



( )

\*

: تنوع ژنتیکی از عوامل ضروری اصلاح نباتات است. ایجاد جهش (موتاسیون) در ازدیاد ذخایر متنوع ژنتیکی بسیار مؤثر و در بهبود ارقام درختان میوه و محصولات گیاهی دیگر مفید است. پیشرفت‌های اخیر در زی‌فشناسی روش‌های جدیدی را برای ریزازدیادی و دُزیایی گیاهان با صفت برتر حاصل از جهش و دگرگونی ایجاد کرده است. در این کار پژوهشی، نارنگی رقم کلمانتین به عنوان رقم مناسب که تطابق‌پذیری خوبی با شرایط جوی شمال کشور دارد انتخاب شده است. از صفات نامناسب این رقم، می‌توان تعداد زیاد دانه در میوه را نام برد. در این کار پژوهشی پرتوهای گاما به عنوان موتازن فیزیکی با دُزهای ۳۵، ۴۰، ۴۵ Gy روی جوانه‌های جانبی بعد از کشت بخشینه انتهایی و تولید گیاهان عاری از ویروس بکار برده شد. جوانه‌های پرتو دیده بر روی پایه نارنج پیوند زده شدند ( $M_1V_1$ ). برای از بین بردن کایمرا در سه نسل هرس انجام گرفت و در نهایت گیاهان  $M_1V_3$  به زمین اصلی منتقل شدند. پس از رسیدن به سن میوه‌دهی بر اساس صفات موردنظر، انتخاب صورت گرفت که در نتیجه، تعدادی درختچه با میوه‌های بدون هسته و تعدادی درختچه زودرس و دیررس بدست آمد.

STG

## Induction Mutation in Tangerine for Creating Genetic Variation to Produce Mutants With Desirable Character (using gamma rays)

M. Rahimi\*, F. Majd, E. Jahangirzadeh, S. Vedadi, E. Rahmani, N. Neshan  
Nuclear Research Centre for Agriculture and Medicine, AEOL, P.O. Box: 31485-498, Karaj - Iran

**Abstract:** Genetic variation is an essential factor for the crop breeding. Induced mutations are highly effective to enhance the natural genetic resources, and have assisted in developing the improved cultivars of fruits and other crops. The recent advances in biotechnological techniques have the potential to provide efficient methods of vegetative propagation, screening techniques and genetic improvement through the mutation. On this basis, we selected tangerine (Celemantin cv) as a well-adapted, and highly consumed citrus fruit which has a disadvantage of containing too many seeds in its flash. We applied physical mutagen ( $\gamma$ -ray) with dose rates of (35,40 and 45 Gy) for lateral bud after shoot tip grafting (stg) and production of contaminated-free plants. The irradiated buds were grafted to sour orange as root stocks ( $M_1V_1$ ) and chimera dissolved by further vegetative propagation. Finally, the  $M_1V_3$  plants were transferred to the field and after the production of the fruits, selection has been made. The results have showed that radiation was able to produce seedless, early and late ripening and cold resistance samples. Tangerine (Clemantine Cv) has also shown that it possesses a high yield of production.

**Keywords:** Mutation, Citrus, STG, Induced Mutation, Somatic Mutations, In Vitro, Mutagens

\*email: Mahrahimi@yahoo.com



رتم کلماتين به طور طبيعي «خودناسازگار»<sup>(۴)</sup> است، اما وقتی در شرايطي قرار گيرد که گرده‌هايی از درختان ديگر در اختيار آن باشد ميوه هسته‌دار توليد خواهد کرد. در صورت ايجاد تغييرات ژنتيکی و القای صفت توليد ميوه بدون نیاز به گرده، ميوه بدون هسته توليد خواهد شد [۳]. برای بر طرف‌سازی اين معضل می‌توان از پرتوتابی با اشعه گاما برای ايجاد تنوع ژنتيکی و صفات مطلوب، بدون برهم‌زدن کل ژنوم استفاده کرد.

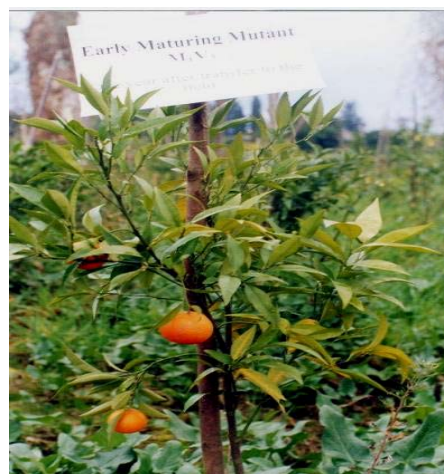
گياهچه‌ها پس از عاری شدن از عوامل بیماری‌زا وارد چرخه اصلاح می‌شوند. ابتدا جوانه‌ها مورد پرتوتابی قرار می‌گیرند، در صورتی که جهش ايجاد شده مانعی برای ادامه حیات سلول‌های بافت نباشد و این سلول‌ها قابلیت رقابت با سایر سلول‌های بافت را داشته باشند، ممکن است تقسیمات سلولی را انجام دهند و توليد بافت کایمرا نمایند. با توجه به اینکه جهش در تمام لایه‌های جنینی جوانه پرتوتابی شده امکان وقوع مساوی دارد و با توجه به تفاوت تعداد سلول‌ها در لایه‌های جنینی امکان وجود بخش‌های جهشی و غیر جهشی با اندازه‌های متفاوت در بعضی از جوانه‌های نسل بعد وجود دارد. بر همین اساس، Donini (۱۹۹۸) عملیات هرس تا سه نسل جهت امکان توليد نهال‌های غیر کایمرا را پیشنهاد داد زیرا برای رهایی از وضعیت کایمرا ادامه تکثیر به صورت غیر جنسی ضروری است [۵].

Donini در ایتالیا موفق به معرفی ۹ رقم جهشی (موتانت) در مرکبات، زيتون و سیب‌زمینی شده است. این رقم‌های جهشی دارای صفاتی مانند زودرسی ميوه، دیر گل‌دهی (برای مقاومت در برابر سرمای بهاره)، کوتاه بودن ارتفاع درخت و تغييراتی در رنگ سیب‌زمینی می‌باشند. وی در مقاله خود تحت عنوان برنامه‌های موتاسيون بریدینگ برای اصلاح گیاهانی که از طریق غیر جنسی تکثیر می‌یابند و در ایتالیا تحت کد IAEA-SM-311/25 در سمپوزيوم موتاسيون بریدینگ برای اصلاح نباتات به چاپ رسیده است اظهار می‌دارد: اصلاح از طریق موتاسيون بریدینگ به عنوان ابزاری معتبر برای اصلاح نباتات مطرح است و می‌تواند در کنار برنامه‌های اصلاحی سنتی خیلی مفید باشد. در فلسطین اشغالی Spiegel-Roy توانسته است درختان مرکبات فاقد بذر را در گریپ فروت، لیمو، پرتغال به روش موتاسيون به دست آورد. به اعتقاد این محقق، فقدان بذر در ميوه توسط تعداد اندکی از ژن‌ها کنترل می‌شود.

مرکبات<sup>(۱)</sup> از خانواده Rutaceae و زیر خانواده Aurantioideae می‌باشند؛ در این زیر خانواده ۳۳ جنس مختلف وجود دارد که ارقام متفاوت پرتقال و نارنگی را نیز شامل می‌شود [۱]. رقم Poncirus که دارای ميوه‌های ریز و پر بذر بوده و به عنوان پایه مورد استفاده قرار می‌گیرد نیز از همین زیر خانواده است (شکل ۱ درخت نارنگی).

درختان مرکبات در معرض آفت‌های متعدد قارچی، باکتریایی و ویروسی قرار دارند. اندام‌های مختلف گیاه از جمله برگ، شاخه، تنه، ریشه یا ميوه‌ها ممکن است به این آفت‌ها مبتلا شوند. برای جلوگیری از این آفت‌ها باید گیاهانی که وارد چرخه اصلاح می‌شوند عاری از عوامل بیماری‌زا باشند. بیماری‌های مرکبات در همه نواحی مرکبات خیز مشاهده نمی‌شوند؛ در شرایط آب و هوای ایران فقط برخی از عوامل بیماری‌زا دیده می‌شود. بسیاری از ویروس‌ها که از طریق مواد گیاهی آلوده از چندین دهه گذشته وارد کشور ما شده‌اند همچنان شیوع دارند [۲]. با استفاده از تکنیک میکرو پیوند (STG)<sup>(۲)</sup> که عبارت است از پیوند زدن بافت بخشینه<sup>(۳)</sup> انتهایی شاخه‌های جوان به طول تقریبی ۰/۱ تا ۰/۲ میلی‌متر بر روی پایه، می‌توان گیاه عاری از ویروس پرورش داد [۳]. ناحیه بخشینه بنابر دلایل زیر ممکن است عاری از ویروس باشد:

- رشد سریع این ناحیه
- عدم وجود آوند
- وجود مواد شیمیایی نامناسب برای رشد ویروس [۴].



درخت نارنگی.

نمونه‌های موفق به گلدان انتقال داده شدند تا پس از رشد، برای تکثیر به عنوان پیوندک مورد استفاده قرار گیرند. پیوندک نارنگی کلمانتین از درختان مادری سالم تهیه و با محلول کاپتان ضدعفونی شد و سر شاخه‌های حامل پیوندک با چسب باغبانی پوشیده شدند شکلهای ۳ و ۴ نمونه‌های موفق پیوند را نشان می‌دهند. شاخه‌های حاوی پیوندک با دُزهای ۳۵، ۴۰ و ۴۵ گری پرتوهای گاما، پرتوتابی شده و بلافاصله به مؤسسه تحقیقات مرکبات رامسر منتقل و بر روی پایه نارنج موجود در گلدان‌های پلاستیکی در گلخانه به تفکیک پیوند زده شده ( $M_1V_1$ ) از گرفتن پیوندهای موفق سر برداری شد و پس از رشد کافی گرفتن پیوندهای موفق به هرس آنها اقدام گردید بطوریکه دو جوانه در هر نهال باقی گذاشته شد و بقیه که حدود ۵ جوانه از هر نهال بود بر روی پایه‌های نارنج موجود در کیسه پلاستیکی پیوند زده شدند ( $M_1V_2$ ).



پیوند بر پایه پونسیروس.



پیوند ناموفق.

برای تهیه پایه، هم از بذر کامل استفاده شد و هم از بذرهایی که درون میوه‌های گیاه بصورت نارس از درخت چیده شدند. برای آلودگی زدایی، بذرها را به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰٪ و به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ۲۰٪ هیپوکلرید سدیم قرار داده و سه بار با آب مقطر استریل شستشو، سپس پوسته روی آن جدا شد. در مورد بذرهایی که درون میوه قرار داشتند، ابتدا میوه‌ها را در محلول ۱۰٪ هیپوکلرید سدیم قرار داده و پس از خارج کردن بذرها و جداسازی پوست روی آنها در شرایط استریل، دوباره با محلول ۲۰٪ هیپوکلرید سدیم به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و در محیط MS حاوی ۷٪ آگار قرار داده و در شرایط تاریکی مطلق با دمای محیطی ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت چند روز، بذرها شروع به رشد کرده و بعد از ۲ یا ۳ هفته از گیاهچه‌هایی که اپیکوتیل آنها در محل پیوند ۵-۳ سانتی‌متر طول و ۱/۸-۱/۶ میلی‌متر قطر داشت استفاده شد؛ قسمت انتهایی ریشه از ۴ تا ۶ سانتی‌متری لبه قطع و لپه‌ها و جوانه‌های فرعی هم از گیاهچه‌ها حذف شدند.

برگ‌های اولیه و بخش انتخابی اپیکوتیل نیز بریده شد به نحوی که ارتفاع اپیکوتیل به ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر رسید. برای ایجاد شکاف بصورت L ابتدا یک شکاف افقی سپس دو شکاف عمودی ایجاد گردید. برای تهیه پیوندک، از جوانه‌های نارنگی استفاده شد (شکل ۲). برای ایجاد جوانه تازه، باید به گیاه تنش وارد شود. برای این منظور، ۴۵ الی ۵۰ روز قبل از آماده شدن پایه، کلیه برگهای گیاهچه‌های نارنگی قطع می‌شوند. جوانه‌های تازه که دارای ساقه و برگ تُرد و ظریف بودند، پس از ضدعفونی کردن، همراه با پایه‌ها برای تیمار، درون محلول‌های ۲.۴-D10 $\mu$ g/L و BAP5mg/L، مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس به کمک استریومیکروسکوپ، پس از حذف برگ‌های اضافی در حالی که مریستم حاوی ۳ برگچه ابتدایی بطول‌های ۱/۱ و ۰/۲ میلی‌متر بود، بر روی پایه‌ای که قبلاً توسط شکاف‌های افقی و عمودی ایجاد شده بود قرار داده شد و به همراه نمونه‌های شاهد (بدون تیمار هورمونی) به محیط MS مایع حاوی ۷۰ گرم در لیتر ساکارز و ویتامین‌های محیط وایت منتقل شدند، و مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در تاریکی با شرایط دمایی ۲۹ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده سپس به محیط دیگر با رژیم نوری ۱۰۰۰ لوکس و دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند.



نگهداری شوند افزایش می‌یابد. تداوم توان جوانه‌زنی بذرهایی که درون میوه‌های نارس می‌باشند بیشتر است. دوبار استریل کردن بذرها، در کاهش آلودگی‌های قارچی آنها بسیار مؤثر بود. کندن پوسته خارجی این بذرها سبب کاهش زمان جوانه‌زنی آنها می‌شود.

قبل از اینکه پیوندک شروع به رشد کند تعداد زیادی جوانه نابجا در محل برش رشد می‌کرد که می‌بایست همه آنها قطع شوند، تا پیوندک امکان رشد بیشتری داشته باشد.

در ۴۰٪ از نمونه‌هایی که با هورمون 2.4-D تیمار شده بودند و در ۱۶٪ از نمونه‌ها که با هورمون BAP تیمار شدند پیوند با موفقیت همراه بود، اما در نمونه‌های شاهد میزان موفقیت پیوند ۶٪ بود (جداول ۱ و ۲).

در مشاهدات مزرعه‌ای طی بررسی دو ساله:

- با توجه به زودرسی و رنگ‌گیری میوه‌ها، تعداد ۱۰ نوع موتانت زودرس شناسایی شد.
- با در نظر گرفتن دیررسی میوه‌ها بر حسب تأخیر در رنگ‌گیری آنها، تعداد ۱۳ نوع موتانت دیررس شناسایی شد. در بعضی از موتانت‌ها از نظر شکل ظاهری میوه، تغییرات فاحشی نسبت به کلمانتین دیده می‌شود.

خلاصه نتایج تجزیه واریانس تأثیر پیش تیمار و ساکارز بر درصد

موفقیت آمیز بودن پیوند.

پیش تیمار	۱	۴۷۷/۰۴**
ساکارز	۳	۲۵۶۲/۷۹**
ساکارز×پیش تیمار	۳	۶۱۰/۴۶**
خطا	۱۶	۷۳/۳۶
CV	-	۱۷/۳۲

\*\* اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

مقایسه میانگین غلظت‌های ساکارز بر درصد موفقیت آمیز بودن

پیوند.

(g.l <sup>-1</sup> )	
۷۰	۲۸/۳۳ a
۸۵	۱۴/۶۷ b
۱۰۰	۳/۸۳ c
۱۱۵	۲/۶ c



پیوند موفق.

پس از رشد کافی نهال‌های  $M_1V_2$ ، بار دیگر به هرس آنها اقدام شد و در هر نهال دو جوانه باقی گذاشته و بقیه، حدود ۵ جوانه از هر نهال بر روی پایه‌های نارنج موجود در کیسه پلاستیکی پیوند زده شد  $M_1V_3$ . هدف از انجام پیوند مستمر از  $M_1V_1$  تا  $M_1V_3$  رسیدن به خلوص کامل در جهشی‌هاست. پس از رشد کافی نهال‌ها که بالغ بر ۱۸۷۶ اصله بودند، در زمستان ۷۹ و بهار ۸۰ قطعه زمینی در ایستگاه تحقیقات مرکبات خرم‌آباد تنکابن مشخص و نسبت به آماده‌سازی آن (تراش، گونیا کردن، گودال کنی، تهیه ترکیب خاکی مناسب) اقدام شد و نهال‌ها ضمن کد گذاری و نصب پلاک بر اساس دژ پرتودهی، ردیف و شماره درخت بر روی هر ردیف با فاصله  $1/5 \times 1/5$  متر کاشته شدند. سال‌های ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۴ نسبت به داشت (تغذیه، سمپاشی بر علیه مینوز، آبیاری، مبارزه با علف‌های هرز، قیم بستن و ...) نهال‌های هرس شده اقدام شد. با توجه به هدف طرح، که دستیابی به جهش‌هایی با صفات کیفی برتر بوده است پس از باردهی در سال‌های ۱۳۸۲ و ۱۳۸۳، مطالعه بر روی میوه آنها از دیدگاه زودرسی، دیررسی، کم‌بذری پربذری، مقاومت میوه در مقابل سرمای اتفاقی در مزرعه و میانگین وزن میوه با استفاده از ترازو، حداقل بذری، حداکثر بذری و میانگین بذری در میوه و تعیین میزان مواد جامد محلول بوسیله انکسارسنج (رفراکتومتر) در نمونه‌های ۲۵ تایی انجام گرفت.

توان جوانه‌زنی بذرهایی پونسایروس پس از گذشت ۲ ماه کاهش می‌یابد؛ چنانچه بذرها درون ظروف دربسته در یخچال



استفاده از مریستم انتهایی برای تولید گیاهان عاری از ویروس یکی از بهترین روشی بوده که گیاه ایجاد شده برخلاف درختان نوسلار (جنین‌های غیرجنسی) فاقد خصوصیات جوانی مانند پرتیغ بودن و دیر به میوه رفتن می‌باشد. در کنار این تکنیک با استفاده از گرما درمانی می‌توان بسیاری از ویروس‌ها را حذف نمود. البته باید توجه داشت با استفاده از روش گرما درمانی به همراه کشت مریستم انتهایی تعداد زیادتری از ویروس‌ها را می‌توان حذف نمود. بعضی از محققین گزارش کردند که پیش تیمار پیوندک و یا پیوندک و پایه با محلول Kin, 2,4-D و یا BAP موجب افزایش میزان موفقیت ریزپیوندی می‌شود (ادریس ۱۹۸۴) [۶]. استارانتینو و کاروسو (۱۹۸۸)، دریافتند که با فرو بردن پایه و پیوندکها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول « $0.5 \text{ mg.l}^{-1}$  BAP»، درصد جوانه‌زنی و رشد پیوندکها از ۷۳٪ به ۹۱٪ افزایش می‌یابد [۷]. پارتاساراتی و همکاران (۱۹۹۷)، نیز گزارش کردند، پیش تیمار پیوندکهای نارنگی مندارین (رقم Khasi) با محلول 2,4-D  $10 \mu\text{g.l}^{-1}$  موجب افزایش قابل توجه گیرایی پیوندها می‌گردد [۸].

مزیت کاربرد این پیش تیمارها را می‌توان به تأثیری که در تحریک تولید کالوس و جوش خوردن محل پیوند دارند نسبت داد. قند جزء بسیار مهمی از محیط کشت است و چون شرایط رشد معمولاً برای فتوسنتز کافی نیست، اضافه کردن آن به این محیط ضروری است. به طور معمول، با افزایش غلظت قند، رشد و نمو افزایش می‌یابد تا به حد مطلوبی برسد، سپس در غلظت بالا، کاهش می‌یابد (بوکسیوس ۱۹۸۶) [۹]. اکثر محققین، برای «کشت درون شیشه‌ای» مرکبات از ساکارز با غلظت‌های ۳ و ۵ درصد استفاده کرده‌اند، اما جهت ریزپیوندی، مقادیر بیشتری مورد استفاده قرار گرفته است. ناوارو و همکاران (۱۹۹۲) در تحقیقی بر روی ریزپیوندی مرکبات، بالاترین میزان موفقیت پیوندها را با غلظت  $75 \text{ g.l}^{-1}$  ساکارز به دست آوردند [۳]. جونارد (۱۹۸۶) دریافت که افزایش غلظت ساکارز از  $50 \text{ g.l}^{-1}$  -  $30 \text{ g.l}^{-1}$  به  $85 \text{ g.l}^{-1}$  موجب بهبود درصد موفقیت پیوندها از ۴۰٪ به ۹۵٪ می‌گردد [۱۰]. با توجه به گزارشهای محققان کشورهای آفریقای جنوبی، فلسطین و ایتالیا در مورد نتایج کاربرد پرتو در کاهش بذر در نارنگی کلمانتین و دستیابی به جهش‌های بی‌بذر و کم‌بذر در سایر مرکبات، از جمله گریپ فروت، لیمو و پرتغال،

از دیدگاه بی‌بذری و کم‌بذری که هدف اجرای طرح بوده است، در بررسی‌های مزرعه‌ای تعداد ۲۲۶ نوع موتانت انتخاب و از هر کدام ۲۵ عدد میوه از قسمت‌های مختلف درخت برداشت شده و در آزمایشگاه از دیدگاه میانگین وزن میوه، حداقل تعداد بذر، حداکثر میانگین تعداد بذر و درجه بریکس (مواد جامد محلول) مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به بررسی آزمایشگاهی موتانت‌ها از دیدگاه کم‌بذری یا بی‌بذری، تعداد ۶ نوع کاملاً بی‌بذر بودند و تعداد ۲۱ نوع به عنوان کم‌بذر انتخاب شدند.

از نظر رویشی، تغییرات قابل توجهی که قابلیت تمایز داشته باشند وجود نداشت.

با توجه به دژهای پرتو دهی مورد استفاده (۳۵، ۴۰، ۴۵ گری)، در نسل  $m_1v_1$  مشاهده شد که هر چه دژ پرتوها بالا رفته میزان گیرایی پیوند کاهش یافته است به طوری که تعداد نهال‌های بدست آمده در نسل  $m_1v_3$  در دژهای ۳۵، ۴۰، ۴۵ گری به ترتیب ۸۹۶، ۷۵۲، ۲۲۸ نهال پیوندی بوده است.

بین نهال‌ها ۲۰ نهال مقاوم به سرما شناسایی شد که با توجه به سرمای منطقه مازندران برای ازدیاد در این منطقه بسیار مناسب است.

تعدادی نهال دیررس با بار بسیار خوب شناسایی شد که آنها برای ازدیاد در مناطق جنوب کشور مناسبند. تعدادی نهال با مقدار بذر کمتر از ۷ عدد در هر میوه، همچنین ۳ نهال دارای میوه بدون هسته شناسایی شد (از هر نهال حداقل ۴ میوه و از نهال بدون هسته بیش از ۲۵ میوه مورد بررسی قرار گرفت که در میوه این نهال‌ها حتی یک بذر هم وجود نداشت).

همه جوانه‌ها و پایه‌هایی که با هورمون‌ها تیمار شده بودند، در محل پیوند ابتدا تولید کالوس<sup>(۵)</sup> کردند و پس از گذشت چند روز جوانه‌ها شروع به رشد نمودند. گاهی میزان کالوس‌زایی در حد بالایی بود به صورتی که جوانه در زیر توده‌ایی از کالوس پنهان می‌گردید که بایستی در رابطه با میزان هورمون و مدت تیمار آن، بررسی مجدد صورت گیرد.



:

- ۱- Citrus
- ۲- STG: Shoot Tip Grafting
- ۳- Meristem Tip
- ۴- Self in Compatibility
- ۵- Callus

## References:

1. ر. فتوحی قزوینی، "تولید کلونهای عاری از ویروس ارقام نارنگی انشو از طریق کشت تخمک‌های نارس شده"، انتشارات دانشگاه گیلان (۱۳۷۷).
2. ح. شبیانی، "باغبانی"، جلد چهارم. مرکز نشر سپهر (۱۳۴۲).
3. L. Navarro, "Citrus shoot tip grafting in vitro," In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 18, Bajaj, Y.P.S. (ed). Springer Verlag, Berlin Heidelberg (1991).
4. S. Bhowanis and M.K Razdan, "Plant Tissue Culture," Elsevier, (1983).
5. Donini, "Mutagenesis applied for the improvement of vegetatively propagated plants," International Atomic Energy Agency, (1994).
6. M.H. Edriss and D.W. Burger, "Micrografting shoot tip culture of Citrus on three trifoliata rootstock," *Sci. Hort*, **23**, 255-259 (1984).
7. A. Starrantino, and A. Caruo, "The shoot tip grafting technique applied in citriculture," *Acta Hort*, (1988).
8. V.A. Parthasaarathy, V. Nagaraju, S.A.S. Rahman, "In vitro grafting of Citrus reticulata Blanco," *Folia. Hort*, 9/2, 87-90 (1997).
9. P. Boxus, P. Druart, "Virus-free trees through tissue culture," In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 1. Bajaj, Y.P.S. (ed). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1986).
10. R. Jonard, "Micrografting and its applications to tree improvement," In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 1. Bajaj, Y.P.S. (ed). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, (1986).

ايجاد جهش‌های زودرس و دیررس مؤید نتایج بدست آمده از اجرای این طرح می‌باشد. شکل ۵ کایمرای حاصل از پرتوتایی و شکل ۶ میوه‌های هسته‌دار و بدون هسته ناشی از پرتوتایی نهال‌های نارنگی را نشان می‌دهد.

با در نظر گرفتن نظریه همبستگی مثبت بین میزان بذر با درشتی میوه، با توجه به میانگین وزن میوه در گروه‌های بی‌بذر، کم‌بذر و پربذر، که به ترتیب ۴۶/۴۷، ۵۷/۶۵ و ۸۷/۰۴ گرم است می‌توان اذعان کرد که این نظریه در نتیجه این طرح نیز صادق است.



نمونه کایمرا.



نمونه‌های بدون هسته موانت - هسته‌دار شاهد.