالاترین درصد ریزپیوندهای موفق زمانی به دست آمد که دان نهال هایی که دو هفته از رشد آن ها گذشته بود، مورد استفاده قرار گرفتند. استفاده از دان نهال های مسن تر سبب خشک شدن پیوندک شده، رنگ آن قهوه ای می شود و در پایان می میرد. همچنین در صورت استفاده از دان نهال های جوانتر، پیوندک رشد نکرده و توسط بافت پینه ای که پایه تولید می کند، پوشیده می شود. هوسی و همکاران^{۱۶} (۳) مشاهده کردند که برای پایه نارنج سه برگ^{۱۷} دان نهال هایی که سه روز از تندش بذر آن ها گذشته، مناسب تر هستند. موخوپادهای و همکاران^{۱۸} (۶) برای پایه نارنج، دان نهال های ۲۱ روزه را برای ریزپیوندی مناسب تر تشخیص دادند.

هدف از اجرای این پژوهش بررسی ریزپیوندی پرتقال^{۱۹} و واشنگتن ناول^{۲۰} روی شش پایه نارنج، لیموترش، نارنج سه برگ، ترویرسیترنج، سیتروملو و فلائینگ دراگون^{۲۱} و مقایسه درصد ریزپیوندهای موفق روی آن ها بود. این پایه ها هر کدام دارای ویژگی هایی هستند که ممکن است در میزان موفقیت ریزپیوندی تفاوت های آشکاری نشان دهند. از آنجا که رابطه بین پایه و پیوندک و میزان سازگاری آن ها با هم همیشه یکی از عوامل

۱- Navarro et al. -۳ Shoot-tip grafting -۲ Murashige et al. -۱

۴- 'Troyer' citrange [*Citrus sinensis* Osbeck × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]

۵- Kumquat (*Fortunella japonica* [Thumb.] Sing.) -۶ Citron (*Citrus medica*)

۷- Edriss and Burger -۸ 'Mexican' lime -۹ 'Carrizo' citrange

۱۰- 'Sacaton' Citromelo (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf. × *Citrus paradisi* Macf.)

۱۱- 'Valencia' orange -۱۲ Ioannou et al. -۱۳ 'Raugh' lemon -۱۴ Hosoi et al.

۱۵- Trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.) -۱۶ Mukhopadhyay et al

۱۷- 'Washington Navel' orange -۱۸ 'Flying Dragon'

مهم در درصد جوش خوردن پیوند محسوب می شود، بنابراین در پژوهش حاضر این مسئله مورد توجه قرار گرفته است.

مواد و روش ها

تهیه پایه

پایه هایی که برای این پژوهش در نظر گرفته شدند عبارتند از نارنج، لیمو ترش، ترویرسیترنج، نارنج سه برگ، سیتروملو و فلائینگ دراگون. بذره‌های این پایه ها از نواحی مرکبات خیز شمال و جنوب کشور جمع آوری شده و در شرایط مناسب در یخچال نگهداری گردیدند. هنگام کاشت، بذرها جداگانه شسته شده و پس از جدا کردن هر دو پوسته آن ها را با قرار دادن در محلول کلراکس (سفیدکننده های تجاری که ۰.۵٪ هیپوکلریت سدیم دارند) ۱۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه گندزدایی شده و سپس سه بار با آب مقطر گندزدایی شده، آبکشی شدند. پس از آن هر بذر در یک لوله کشت ۱۵۰×۲۵ میلی متری روی ۲۰ میلی لیتر محیط کشت دارای نمک های موراشیگی و اسکوگ MS^1 (۷) که با ۱٪ آگار جامد شده بود قرار گرفت. پیش از کشت، لوله های دارای محیط کشت در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی متر مربع به مدت ۱۵ دقیقه گندزدایی شدند. پس از کشت درب لوله ها بسته شده و در دمای 1 ± 27 درجه سانتیگراد و در تاریکی مطلق نگهداری گردیدند، تا برای ریزپیوندی به رشد مناسب برسند (۱۳).

تهیه پیوندک

برای تهیه پیوندک قلمه هایی به طول ۱۵ سانتیمتر و قطر ۴ تا ۶ میلی متر از یک درخت پرتقال 'واشنگتن ناول' در ناحیه خفر جهرم جدا شده و پس از حذف برگ ها به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه قلمه ها پس از شستشوی اولیه با آب و مایع ظرفشویی، در محلول کلراکس ۰.۴٪ به مدت ۲۰ دقیقه گندزدایی شده و سپس با آب مقطر گندزدایی شده سه بار آبکشی شدند. برای کاشت این قلمه ها محیط کشت هایی به صورت زیر تهیه گردید. لوله های شیشه ای به ابعاد ۲۰×۳۸ میلیمتر انتخاب شده و در هر لوله ۷۵ گرم شن کوارتز به همراه ۲۰ میلی لیتر نمک های محیط کشت MS به صورت مایع ریخته شد و سپس لوله ها در اتوکلاو گندزدایی گردیدند. پس در هر لوله یک قلمه قرار داده شده و زیر نوری با شدت ۱۰۰۰۰ لوکس و دمای ۲۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از حدود ۱۵ روز تعدادی از جوانه های روی قلمه ها تحریک به رشد شدند و تولید شاخه نمودند. بیشتر قلمه ها تولید شاخه نوشاخه هایی کردند که برای ریزپیوندی مناسب بودند (۱۳).

انجام ریزپیوندی

ریزپیوندی برابر با روش استاندارد انجام گرفت (۹، ۱۱، ۱۳). تمام شرایط بجز نوع پایه ثابت در نظر گرفته شد. فلش ها، پس از تولید جدا شده و در کلراکس ۰.۲٪ به مدت ۵ دقیقه گندزدایی شده و سپس سه بار با آب مقطر گندزدای شده آبکشی شدند و در شرایط به طور کامل گندزدایی شده و با استفاده از بینوکولار عمل ریزپیوندی انجام گرفت. به این صورت که پایه های آماده پیوند از محیط کشت بیرون آورده شده و ۱/۵ سانتیمتر از ساقه باقی گذاشته شده و بقیه آن قطع گردید. انتهای ریشه و لپه ها نیز قطع گردیدند. سپس در

قسمت انتهایی ساقه از محل مقطع برشی به شکل T واژگون به ابعاد یکی میلی متر ایجاد شده و مریستم انتهایی جوانه همراه با ۲ تا ۳ برگ اولیه (به اندازه ۰/۲ تا ۰/۳ میلی متر) جدا شده و در برش پایه قرار گرفت. گیاه پیوندی به لوله های کشت جدید دارای نمک های محیط کشت مایع MS که با سوکروز، ویتامین های تیامین هیدروکلراید^۱، پیریدوکسین هیدروکلراید^۲، نیکوتینیک اسید^۳ و همچنین اینوزیتول^۴ تکمیل شده بود منتقل گردید و بر روی یک تکیه گاه از جنس کاغذ صافی به نحوی قرار گرفت که ریشه گیاه پیوندی در محیط کشت و ساقه بالای آن قرار گیرد. لوله ها در شرایط دمایی 27 ± 1 درجه سانتی گراد و نور ۱۵۰۰ لوکس قرار گرفتند (۱۳). پس از حدود سه هفته، در گیاهانی که ریزپیوندی آن ها موفق بود، پیوندک ها به رشد مطلوبی رسیدند. در هرکدام از پایه ها تعداد پیوندهای موفق شمارش شد و درصد آن ها محاسبه گردید تا بهترین پایه جهت انجام ریزپیوندی مشخص گردد. برای هر پایه تعداد تکرارها ۱۵ عدد در نظر گرفته شد.

بررسی آمادگی دان نهال از نظر تندش و رسیدن به طول و قطر مناسب برای ریزپیوندی

در این رابطه تندش و رشد دان نهال تا رسیدن به ارتفاع مناسب که بین ۳ تا ۵ سانتیمتر می باشد (۹) و همچنین قطر پایه در محل پیوند در فاصله زمانی ۲۰ روز پس از کاشت بذر مورد بررسی قرار گرفت. برای اندازه گیری میزان تندش و رشد دان نهال تا ارتفاع مورد نظر در هر پایه از بین تمام پایه ها، درصد بذریهایی را که تندیده و طول ساقه آن ها به ۳ تا ۵ سانتیمتر رسید، محاسبه گردید. در رابطه با اندازه گیری قطر پایه در ناحیه پیوند، ۲۰ روز پس از کاشت بذر از هر پایه ۵ نمونه بطور تصادفی انتخاب شده و قطر آن ها در ناحیه پیوند اندازه گیری شده و میانگین آن ها محاسبه گردید.

نتایج و بحث

مقایسه پایه های مختلف از نظر درصد موفقیت ریز پیوندی

شرایط انجام ریزپیوندی، محیط کشت مورد استفاده و شرایط نگهداری گیاهان پیوندی در این پژوهش به طور کامل یکسان در نظر گرفته شد و از یک نوع پیوندک نیز استفاده گردید اما واکنش پایه های مورد نظر به ریزپیوندی و در پایان درصد پیوندهای موفق متفاوت بود.

از بین پایه های مورد استفاده بذر فلائینگ دراگون تندش قابل قبولی نداشت. در بسیاری از تکرارها درصد تندش صفر و در بعضی دیگر تعداد دان نهال های به دست آمده بسیار کم بود که در بخش بعدی شرح داده خواهد شد. بنابراین با توجه به تعداد بسیار اندک دان نهال تولیدی، این پایه حذف گردید و آزمایش ها روی ۵ پایه دیگر متمرکز گردید.

با توجه به اینکه موفقیت پیوند دو حالت موفق یا نا موفق دارد، همانند سایر گزارش ها (۹، ۱۰، ۱۱، ۱۳) در این پژوهش میزان موفقیت با درصد گزارش گردیده است. آن چنان که در جدول ۱ مشاهده می شود پایه ترویرسیترنج بیشترین میزان موفقیت پیوند (۴۰٪) را دارا بود و پس از آن پایه نارنج بیشترین درصد موفقیت (۳۳/۸٪) را نشان داد. اما درصد موفقیت روی پایه پونسیروس صفر بود.

پژوهش‌های ناوارو و همکاران (۱۱) که گزارش کردند پایه ترورسیترنج برای پرتقال، نارنگی، گریپ فروت و کومکوات مناسب است، مشابه نتایج این پژوهش می‌باشد اما ادریس و بورگر (۲) پایه کاریزو سیترنج را در مقایسه با ترورسیترنج برای پرتقال، والنسیا^۱ مناسب تر تشخیص دادند.

جدول ۱- مقایسه درصد ریزپیوندهای موفق پرتقال نافی روی پایه‌های مختلف.

Table 1. Comparison between percentage of successful micrografts of 'Navel' orange on different rootstocks.

درصد ریزپیوندهای موفق (درصد) Successful micrografts(%)	نوع پایه Kind of rootstock
40	ترورسیترنج Troyer citrange
20	سیتروملو Citromelo
0	پونسیروس Poncirus
33.3	نارنج Sour orange
23.8	لیمو Lime

در مرکبات پایه‌هایی که برگ‌های سه‌قسمتی دارند در مقایسه با پایه نارنج و لیمو که برگ‌های معمولی دارند از نظر تشخیص آسان جوانه در حال رشد پیوندک از جوانه‌های خود پایه که در اثر قطع کردن انتهای پایه تحریک به رشد شده‌اند دارای برتری هستند. بنابراین، پایه ترورسیترنج بدلیل سه‌برگچه‌ای بودن دارای این برتری نیز می‌باشد.

مقایسه میزان آمادگی پایه‌های مختلف برای ریزپیوندی

میزان آمادگی پایه‌ها برای ریز پیوندی از نظر میزان تندش بذر و رشد دان نهال تا رسیدن به ارتفاع مناسب و همچنین قطر مناسب به فاصله زمانی ۲۰ روز پس از کاشت بذر آن‌ها در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۲ آمده است.

پایه سیترنج پس از ۲۰ روز بیشترین درصد پایه‌های آماده را از نظر میزان تندش بذر و رشد دان نهال تا رسیدن به ارتفاع مناسب برای ریزپیوندی تولید کرد (۸۱/۸٪) که بیشتر از سایر پایه‌ها می‌باشد. نتایج پژوهش‌های مختلف (۹، ۱۱) نشان داده که این پایه حتی ۱۵ روز پس از کاشت آمادگی لازم برای ریزپیوندی را داراست. در رابطه با پایه نارنج، موخوپادهیای و همکاران (۶) دان‌نهال‌های ۲۱ روزه را مناسب تر تشخیص دادند، پس از گذشت این دوره دان‌نهال‌ها به ارتفاع مناسب که بین ۳ تا ۵ سانتیمتر است می‌رسند. ناوارو (۹) نیز در پژوهش‌های خود ارتفاع ۳ تا ۵ سانتیمتر را مناسب تشخیص داد. بذرهایی که قدرت تندش ندارند و یا دیر می‌تندند پس از گذشت این مدت به ارتفاع و قطر مناسب نخواهند رسید. نتیجه اندازه‌گیری میانگین قطر پایه‌ها در محل پیوند ۲۰ روز پس از کاشت بذر در جدول ۲ آمده است:

جدول ۲- درصد پایه های آماده برای ریز پیوندی از نظر میزان تندش بذر و رشد دان نهال تا رسیدن به ارتفاع مناسب و میانگین قطر پایه ها در محل پیوند به فاصله ۲۰ روز پس از کاشت بذر.

Table 2. Percentage of qualified rootstocks for micrografting and mean of diameter at grafting union 20 days after seed sowing.

نوع پایه Kind of rootstock	درصد پایه های آماده برای پیوند Prepared rootstocks for micrografting (%)	میانگین قطر پایه در محل پیوند (میلی متر) The mean of stem diameter at grafting union (mm)
ترویرسیترنج Troyer citrange	81.8	1.7
سیتروملو Citromelo	19.6	1.2
پونسیروس <i>Poncirus</i>	50.8	1.48
فلاینینگ دراگون Flying dragon	6.7	1.62
نارنج Sour orange	32	1.48
لیمو Lime	47.4	1.12

در رابطه با بذر فلاینینگ دراگون تنها ۶/۷٪ از دان نهال ها پس از ۲۰ روز آمادگی پیوند داشتند. در بسیاری از تکرارها بذور این پایه هرگز تندش نداشتند برای مثال، در یکی از تکرارها از ۳۴ بذر کاشته شده حتی یک مورد تندش مشاهده نشد و یا در تکرار دیگر از ۲۷ بذر تنها ۴ بذر تندیدند. تندش بسیار کمی که در این پایه مشاهده شد شاید مربوط به این باشد که بذرها بی رنگ پس از جداسازی از میوه کشت شدند. نتایج این آزمایش نشان داد که پایه ترویرسیترنج در مقایسه با سایر پایه ها تندش خوبی داشته و در کمترین زمان ممکن پایه های آماده پیوند تولید کرده است.

پایه ترویرسیترنج بیشترین قطر (۱/۷ میلی متر) را در بین پایه های مورد آزمایش داشت و تجربه های عملی نیز نشان داد که ایجاد برش های لازم و قرار دادن پیوندک در محلی که بیشترین تماس را با لایه زاینده داشته باشد، در این پایه به مراتب آسان تر است. ناوارو (۹) نیز بیان داشت که ارتفاع و قطر پایه شاخص های مناسبی برای تشخیص زمان آمادگی پایه محسوب می شوند. او قطر ۱/۶ تا ۱/۸ میلیمتر در محل پیوند را مناسب تشخیص داد که با نتایج این پژوهش سازگار است.

نتیجه گیری کلی

در یک نتیجه گیری کلی از این پژوهش باید عنوان کرد که پایه ترورسیترنج هم از نظر درصد پیوندهای موفق و هم آمادگی پایه از نظر میزان تندش بذور و رشد دان نهال تا رسیدن به ارتفاع مناسب و قطر لازم در محل پیوند در بین پایه‌های مورد آزمایش بهترین نتیجه را نشان داده و به عنوان پایه ای مناسب برای ریزپیوندی توصیه می گردد.

سیاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شیراز و دانشکده کشاورزی که بودجه و تسهیلات لازم برای اجرای این پژوهش را فراهم نمودند، قدردانی می گردد.

REFERENCES

منابع

1. Bitters, W.P., T. Murashige, T.S. Rangan and E. Nauer. 1972. Investigation on establishing virus-free citrus plants through tissue culture. In: W.C. Price (ed.), Proc. 5th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol., (IOCV), Univ. Fla. Press, Gainesville, U.S.A. 267-271.
2. Edriss, M.H. and D.W. Burger. 1984. Micro-grafting shoot-tip culture of citrus on three trifoliolate rootstocks. Sci. Hort. 23:255-259.
3. Hosoi, T., H. Machida, A. Ooishi and T. Miura. 1979. Studies on shoot-tip grafting of citrus. Bull. Facult. Agr. Shizuoka Univ. 29:11-17.
4. Ioannou, M., A. Kyriakou and N. Ioannou. 1991. Production of healthy Lapithos lemon plants by shoot-tip grafting *in vitro*. Tech. Bull. Cyprus Agr. Res. Inst. No. 139. 7 p.
5. Morita, A. and M. Koizumi. 1995. An improved shoot-tip grafting method for virus free *Citrus* plants. Proc. Assoc. Plant Protect. Kyushu. 41:43-46.
6. Mukhopadhyay, S., R.A. Jaishree, B.C. Sharma, A. Gurung, R.K. Sengupta and P.S. Bath. 1997. Micropropagation of Darjeeling orange (*Citrus reticulata* Blanco) by shoot-tip grafting. J. Hort. Sci. 493-499.
7. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
8. Murashige, T., W.P. Bitters, E.M. Rangan, E.M. Nauer, C.N. Roistacher and P.B. Holliday. 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones. HortScience 7:118-119.
9. Navarro, L. 1981. Citrus shoot-tip grafting *in vitro* (STG) and its applications: a review. Proc. Intern. Soc. Citricult, 452-456.
10. Navarro, L., J. Juarez, J.A. Pina and J.F. Ballester. 1984. The citrus quarantine station in Spain. Proc. 9th. Conf. Intern. Organ. Citrus Virol. (IOCV), Riverside, CA, U.S.A. 365-370.
11. Navarro, L., C.N. Roistacher and T. Murashige. 1975. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100:471-476.
12. Rangan, T.S., T. Murashige and W.P. Bitters. 1968. *In vitro* initiation of nucellar embryos in monoembryonic citrus. HortScience 3:226-227.

13. Shavsavar, A. and M. Khosh-Khui. 1994. The effects of several variables on shoot-tip grafting of 'Clementine' mandarin onto 'Troyer' citrange. Iran Agr. Res. 13:1-18.