إخلاف النباتات وحفظ كالس أصول الحمضيات المستحث من زراعة البويضات غير البالغة خارج الجسم الحي

عماد احمد محمد الحافظ محمد عباس سلمان
الشركة العامة للبستنة والغابات – وزارة الزراعة كلية الزراعة – جامعة بغداد

المستخلص

انجزت هذه الدراسة للحصول على خطوط الكالس الجنيني لاربعة اصول من الحمضيات (النارنج والبرتقال المحلي والسوينكل سترومیلو واللالنكي كليوبترا) وذلك بزراعة البويضات المعزولة من ثمار غير بالغة بعمر 20-60 يوما" بعد الازهار . بعد ثلاثة اشهر من زراعة البويضات (بعمر 40 يوما" بعد الازهار) في وسط MS (6% سكروز) المجهز بـ 11 ملغم/لتر كاينتين امكن الحصول على كالس جنيني من بويضات البرتقال واللالنكي كليوبترا. بعد اعادة زراعة كالس البرتقال ، بفاصل شهرين بين كل اعادة زراعة ،اصبح متكيفا" للكاينشين بعد النقلة الخامسة . واحتفظ بقابليته على النمو في وسط MT (6% سكروز) وتكون الاجنة في وسط MT (8% لاكتوز) خلال السنتين التي استغرقتها الدراسة ومن دون حصول تغاير في العدد الكروموسومي (2n=2x=18).

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences, 36(3) : 13 - 20, 2005 Al-Hafidh & Salman

IN VITRO PLANT REGENERATION AND PRESERVATION OF CITRUS ROOTSTOCK INDUCED CALLUS FROM IMMATURE OVULES

I. A. M. Al-Hafidh
The General State of Horticulture and Forestry
Ministry of Agriculture

M. A. Salman
Dept. of Horticulture
College of Agriculture - Univ. of Baghdad

ABSTRACT

Assays were performed to obtain embryogenic lines from four citrus rootstock by *in vitro* culture of ovules collected from immature fruits 20-60 days after anthesis. Three months after inoculation, embryogenic callus was obtained from sweet orange and Cleopatra mandarin ovules (40 day after anthesis) that cultured on MS medium supplemented with 6% sucrose and 11mg/L kinetin. Following five subcultures, this callus became habituated to kinetin. After subculture in MT medium (6% sucrose) with intervals of two months for about two years, such callus line maintained an embryogenic potential and without chromosome number variation (2n=2x=18). The effective media for producing embryoids from calli was MT medium modified with 6.8%lactose.

المقدمة

ان قابلية اي صنف من اصناف الحمضيات على استحثاث تكوين الكالس الجنيني ،من خلال زراعة البويضات غير البالغة خارج الجسم الحي ،واحتفاظ الكالس بمقدرته على النمو لمدد طويلة بأعادة زراعته دوريا" من دون ان يفقد القابلية على تكوين الاجنة واخلاف النباتات ،يعد الاداة الاساسية في الدراسات المتعلقة بعزل وزراعة ودمج البروتوبلاست (19,11,10,7,6,5,4) وانتخاب الخلايا الطافرة (19,17,12,6) ونقل الجينات (6, 9) وحفظ المصادر الوراثية وانشاء بنوك الجينات (17,6) وهذا يتطلب توفر طريقة عمل واضحة لاخلاف النباتات من الكالس (20,19,17,7,6).

ان ندرة الدراسات الخاصة بأستحثاث تكوين الكالس وحفظه (بأعادة زراعته دوريا") واخلاف الاجنة والنباتات من كالس الحمضيات في العراق قادتنا الى اجراء هذا البحث لكي يعد نقطة شروع نحو دراسات قادمة تستعمل فيها التقانات الحديثة في تربية الحمضيات.

المواد وطرائق العمل

1-استحثاث انسجة الكالس من البويضات :

جمعت الثمار الصغيرة بعد 90,60,40,20 يوما" بعد الأزهار الكامل من اشجار النارنج *Citrus aurantium* L) والبرتقال المحلي (*C.sinessis* L.osb.) واللانكي كليوبترا (Creshin Hort Ex Tan) والسوينكل سترومیلو (*Poncirus trifoliate* C.*paradisi Macf* X Raf).

درس تأثير وسط Murashige MS و Skoog (14) مضافا" اليه 6% سكروز كوسط اساس بوجود 50 مايكرومولار (≈ 11 ملغم/لتر) كاينتين (K) او 500 ملغم/لتر مستخلص المولت

•تاريخ استلام البحث 2004/5/14 ، تاريخ قبول البحث 2005/3/28
(*) بحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الأول.

(*)Part of Ph. D. dissertation for the first author.

Malt Extrat (ME) او كليهما في استحثاث نشوء انسجة الكالس من البويضات المستأصلة من الثمار الصغيرة . عقمت الثمار سطحيا" بغمرها بالكحول الاثيلي المركز 95% ولمدة 10 دقائق ثم تمريرها على اللهب (1) . جرت عملية استئصال البويضات في ظروف معقمة اذ قطعت كل ثمرة الى نصفين وازيلت منها البويضات بأستعمال ابرة جراحية والاستعانة بالمجهر التشريحي. في حالة وجود بذور غير بالغة في الثمار ذات العمر 60-90 يوما" ، تمت ازالة اغلفة البذرة واستئصال الاجنة منها. زرع ما يقارب 10مل بويضات او 5اجنة غير بالغة في انابيب زراعة بأبعاد 20X150 ملم تحتوي على 10مل من الوسط الغذائي وبواقع 48 مكررا" لكل معاملة وحضنت الزروعات بدرجة حرارة 26+1 م واضاءة خفيفة وبشدة 100 لوكس لمدة 16 ساعة يوميا" .جمعت النتائج بعد ثلاثة اشهر من الزراعة وقدرت نسبة الكالس الابيض الهش Friable والكالس الأخضر Firm والاجنة العرضية adventitious embryos (شكل1) .

2-إدامة الكالس :

استمر نقل الكالس المستحث (الأبيض والأخضر) كل شهرين الى وسط غذائي جديد يتضمن مكونات الوسط السابق ذاته ولمدة سنة تقريبا".

3-اختبار تأثير تراكيز فيتامينات وسطMT في نمو الكالس الابيض :

بهدف الإسراع في نمو الكالس جرى اختبار اضافة فيتامينات وسط Murashige MT وTucker (15) مضافا" اليه 6% سكروز بوجود 11 ملغم/لتر (K) في نمو كالس البرتقال. حسبت الزيادة بالوزن الطري بعد 35 يوما" من الزراعة.

4-اختبار قابلية الكالس الابيض في التكيف للسلايتوكاينين (K)

جرى نقل الكالس بعد اعادة الزراعة التجزيئية الخامسة Subculture الى وسط MT (6%) سكروز ومن دون منظم النمو (K). قيست الزيادة بالوزن الطري بعد 35 يوما".

في جميع تجارب نمو الكالس زرعت 10 مكررات (في كل مكرر 100 ± 2 ملغم كالس) على 10 مل من الوسط داخل انابيب بأبعاد 20×150 ملم وحضنت الزروعات في درجة حرارة 26 ±1م. وإضاءة خفيفة 100 لوكس لمدة 16 ساعة/يوم.

5-تكوين الاجنة :

جرى اختبار أنواع مختلفة من السكريات في تكوين الاجنة من انسجة الكالس الأبيض. استعمل وسط MT مضافا" اليه 0.2 مولار من كل من اللاكتوز والكالكتوز والسوربتول والسكروز . كما جرى اختبار تداخل 0.1 مولار من اللاكتوز مع الكالكتوز واللاكتوز مع السوربتول .زرعت خمسة مكررات في كل مكور 200 ملغم من الكالس على 25 مل من الوسط داخل دوراق حجمية سعتها 100 مل وحضنت الزروعات في درجة حرارة 26 ± 1 درجة مئوية وشدة اضاءة 1000لوكس لمدة 16 ساعة يوميا". سجل عدد الاجنة المتكونة التي يزيد قطرها على 0.5 ملم بعد شهرين من الزراعة.

بعد الحصول على نتائج التجربة اعيد الاختبار المرة الثانية وبالطريقة ذاتها. لكن جمعت النتائج بعد شهرين من الزراعة التي تضمنت اعادة زراعة الكالس على وسط جديد بعد شهر من الزراعة.

6-انبات الاجنة : موضحة في النتائج والمناقشة.

7-اقلمة النباتات:

رفعت النباتات الكاملة التي تم الحصول عليها من زراعة الانسجة وغسلت جذورها جيدا"بماء الحنفية لازالة ما تبقى من الاكار. نقلت الى وسط سائل يتكون من نصف تركيز املاح وسط MS فقط ولمدة 15 يوما" داخل حاضنة الزروعات بدرجة حرارة 26±1 ^{0}م واضاءة 2000 لوكس. زرعت بعدها في وسط معقم خليط من ثلاثة اجزاء بتموس وجزء مزيج داخل احواض زجاجية بأبعاد (30×30×60) سم ولمدة شهرين داخل الحاضنة ايضا". بعد الاسبوع الاول عملت فتحة تهوية من الاعلى وازدادت تدريجيا" لحين اقلمة النباتات. نقلت النباتات المتأقلمة الى سنادين صغيرة تحتوي على خليط من المزيج والبيتموس والسماد العضوي بنسبة 2:1:1.

8-دراسة العدد الكروموسومي :

لغرض دراسة ثبات العدد الكروموسومي للنباتات الناتجة من زراعة الانسجة اجري الفحص المجهري لخلايا قمم الجذور وبعد وضعها في ماء بارد 6 درجة مئوية لمدة 24 ساعة تم تثبيتها بوساطة ايثانول : حامض الخليك الثلجي (1:3) لمدة 24 ساعة ايضا" ومن ثم تصبيغها بوساطة صبغة lactopropionic orcein لمدة 3 ساعات استنادا" الى Oiyama (16).

9-التحليل الاحصائي :

نفذت التجارب بأستعمال التصميم التام التعشية CRD وقورنت المتوسطات استنادا" الى اصغر فرق معنوي (L.S.D) وعلى مستوى احتمال 5% و10%.

النتائج والمناقشة

1-استحثاث أنسجة الكالس من البويضات :

بعد ثلاثة اشهر من زراعة البويضات أمكن الحصول على كمية قليلة من الكالس الأبيض المتفكك Friable في البرتقال المحلي واللالنكي كليوبترا ومن عدد قليل جدا" من البويضات التي عمرها 40 يوما" بعد الأزهار ، المزروعة على وسط MS (6%سكروز) + 11 ملغم/لتر K. بينما لم يلاحظ مثل الكالس في النارنج والسوينكل ستروميلو ولجميع المعاملات (جدول 1) في حين كان تكوين الكالس

جدول 1. تأثير عمر الثمار بعد التلقيح والوسط الغذائي في تكوين الكالس من البويضات في اربعة اصول من الحمضيات

(بعد ثلاثة اشهر من الزراعة)

الوسط الغذائي +الإضافات	النوع	20يوم بعد الازهار (أ)			40يوم بعد الأزهار (أ)			60يوم بعد الأزهار (أ)			90بعد الأزهار (ب)		
		كالس ابيض هش (ج)	كالس اخضر صلب (ج)	اجنة عرضية (ج)	كالس ابيض هش (ج)	كالس اخضر صلب (ج)	اجنة عرضية (ج)	كالس ابيض هش (ج)	كالس اخضر صلب (ج)	اجنة عرضية (ج)	كالس ابيض هش (ج)	كالس اخضر صلب (ج)	اجنة عرضية (ج)
MS(6%سكروز) +11ملغم /لتر K	ن	–	++++	–	–	++++	–	–	+++	–	–	–	+++
	ب	–	+++++	–	+	++++	–	–	++++	–	–	–	+++
	س	–	+++++	–	–	++++	–	–	++++	–	0	0	0
	ك	0	0	0	+	+++	–	0	0	0	–	–	++
MS(6%سكروز) +11ملغم /لتر K+500ملغم/لتر ME	ن	–	++++	–	–	++++	–	–	+++	–	–	–	+++
	ب	–	+++++	–	–	++++	–	–	++++	–	–	–	+++
	س	–	+++++	–	–	++++	–	–	++++	–	0	0	0
	ك	0	0	0	+	+++	–	0	0	0	–	–	++
MS(6%سكروز +500ملغم/لتر ME	ن	–	+++	–	–	++	–	–	+	+	–	–	+++++
	ب	–	+++	–	–	+++	–	–	++	+	–	–	+++++
	س	–	+++	–	–	+++	–	–	++	+	0	0	0
	ك	0	0	0	–	++	–	0	0	0	–	–	+++

(أ) 48 مكرر كل مكرر يحتوي على 10بويضات

(ب) 48مكرر كل مكرر يحتوي على 5بويضات او اجنة غير بالغة

(ج) التقدير بالمشاهدة : (0) = لا تتوفر بيانات،(–) = لا يوجد،(+) = 1-20 % ، (++) = 21-40 % ،(+++)= 41-60%، (++++) = 61-80%،(+++++)= 81-100%

ن= نارنج،ب=برتقال محلي،س=سوينكل ستروميلو،ك= اللالنكي كليوبترا

الأخضر الصلب هو الأكثر شيوعا" في جميع الأنواع المدروسة (شكل 1) وفضلا" عن الكالس تكونت أجنة عرضية بنسب قليلة في النارنج والبرتقال والسويتكل من زراعة البويضات (او الأجنة غير البالغة) التي عمرها 60 يوما" بعد الأزهار والمزروعة على وسط MS (6% سكروز) + 500 ملغم/لتر ME (شكل 1).

تميز الكالس الابيض بمظهره الحبيبي واختلفت كميته الناتجة اعتمادا" على نوع الوسط والنوع النباتي. ان الكالس بهذه المواصفات يعد كالسا" جنينيا" (18,7,6). في بداية تكوين الكالس الابيض كان حجمه صغيرا" جدا" ومن الصعب رؤيته بالعين المجردة ثم استمر بالنمو تدريجيا" بعد شهرين من نقله الى وسط جديد. أجرى العمل بعدها على تنمية كالس البرتقال فقط وذلك لفقدان كالس كليوبترا بسبب التلوث الذي حصل بعدالنقلة الاولى. لوحظ تحسن في نمو الكالس الابيض للبرتقال بعد نقله الى الوسط السابق ذاته ولكن بأضافة فيتامينات وسط MT (جدول 2) ولو ان هذه الزيادة كانت معنوية بمستوى احتمال 10% كما لوحظ امكانية نمو وتكيف الكالس للكاينتين بعد النقلة الخامسة وان تعمير الكالس aging لم يؤثر في معدل النمو (جدول 2) اما بخصوص الكالس الاخضر الصلب فلم يتم التمكن من الحصول على اجنة ونبيلات من هذا الكالس عند استعمال المعاملات الخاصة بنمو الكالس واخلاف الاجنة من الكالس.

شكل 1. من اليمين إلى اليسار : الأجنة العرضية الكالس الأخضر الصلب والكالس الأبيض الهش بعد ثلاثة اشهر من زراعة البويضات

جدول 2. تأثير نوع الوسط ومنظم النمو ودورة الزراعة في نمو الكالس الجنيني للبرتقال

تسلسل دورة الزراعة subculture	الغرض من المعاملة	الوسط+ منظم النمو (ملغم/ لتر)	الوزن* الطري(أ)	الانحراف المعياري
الرابعة	قياس معدل نمو الكالس	MS (6% سكروز)+K(11)	277.2	140.62
الخامسة	تأثير فيتاميتات وسط MTفي معدل نمو الكالس	MS(6%سكروز)+K (11)	219.3	136.99
		MT (6% سكروز) + K(11)	431.1	139.76
السادسة	تأثير تكيف الكالس للكاينتين K	MT (6%سكروز) +K(11)	370.4	76.40
		MT (6%سكروز)	394.6	169.96
بعد ستتين	تأثير تعمير الكالس (ب) في معدل النمو	MT(6%سكروز)	315.8	87.99

(أ): الوزن الابتدائي :100 ملغم

(ب): تعمير الكالس/ترك الكالس لمدة 4 اشهر داخل اوعية الزراعة قبل النقل الى وسط جديد .

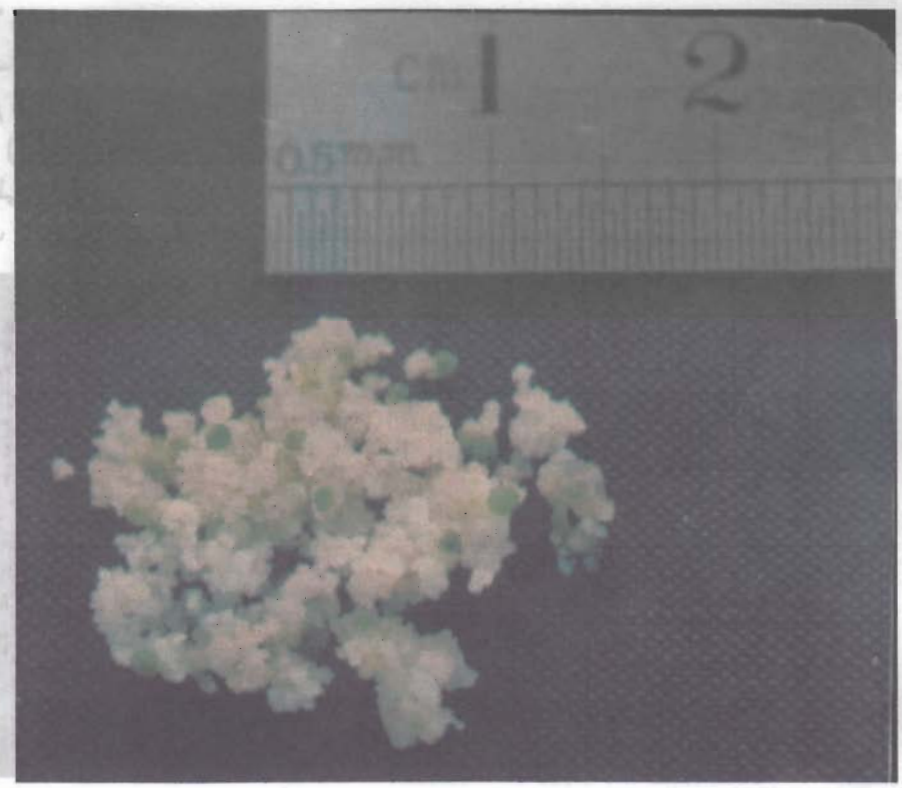
* الفروق المعنوية احصائيا" بمستوى احتمال 10% بين الوزن الطري للمعاملة الاولى مع الثالثة والثانية مع الثالثة، والاولى مع الخامسة ، والثالثة مع الخامسة.

ان استحثاث نشوء الكالس الجنيني من البويضات سبق وان انجز من قبل العديد من الباحثين بأستعمال وسط MSاو MT مضافا" اليه 500ملغم/لتر ME ،وغالبا" ما كان يرافق نشوء الكالس ظهور الاجنة العرضية (15.13) ويرى Hidaka وOmura (7) ان وسط MS (6.8%سكروز) + 11 ملغم/لتر كاينتين (K) ملائم لاستحثاث نشوء الكالس من البويضات والاجنة غير البالغة في عموم الحمضيات وهذه اول دراسة في العراق حول استحثاث نشوء الكالس من البويضات والتي من خلالها تبين ان الاوساط الثلاثة (جدول 1) شجعت تكوين الكالس الاخضر الصلب وان هذا النوع من الكالس صعب الاختلاف ونشأ من غلافي البويضة Integuments(15). بينما اضافة 500 ملغم/لتر ME فقط كان لها تأثير في نشوء الاجنة العرضية في البويضات (او الاجنة غير البالغة) التي بعمر 60 و 90 يوما" من الأزهار (جدول1).

وهذا يتفق مع ما وجده Moor (13). اما عند استعمال تركيز عالي من K(11 ملغم/ لتر) فقد كان ملائم لاستحثاث الكالس الجنيني وهذا يتفق مع اخرين (6 و7) وتتعارض نتائج دراستنا مع دراسات اخرى ، فقد وجد ان اضافة 500 ملغم/لتر ME فقط الى الوسط MS يكفي لاستحثاث الكالس الجنيني في البويضات التي بعمر 1-3 اشهر بعد التلقيح في الكثير من انواع الحمضيات ومنها البرتقال والنارنج واللالنكي (19,18,5,4) .

2-نشوء الاجنة :

تكونت الاجنة بعد شهرين من زراعة الكالس على الاوساط التجريبية التي تضمنت اعادة الزراعة كل شهر على الوسط ذاته (دورتا زراعة re culture) بفارق معنوي عما هو عليه في حالة استمرار بقاء الكالس لمدة شهرين على وسط الزراعة (دورة زراعة واحدة) وبالمقارنة يتضح ان دورتي زراعة هي الافضل (جدول 3) كما ظهرت اختلافات معنوية بين تأثير نوع السكر ففي التأثير الفردي للسكريات كان اللاكتوز اكثر فعالية اما بخصوص التأثير التجميعي فقد تم الحصول على افضل النتائج عند اتحاد اللاكتوز مع السوربيتول وعن تأثير اللاكتوز لوحده . ان عدم نقل الكالس كل شهر الى وسط جديد كان له تأثير سلبي في تكوين الاجنة (جدول3) ويعود السبب الى محدودية الاستفادة من الوسط اذ ان الكالس الملامس لسطح الوسط هو الذي يستفاد من مكونات الوسط دون الاجزاء الاخرى لعدم تكوين منطقة انتقال بين الوسط والجزء غير الملامس له (3,2) وعند اعادة الزراعة سوف يتغير ترتيب اجزاء الكالس على الوسط الغذائي.



شكل 2. نشوء الاجنة من كالس البرتقال

جدول 3. تأثير نوع السكر ودورة الزراعة Re culture في كالس بويضات البرتقال

نوع السكر والتركيز (مولارية) بالغرام/ لتر	معدل عدد الأجنة		المعدل
	دورتا زراعة Re culture	دورة زراعة واحدة	
68 (0.2)Lactose	56.400	3.400	29.900
36(0.2)Galactose	42.400	0.600	21.500
36(0.2)Sorbitol	10.600	0.000	5.300
68(0.2)Sucrose	5.600	0.200	2.900
+34(0.1)Lactose 18(0.1)Galactose	59.000	2.800	30.900
+34(0.1)Lactose 18(0.1)Sorbitol	44.800	1.400	23.100
+18(0.1)Galactose 18(0.1)Sorbitol	58.000	4.400	31.200
المعدل	39.543	1.829	

L.S.D 5% لدورة الزراعة = 2.660 ،لنوع السكر =4.976، للتداخل= 7.037

3-انبات الاجنة:

ان الاجنة المتكونة غالبا" ماتكون صغيرة الحجم كروية (شكل 2) ولوحظ ان مثل هذه الاجنة تكون ضعيفة الانبات عند نقلها مباشرة الى وسط الانبات ، واحيانا" يتكون جذر واحد فقط دون الفرع . لذلك تمت زراعة هذه الاجنة اولا" على وسط MT+500 ملغم/ لتر ME + 40 ملغم/لتر ادنين adenen(AD) (12,11) وبعد شهرين من الزراعة امكن الحصول على اجنة بأشكال مختلفة من التطور (شكل 3) .اعطت هذه الاجنة نبيتات بعد 2-4 اشهر من زراعتها على وسط MT + 1.5 ملغم/لتر GA3 (شكل 4) .ذكر Kochba و Spiegel-Roy (12) ان الجنين يتكون من خلية مفردة ويمر بمراحله المختلفة وهي الكروية والقلبية ثم الفلقية التي تعطي نباتا" كاملا" عند انباتها ، وان الاشكال الكروية تتحول احيانا" الى بصيلات كاذبة pseudo bulbils وهذه نادرا" ما تتحول الى نبات الا عند استعمال AD او ME او تراكيز عالية من GA3 (50ملغم/لتر)(19).

شكل 3. اجنة بأشكال مختلفة من التطور في البرتقال

شكل 4. مراحل إنبات الأجنة في البرتقال

تؤكد اغلب المراجع بأن كالس بويضات الحمضيات (الملقحة وغير الملقحة) يكون منشأه من الانسجة الجويزية وذلك في انواع واصناف الحمضيات المتعددة الاجنة ، لذلك يطلق علية الكالس الجويزي nucellus callus لتميزه عن الكالس الناشئ من انسجة اخرى .وعليه فأن هذا الكالس يحمل التركيب الوراثي ذاته للنبات الام .ويبقى محافظا" على قابليته الجنينية من دون حصول تغايرات وراثية حتى بعد عدة سنين من حفظه او الاستمرار في تنميته على اوساط جديدة (6) لذلك تركز الاهتمام على هذا النوع من الكالس في الحمضيات لغرض انشاء بنوك من الكالس الجويزي للاصناف المرغوبة بهدف الحفاظ على السلالة او لاستعماله في التعديل الوراثي . في هذه الدراسة امكن انشاء بنك لكالس البرتقال البذري المحلي الذي يصلح لاجراء دراسات خاصة بالتعديل الوراثي . كما اظهرت نتائج هذه الدراسة وعلى الرغم من اطالة مدة حفظ وزراعة الكالس واستنادا" الى الفحوص المجهرية التي اجريت على قمم جذور النباتات الناتجة ،لم يتضح حصول تغاير في العدد الكروموسومي.

المصادر

1-الحافظ،عماد احمد محمد. 2002. اكثار واختلاف اصول الحمضيات خارج الجسم الحي. اطروحة دكتوراه/كلية الزراعة/جامعة بغداد.

2-سلمان ، محمد عباس. 1988 ب. اكثار النباتات البستنية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بغداد-العراق.

3-الكناني ، فيصل رشيد ناصر. 1987. زراعة الانسجة والخلايا النباتية .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة الموصل – العراق.

4-Grosser, J. W., F. G., Jr Gmitter, E. Slouzada and J. L. Chandler. 1992 a.Production of somatic hybrid and autotetraploid breeding parents for seedless citrus development. Hort Science 27: 1125-1127.

5-Grosser, J. W., F. G., Jr Gmitter, F. Sesto, X. X, Deng and J. L., Chandlers. 1992b. Six new somatic hybrids and their potential for cultivar improvement J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117:169-173.

6-Hidaka, T. 1995. A shuttle callus system .Application of tissue culture in citrus. Acta Horticulture 392 :39-48.

7-Hidaka, T. and M. Omura. 1989. Control of embryogenesis in *citrus* cell culture :Regeneration from protoplasts and attempts to callus bank. Bull. Fruit Tree Res. Stn. B. 16:1-17.

8-Hidaka, T. and M. Omura. 1992. Regeneration of somatic hybrid plants obtained by electrical fusion between Satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) and rough lemon (*C.jambhiri)* or Yuzu (*C. junos*) .Japan .J. Breed 42:79-89.

9-Hidaka, T. and M Omura. 1993. Transformation of citrus protoplasts by electroporation. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 62:371-376.

10-Kobayashi, S., I. Ikeda and H. Uchimiya. 1985. Condition for high frequency embryogenesis from orange (*Citrus sinensis* Osb). Protoplast. Plant Cell Tissue Orange Culture 4:249-259.

11-Kobayashi, S., T. Ohgawara, W. Saito, Y. Nakamura and M. Omura. 1997. Production of triploid somatic hybrids in citrus .J.Japan .Soc.Hort. Sci. 66:453-458.

12-Kochba, J. and P.Spiegel-Roy. 1977. Cell and tissue culture for breeding and developmental studies of citrus. Hort. Science 12(2):110-114.

13-Moor ,G .A. 1985. Factors affecting *In vitro* embryogenesis from un developed ovules of mature *citrus* fruit .J.Amer .Soc. Hort .Sci .100:66-70.

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

15-Murashige,T. and D .P. H .Tucker . 1969 . Growth factor requirement of citrus tissue culture. Proc. First Intl. Citrus Symp 3:1155-1161.

16-Oiyama, I. 1981. A technique for chromosome observation in root tip cells of *citrus*. Bull .Fruit Tree Res. Stn. 3:1-7.

17-Ollitrault, P. 1992. Somatic embryo – grafting .a promising technique for *citrus* breeding and propagation. Numero Special Agrumes, P. 213-218.

18-Perez, R. M., O. Mas L. Navarro and N. Duran–Vila. 1999. Production and cryoconservation of embryogenic culture of mandarin and mandarin hybrids. Plant Cell, Tissue Orange Culture 55:71-74.

19-Spiegel–Roy, P. and A. Vardi. 1984. Chapter 13. Citrus .pp. 355-372. In:Ammirato, P. V., Evans, D. A., Sharp, W. R. and Yamada,Y. (Eds.). Handbook of plant cell culture. vol. 3. crop species. MacMillan publishing Co. New York, London.

20-Starrantion, A. and P. Coponnetto. 1990. Effect of cytokinins on embryogenic callus formation from undeveloped ovules of orange. Acta Horticulture 280:191-194.