تولید پایه های یکنواخت و عاری از ویروس از طریق کشت بافت خورش مرکبات

عارفه سپهرتاج[۱*] و علیرضا شهسوار[۲]

۱- کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشگاه شیراز ۲-دانشیار بخش علوم باغبانی، دانشگاه شیراز.

* نویسنده مسئول:arefehsepehrtaj@gmail.com

چکیده

در این پژوهش، سعی شده با استفاده از کشت بافت خورش بذور پایه های نارنج و لیمو پایه های عاری از ویروس و یکنواخت تولید گردد . برای ایجاد شاخساره از بافت خورش در هر دو پایه از روش اندام زایی مستقیم استفاده گردید.در تمامی آزمایش های انجام شده از محیط کشت پایه MS استفاده شده است.از دو تنظیم کننده رشد گیاهی BA در غلظت های ۰، ۱، ۱/۵ ، و ۲ میلی گرم بر لیتر و GA_3 در غلظت های ۰، ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر در محیط کشت استفاده شده است و اثرات اصلی هر کدام از تنظیم کننده های رشد گیاهی به تنهایی و بر هم کنش آن ها بر شاخه زایی بررسی شده است.با توجه به داده های بدست آمده مشخص گردید که برهم کنش تنظیم کننده های رشد BA وGA_3 اثر بالاتری را نسبت به زمانی که هر کدام به تنهایی استفاده می شوند بر شاخه زایی دارند.در پایه لیمو بهترین محیط کشت برای تولید شاخه از بافت خورش ، محیط کشت حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر BA و ۲ میلی گرم بر لیتر GA_3 می باشد و در پایه نارنج بالاترین میزان شاخه زایی در محیط کشت حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر GA_3 و ۱ میلی گرم بر لیتر BA حاصل شده است.برای ریشه زایی شاخساره های لیمو و نارنج از تنظیم کننده رشد گیاهی IBA استفاده شد.غلظت های مورد استفاده این تنظیم کننده رشد گیاهی در لیمو ۰، ۰/۵ ، ۱ و ۱/۵ میلی گرم بر لیتر و در نارنج ۰، ۱ و ۱/۵ بوده است.بالاترین میزان ریشه زایی برای لیمو در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی گرم بر لیتر IBA و در نارنج در محیط کشت حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر IBA بوده است.گیاهک ها پس از انتقال به گلدان های حاوی آمیخته ی ۵۰ ٪ خاک و ۵۰ ٪ شن ، به مدت ۱۰ روز با محلول یک هشتم غلظت نمک های MS آبیاری شده و به تدریج به محیط بیرون سازگار شدند.

مقدمه

امروزه تولید مرکبات در جهان از اهمیت بسزایی برخوردار است. مرکبات از مهمترین گروه های درختان میوه در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان هستند(۱۲)و نقش مهمی را در رژیم غذایی انسان ها به عنوان میوه ای که دارای مقادیر یالایی از ویتامین C و دیگر عناصر غذایی مهم مثل پتاسیم است ایفا می کنند.مرکبات مانند بسیاری از درختان میوه به صورت تجاری از طریق پیوند یک پیوندک بر روی پایه مناسب ازدیاد می شوند در این صورت درخت پیوندی تولید می شود که دارای ویژگی های پایه و پیوندک است (۲۲)ازدیاد مرکبات به این روش از مهمترین عوامل محدود کننده در تولید آن است به دلیل آن که باعث گسترش بیماری های مختلف ویروسی و شبه ویروسی از راه تولید نهال آلوده می باشد.(۱۸،۶)انتخاب پایه و پیوندک مناسب هر منطقه و عاری بودن آن ها از بیماری های مختلف در تولید بهینه این محصول نقش بسیار مهمی را بازی می کند(۱) بنابراین لازم است که پایه و پیوندک سالم و عاری از ویروس از طریق ریز پیوندی نوک شاخساره اتولید گردد.(۲۱،۱۵)از آن جایی که در بیش تر گونه ها و دو رگه های مرکبات رویان زایی خورشی و چند رویانی وجود دارد می توان در افزایش بذری گیاهان با استفاده از این ویژگی گیاهان شبیه به اصل تولید نمود.(۲۵)رانگان در سال ۱۹۵۸ برای اولین بار آغازش جنین های خورشی را در یکی از رقم های مرکبات انجام داد که ریز افزایی در این رقم ها امکان تولید جمعیت گیاهی یکنواخت را فراهم نمود.(۱۷)به طور کلی کشت بافت خورش از روش های نوین برای تولید مرکبات عاری از ویروس است و از طریق بذر و کشت بافت خورش ویروس انتقال نمی یابد در عین حال گیاهان تولید شده از طریق بافت خورش و جنین زایی سوماتیکی قادر به تولید گیاهانی با

ویژگی های گیاه مادری هستند.(۲۰)الطاف در سال ۲۰۰۱ گزارش نموده است که با استفاده از ریز نمونه بافت خورش قادر به تولید گیاهانی است که عاری از ویروس هستند و حداقل تفاوت را با بافت مادری دارند.(۵)هدف از این پژوهش بررسی ریز افزایی پایه های لیمو و نارنج به وسیله ایجاد شاخساره از کشت بافت خورش این بذور و دستیابی به پایه های یکنواخت و عاری از ویروس با استفاده از ویژگی های ذکر شده و هم چنین تعیین اثر تنظیم کننده های رشد گیاهی در انگیزش و رشد شاخساره و ریشه زایی این شاخساره ها بوده است.

مواد و روش‌ها

میوه‌های نابالغ(۱۰۰-۱۲۰ روز پس از گرده افشانی) گونه های لیمو ونارنج از ایستگاه تحقیقات داراب به ازمایشگاه بخش علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز انتقال داده شدند. میوه ها ابتدا توسط اب لوله کشی و یک محلول شوینده (ریکا) شسته و ابکشی شدند و سپس در محلول کلراکس ۴۰٪ به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند تا به صورت سطحی ضدعفونی شوند بذر های هر میوه جدا شده و برای ادامه گندزدایی به زیر دستگاه جریان هوا انتقال داده شدند.بذر ها در محلول کلراکس به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند وسپس سه بار با اب مقطر سترون ابکشی شدند تا گندزدایی سطحی شوند پس از ان هر دو پوسته بذر جدا شده و مورد استفاده قرار گرفتند. محیط کشت پایه موراشیگی و اسکوگ (MS) با غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد گیاهی به کار گرفته شدند. برای بررسی اثر BA و GA و بر هم کنش ان ها بر شاخه زایی از بافت خورش بذور لیمو ونارنج BA با غلظت های ۰ ، ۱، ۱/۵و ۲ میلی گرم بر لیتر و GA با غلظت های۰ ، ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتربه کار گرفته شدند.برای محیط کشت ریشه زایی در محیط کشت MS از غلظت های مختلف IBA استفاده شده است.ساکارز و اگار در تمام محیط های کشت به ترتیب ۳۰ و ۸ گرم بر لیتر به کاررفته اند.PH محیط کشت پیش از قرار دادن در اتوکلاو روی ۰۵/ ± ۵/۷۵ تنظیم گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای حدود ۱۲۰ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ کیلو گرم بر سانتی متر مربع گندزدایی شدند. کشت بذر ها در لوله های ازمایش ۲۵۰×۱۵۰ میلی لیتر که محتوی ۲۰ میلی لیتر محیط کشت پایه MS بودند انجام شده است.پس از کشت درب لوله ها بسته شده و در جایگاه رشد دارای ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ لوکس نور مهتابی با طول روز ۱۶ ساعت و دمای ۱ ± ۲۷ درجه سلسیوس قرار داده و ۴ هفته پس از کشت یادداشت برداری انجام شده است. برای سازگاری ، گیاهک های ریشه دار شده به گلدان های حاوی امیخته ۵۰٪ خاک و ۵۰٪ شن منتقل شدند و بر روی ان ها کیسه های پلاستیکی قرار داده شد و در دمای ۳±۲۵ درجه سلسیوس و شدت نور ۲۰۰۰ لوکس قرار گرفتند ابیاری گلدان ها ابتدا با محلول یک هشتم غلظت نمک های MS به مدت ۱۰ روز و پس از ان با اب معمولی انجام شده است و به مرور گیاهان به محیط سازگار شدند. در پایان آزمایش ها باززایی شاخساره تعداد شاخساره هر ریز نمونه و در ازمایش ریشه زایی تعداد ریشه ، طول ریشه ،وزن تر و خشک ریشه یادداشت شده است.ازمایش ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با تکرار های مختلف انجام شد .تعداد تکرار و تعداد ریز نمونه در هر تکرار در پایین هر جدول آورده شده است. تجزیه داده ها با نرم افزار SASS و مقایسه میانگین ها با ازمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ صورت پذیرفته است.

نتایج و بحث

در این پژوهش بیش ترین تعداد شاخساره در پایه لیمو در محیط کشت حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر BAو ۲ میلی گرم بر لیتر GA_3ودر پایه نارنج در محیط حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر BA و ۲ میلی گرم برلیتر GA_3 حاصل شد که اختلاف معنی داری با تیمار شاهد دارد.(جدول ۳-۱ و۳- ۲).

۳-۱-اثر تنظیم کننده های رشد BA و GA و برهم کنش ها آن ها بر تعداد شاخساره های بدست آمده از کشت بافت خورش لیمو

جیبرلیک اسید (GA) میلی گرم بر لیتر	بنزیل آدنین (BA) میلی گرم بر لیتر				میانگین GA
	0	1	1/5	2	
0	0c	2/28ab	1/8abc	1/5abc	1/52A
1	2/75 ab	0c	2ab	0c	1/18A
2	1bc	2/33ab	0c	3/33a	1/66A
میانگین BA	1/25A	1/71A	1/26A	1/61A	

+نتایج بر اساس هشت تکرار و یک ریز نمونه در هر تکرار می باشد.

++ در هر ستون وهر ردیف میانگین هایی که دارای حروف(حروف کوچک برای تیمار ها و حروف بزرگ برای میانگین ها) هستند در سطح ۵٪ ازمون چند دامنه ای دانکن دارای تفاوت معنی داری نیستد.

۳-۲- اثر تنظیم کننده های رشد BA و GA و برهم کنش ها آن ها بر تعداد شاخساره های بدست آمده از کشت بافت خورش نارنج

جیبرلیک اسید (GA) میلی گرم بر لیتر	بنزیل آدنین (BA) میلی گرم بر لیتر				میانگین GA
	0	1	1/5	2	
0	0c	1/33b	0c	0c	0/33B
1	0c	0c	1b	1b	0/5B
2	0c	2/25a	1/5b	0c	0/93A
میانگین BA	0C	1/19A	0/83B	0/33C	

+نتایج بر اساس هشت تکرار و یک ریز نمونه در هر تکرار می باشد.

++ در هر ستون وهر ردیف میانگین هایی که دارای حروف(حروف کوچک برای تیمار ها و حروف بزرگ برای میانگین ها) هستند در سطح ۵٪ ازمون چند دامنه ای دانکن دارای تفاوت معنی داری نیستد.

در هردو پایه محیط های کشت حاوی هردو تنظیم کننده رشد BA و GA_3 نسبت به زمانی که هردو تنظیم کننده رشد گیاهی به تنهایی حضور داشتند بر روی شاخه زایی موثرترند.

BA به صورت مستقیم یا غیر مستقیم روی تحریک آغازش شاخساره از ریز نمونه های مختلف بسیار موثر است این سیتوکینین به تنهایی یا در برهم کنش با آکسین ها جنبه های مختلف تمایز یابی سلولی و اندام زایی را در کشت بافت تحت تاثیر قرار می دهد(۲۴) و در آزمایش های مختلفی نشان داده شده است که برای باززایی شاخساره از ریز نمونه هایی مثل محور روپه و محور

زیر لپه و میانگره های ساقه حضور آن ضروری است (۳،۱۴،۱۹)در طیف وسیعی از مرکبات از BA برای آغازش باززایی شاخساره به طور معمولی استفاده می شود.(۷،۸،۱۰). کاربرد GA_3 در محیط کشت باعث تحریک سنتز تنظیم کننده های رشد گیاهی می شود که بر روی اندام زایی موثرند.(۱۳).

بدیهی است که بیش ترین تاثیر GA_3 در محیط کشت افزایش طول شاخساره های تولید شده می باشد(۲۳) به طور مثال غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر این تنظیم کننده رشد گیاهی در گریپ فروت *Citrus. Paradise* Macf (۲۶) و ۱ میلی گرم بر لیتر در پرتقال والنسیا باعث افزایش طول شاخساره می شود.(۴).ترکیب دو تنظیم کننده رشد گیاهی BA و GA_3 با هم در محیط کشت به طور موفقی ویژگی های مورفولوژیکی شاخه زایی از جمله تعدا شاخساره ،طول شاخساره و تعداد برگ را به خوبی تحت تاثیر قرار می دهد گزارش های مختلفی و جود دارد که نشان می دهند که کاربرد این تنظیم کننده رشد گیاهی بر تولید شاخساره موثر است از جمله جیل و گوسال در گیاه *C.depressa* با کاربرد ۱ میلی گرم بر لیتر BA و ۲ میلی گرم بر لیتر GA_3 میزان بالایی از شاخساره را تولید نمودند.(۹).

بالا ترین میزان ریشه زایی برای نارنج در محیط حاوی ۱ می لی گرم بر لیتر IBA و در لیمو در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی گرم بر لیتر این تنظیم کننده رشد گیاهی صورت گرفته است و با افزایش غلظت این تنظیم کننده رشد از تعداد ریشه ها کاسته شده است.IBA در بسیاری از گونه های مرکبات مانند *Citrus aurantifolia* به طور موفقی باعث تولید ریشه شده است.(۱۶)با گذشت ۲ ماه و با افزایش توسعه ریشه ها و رشد مناسب گیاهک ها به آمیخته سترون شده حاوی نسبت حجمی مساوی پرلایت و ورمی کولایت شازگاری صورت گرفت.تمامی گیاهک های سازگار شده با موفقیت ٪۱۰۰ به گلخانه منتقل شدند و زنده ماندند این نتایج بدست آمده با دست آوردهای دژم و همکاران (۲)در پرتقال در سال ۱۳۸۰ و جاجو (۱۱)در *Citrus.limonia* Osbeck همسان بود.(جدول۳-۳ و۳- ۴)

۳-۳-اثر تنظیم کننده رشد IBA بر ریشه زایی شاخه های خورش لیمو

ایندول بوتریک اسید (IBA) میلی گرم بر لیتر	وزن خشک ریشه (گرم)	وزن‌تر ریشه (گرم)	طول ریشه (سانتی متر)	تعداد ریشه
0	0/0072a	0/024b	5/01a	1/66b
0/5	0/011a	0/052a	4/9a	4/3a
1	0/0094a	0/024b	6/62a	2b
1/5	0/007a	0/018b	4/93a	2/28b

+نتایج بر اساس ده تکرار ویک ریز نمونه در هر تکرار می‌باشد.

++ در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف یکسانی هستند در سطح ۵٪ ازمون چند دامنه‌ای دانکن دارای تفاوت معنی‌داری نیستند.

-۴ -اثر تنظیم کننده رشد IBA بر ریشه زایی شاخه های خورش نارنج

ایندول بوتریک اسید (IBA) میلی گرم بر لیتر	وزن خشک ریشه	وزن تر ریشه	طول ریشه	تعداد ریشه
0	0b	0b	0b	0b
1	0/012a	0/05a	10/30a	3a
1/5	0/011a	0/039a	8/51a	a۲/۱۶

+نتایج بر اساس ده تکرار ویک ریز نمونه در هر تکرار می‌باشد.

++ در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف یکسانی هستند در سطح ۵٪ ازمون چند دامنه‌ای دانکن دارای تفاوت معنی‌داری نیستند.

منابع

۱- آهنگران ،اکبر، پرویز ، علیزاده ."گزارش آفات و بیماری ها ی مرکبات"سازمان حفظ نباتات.

۲- دژم ، م . ، م ، خوشخوی .، ا ، شکافنده . ،۱۳۸۰. افزایش درون شیشه ای پرتقال *Citrus.sinensis* L.Osbeck با اندام زایی مستقیم در قطعات روپه.مجله علوم فنون باغبانی ایران جلد ۲ شماره های ۳ و ۴ صحفه های ۸۵ تا ۹۴.

3- Almedia , W.A.B., F.A.A. MouraoFilho , B.M.J . Mendes, A.P.M.Rodrigues.(2002).In vitro organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C.limonia*.Sci Agar.59:35-40.

4-Almedia, W.A.B, F.A.A. MouraoFilho, L.E.Pino, R.L, Boscariol,A.P.M.Rodrigues,B.M.J.Mendes.(2003)

.Genetic transformation and plant recovery from mature tissue of *Citrus sinensis* L ,Osbeck.Plant Sci.164 :203-211.

5-Altaf , N., E.K. Murwa,I.A.Bhatti, M.Mohsin.2001 Nucellar regeneration and polyembryony of Citrus cultivars.Pak J .Bot.33(2):211-215.

6-Bitters ,W .P.,T.Murashige, T.S.Rangan and E.Nauer.1972.Investigation on stablishing 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.

7-Burger D.W. and W.P.Hackett.1986.Gradients of adventitious bud formation on excised epicotyls and root sections of Citrus.Plant Science.43:229-232.

8-Costa, M.G.C., V.S.Alves, E.R.G. Lani ,P.R. Mosquima , C.R. Carvalho and W.C.Otoni.2004.Morphogenic

Gradients of adventitious bud and shoot regeneration in epicotyls explants of Citrus.Scientia Horticulture.

100:63-74.

9-Gill , M.I.S and S.S.Gosal.2002.Micropropagation of Pectinfera (*Citrus depressa* Hayata) Apotential Citrus

Rootstock for sweet orange.Indian J.Citriculture,1(1):32-37.

10-Grinblat , U.1972.Differentiation of Citrus stem in vitro .Journall of the American Society for Horticulture Science.97(5):599-603.

11-Jajoo,A.2010.In Vitro Propagation of *Citrus limonia* Osbeck Through Nucellar Embryo Culture.Journal of Biological Sciences 2(1):6-8.

12-Jackson ,D.I. and N.E.Looney(eds).1999.Temperate and subtropical fruit production .CAB International

,Wallingford ,Oxon ,U.K.321p.

13-Lo,K.H.(1977).Factors affecting shoot organogenesis in leaf disc culture of African Violet.SciHortic – Amsterdam.72:49-57.

14-Moura,T.L.M, W.A.B.Almedia, B.M.J.Mendes,F.A.A.MouraFilho.(2001).Organogenesis in vitro de citrus em fancao de concentracoes de BAP e seccionamento do explants.Rev Bras Frutic.23:240-245.

15-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.

16-Raj-Bhansal I,R.and H.C. Arya .1978.Shoot formation in stem and root callus of *Citrus aurantifolia* (Christm).Swingle,grown in cultures.Curr.Sc.47,775-776.

17-Ranagan,N.S.1958.Culture of nucellar tissue of Citrus in vitro.Experienta.14:11-12.

18-Rangan,T.S.,T.Murashige. and W.P.Bitters.1969.In vitro studies of zygotic and nucellar embryonic Citrus.HortScience 3:226-227.

19-Silva,RR.P,M.A.P.C.Costa,A.S.Souza,W.A.B.Almedia.(2005).Regeneracao de plants de laranjapera via organogenes in vitro.Pesq Agropec Bras.40:1153-1159.

20-Singh,B.,S.Sharma.,G.Rani.,A.AZaidi.,V.Hallan.,A.Nagpal.and G.S Virk.2006.In vitro production of I ndian Citrus ringspot virus –free plants of Kinnow Mandarin (*Citrus nobilis* × *C.deliciosa* Tenora) by ovule culture .J.Plant Biotech,7:259-265.

21-Shahsavar ,A.R.2005.Comparison of different Citrus rootstocks for micrografting.Iran.Agr.Res.5:109-116.

22-Spreen,T.h.2009.The word Citrus industry.soil , plant growth and crop production – vol3.

23-Wochok,Z.S,C.J.Sluis.(1980).Gibberellic acid promotes Atriplex shoot multiplication and elongation .Plant Sci Lett.17:363-369.

24-Woodward , A.Wand B.Bartel.(2005).Auxin:regulation ,action and interaction .Ann Bot_London.95:707-735.

25-Wutscher,H.K.1979.Citrus rootstock.Hort.Rev.1:237-269.

26-Yang ,Z.N.I.L.Ingelbrecht,E.Louzada,M.Skariaand,T.E.Mirkov.(2000)Agrobacterium mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red(*Citrus paradise* Macf.).Plant Cell Rep.19:1203-1211.

“Uniform and Virus Free Citrus Rootstocks Production Via Nucellus Cultur

A. Sepehrtaj[1*] and A.R. Shahsavar[2]

1,2- Dept. of Horticultural Sciences, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

*Corresponding author: arefehsepehrtaj@gmail.com

Abstract

The existence of different virus and virus – like diseases is one of the main causes of the reduction in citrus production stock. The most important reason of spreading these diseases is through their propagation which is by grafting. At this experiment virus – free stocks were produced by nucellus tissue culture of sour orange and lime seeds. For shoot regeneration of nucellus tissue in both

rootstocks two direct and indirect organogenesis methods were used. The MS culture media was used in all experiment. Two plant growth regulators , BA at concentrations of 0, 1 , 1.5 and 2 mg/l and GA at concentrations of 0 , 1 and 2 mg/l in the culture media were used in direct organogenesis method , and the main effect of each plant growth regulator alone and their interaction on shoot regeneration were investigated. Results showed that the interaction of BA and GA had greater effect on shoot regeneration than BA and GA were used individually. In lime rootstock the best medium for shoot production was 2 mg/l BA and 2 mg/l GA, while in sour orange rootstock the highest shoot regeneration was found in the culture medium containing 2 mg/l GA and 1 mg/l BA. In rooting of lime shoots, IBA at concentrations of 0, 0.5, 1 and 1.5 mg/l and sour orange at concentrations of 0, 1 and 1.5 mg/l were used. The highest rate of rooting for lime and sour orange were in the culture media that contains 0.5 and 1 mg/l IBA, respectively.

Key words: Rootstock, citrus, virus-free, uniform