

## مطالعه اثر غلظت‌های ساکارز، روش پیوند و نوع پایه بر پیوند نوک شاخساره نارنگی انشو

*Citrus unshiu cv. Owari* در شرایط کشت درون شیشه‌اییحیی تاجور<sup>1\*</sup>، مالک قاسمی<sup>1</sup>، مرتضی گل محمدی<sup>2</sup>، سید مهدی بنی‌هاشمیان<sup>2</sup>

1- استادیار پژوهشی بخش اصلاح و تهیه نهال و بذر موسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر. 2- استادیار پژوهشی بخش گیاه‌پزشکی موسسه

تحقیقات مرکبات کشور، رامسر.

نویسنده مسئول: یحیی تاجور (yahyataj80@gmail.com)

## چکیده

تکنیک پیوند نوک شاخساره یکی از روش‌های عاری‌سازی مرکبات از بیماری است که در اغلب کشورها (دارای کشت مرکبات) بکار گرفته می‌شود. این پژوهش در موسسه تحقیقات مرکبات کشور (91-1390) در دو آزمایش جداگانه انجام پذیرفت. در آزمایش اول برهمکنش غلظت‌های ساکارز (محیط MS به همراه ساکارز 3، 5 و 7%) و روش پیوند (پاشنه ای، T معکوس و قرارگیری بر سطح صاف سربرداری شده) و در آزمایش دوم تاثیر نوع پایه (سیترنج، سیتروملو و پونسیروس) بر افزایش کارایی پیوند نوک شاخساره نارنگی انشو مورد ارزیابی قرار گرفت. گیاهچه‌های پیوندی پس از کشت در محیط مایع، در شرایط اتاقک رشد در دمای  $1 \pm 26$  درجه سانتی‌گراد با دوره روشنایی 16 ساعت با شدت 1500 لوکس نور نگهداری شدند. نتایج آزمایش اول بیان‌گر آن بود که تیمار ساکارز 7% در افزایش طول گیاهچه پیوندی (با حداکثر میانگین 26 mm)، بالا رفتن میزان آلودگی محیط کشت (با حداکثر میانگین 33%) و کاهش طول ریشه (با حداقل میانگین 2.9 mm) تاثیر معنی‌دار داشت ( $P \leq 0.05$ ). اثر متقابل ساکارز و روش پیوند نیز بر درصدگیرایی موثر بود بطوری که بیشترین درصدگیرایی پیوند (با حداکثر میانگین 23%) در محیط کشت MS حاوی ساکارز 5%، در پیوند T معکوس ثبت گردید. تجزیه واریانس آزمایش دوم نیز نشان دهنده آن بود که در بین پایه‌های مورد بررسی تفاوت آماری وجود نداشت.

کلمات کلیدی: نارنگی، پیوند نوک شاخساره، محیط کشت، پایه

## مقدمه

کاهش رشد، تنزل عملکرد و کیفیت میوه، محدودیت در استفاده از پایه‌ها، توقف باردهی درختان و در نهایت زوال آنها که ناشی از بیماری‌های ویروسی و شبه ویروسی بوده، زیان‌های اقتصادی فراوانی در باغ‌های مرکبات دنیا بوجود آورده است (۶،۳). بیماری‌های ویروسی و شبه ویروسی از طریق تکثیر رویشی (پیوند، قلمه، ...) و ناقلین قابل انتقال است (10). تاریخچه ورود این بیماری‌ها مربوط به دوره‌های گذشته بوده بطوری که در طی سال‌های قبل، از طریق واردات ارقام و پیوندک آلوده، بیماری‌های مذکور در کشور گسترش یافت. این عوامل بیماری‌زا قادر به آلودگی تمامی گونه‌ها، ارقام، دورگ‌های بین جنسی و حتی برخی از خویشاوندان مرکبات نیز می‌باشند (۲،۱). با توجه به روش مرسوم تکثیر پیوندی مرکبات، مهم‌ترین گام در کنترل این بیماری‌ها، ممانعت از تکثیر و توزیع منابع آلوده است. لذا اولین گام در مبارزه با این معضل، تامین منابع تکثیری سالم می‌باشد. عاری‌سازی مرکبات از بیماری، دارای روش‌های متعددی بوده که در ادامه شرح مختصری از این موارد ارائه می‌گردد. در گذشته روش غالب برای گریز از آلودگی به بیماری‌های ویروسی و شبه ویروسی مرکبات، انتخاب دانه‌های نوسلار از ارقام چند جنین بود. از معایب این روش طولانی بودن دوره نونهالی نهال‌های نوسلار، رشد زیاد و تیغ‌دار بودن آنها بوده که موجب محدودیت کاربرد آنها گردید (3). یکی دیگر از روش‌های تولید

مرکبات عاری از ویروس، گرمادرمانی بوده که گیاهان حاصله، خصوصیات نونهالی ندارد. اما روش مذکور برای حذف برخی از بیماری‌های شبه ویروسی همچون آگروکورتیس و زایلوپروسیس موثر نبوده است (10). بنابراین بایستی روشی به کار گرفته شود که هم بیماری‌های ویروسی و شبه ویروسی را حذف کند و هم خاصیت نونهالی را به همراه نداشته باشد (9). به این منظور از کشت جوانه انتهایی در آزمایشگاه استفاده گردید. روشی که در سطح وسیع برای تولید گیاهان علفی سالم به کار گرفته شده، اما در مورد عاری سازی مرکبات از عوامل بیماری‌زا موثر نبود (7). با توجه به موارد ذکر شده موراشیگی و همکاران در سال 1972 توانستند در شرایط کشت درون شیشه‌ای از طریق پیوند مریستم و پریموردیای آن بر روی پایه‌های جوان در حال رشد، به تعداد کمی گیاهچه‌های مرکبات دسترسی نمایند که برخی از آنها، عاری از آگروکورتیس و فاقد خصوصیات نونهالی بوده که تکنیک مذکور، پیوند نوک شاخساره (Shoot tip grafting) نامگذاری شد. در مرکبات آلوده با کمک این روش بیماری‌های تریستزا، آگروکورتیس، استابورن و کاجکسیا حذف شدند. یکی از مشکلات مطرح در تکنیک مذکور، درصد کم گیرایی پیوند و در بعضی موارد رشد ضعیف گیاهچه‌های حاصل می‌باشد (8). با توجه به اهمیت تولید هسته‌های اولیه سالم از ارقام تجاری مرکبات و متولی بوده موسسه تحقیقات مرکبات کشور در این زمینه، از سال 1385 طرح سالم‌سازی ارقام تجاری مرکبات ارائه و به مرحله اجرا درآمده است. از مسائل مطرح در تولید نهال سالم مرکبات بالا بردن درصد گیرایی پیوند نوک شاخساره و بهینه نمودن رشد گیاهچه حاصل در شرایط کشت درون شیشه‌ای بوده (5) که در این مقاله به بررسی اثر برخی از تیمارها بر شاخص گیرایی پیوند و رشد گیاهچه انشو رقم اُاری که منجر به تولید گیاهچه حاصل از تکنیک STG نیز گردید، پرداخته شد.

## مواد و روش‌ها

### آزمایش اول (اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و روش پیوند)

#### تهیه پایه

حذف پوسته، ضد عفونی، ترکیب محیط کشت MS و شرایط نگهداری بذور کشت شده پایه سیترنج بر اساس روش ناوارو (1992) انجام شد (۴،۷).

#### تهیه پیوندک و انجام ریز پیوندی

برای تهیه پیوندک انشو رقم اُاری، شاخساره‌های انتهایی حاصل رشد تازه به طول 30 تا 50 میلی‌متر، از نمونه‌های گلدانی مستقر در گلخانه ایستگاه تحقیقاتی رامسر موسسه تحقیقات مرکبات کشور تهیه گردید. عمل ضد عفونی بر اساس روش ارائه شده در منابع انجام (3) و سپس عمل ریز پیوندی مریستم و پریموردیای همراه (0.15-0.3 mm) به سه شیوه (پاشنه‌ای، T معکوس و قرارگیری بر سطح صاف سربرداری شده) انجام پذیرفت. در ادامه گیاهچه‌های پیوندی به محیط کشت مایع MS، حاوی غلظت‌های مختلفی از ساکارز (3، 5 و 7%) منتقل شدند. گیاهچه‌های مذکور در شرایط اتانک کشت با شدت نور 1500 لوکس (16 ساعت روشنایی به همراه 8 ساعت تاریکی) با میانگین دمای  $26 \pm 1$  سانتی‌گراد به مدت 2 ماه نگهداری و در طی این مدت میزان گیرایی پیوند، درصد آلودگی و در پایان دوره نیز طول شاخساره و ریشه تولیدی ثبت گردید.

### آزمایش دوم (اثر نوع پایه در گیرایی پیوند)

در آزمایش دوم شرایط ضد عفونی بذور پایه، روش تهیه و گندزدایی پیوندک و شرایط نگهداری نمونه‌های پیوندی، همانند شیوه بیان شده در آزمایش اول بود. در این آزمایش با انتخاب سه پایه پونسیروس، سیترنج و سیتروملو اثر نوع پایه بر میزان گیرایی پیوند نوک شاخساره، در تولید نارنگی انشواوری نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

### آنالیز آماری

در ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و روش پیوند از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی و در آنالیز تاثیر نوع پایه در گیرایی پیوند نوک شاخساره از آزمایش ساده در قالب طرح کامل تصادفی استفاده گردید. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها از طریق نرم‌افزار MSTATC و آزمون توکی ( $P \leq 0.05$ ) انجام شد.

### نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌ها بیان‌گر آن است که تیمار غلظت‌های مختلف ساکارز، بر شاخص‌هایی همچون طول گیاهچه، طول ریشه، میزان آلودگی و درصد گیرایی پیوند تاثیرگذار بود. بطوری که بیشترین طول گیاهچه با میانگین 26 میلی‌متر، بالاترین میزان آلودگی (33%) در کنار کمترین میزان طول ریشه (با میانگین 2.9mm) در غلظت 7% و بیشترین میزان گیرایی پیوند نیز با میانگین 11.7% تحت تاثیر ساکارز، در غلظت 5% ثبت گردید (شکل 1).

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از روش پیوند نیز بیان‌گر آن بود که تیمار مذکور بر درصد گیرایی پیوند تاثیرگذار بوده بطوری که بیشترین میزان گیرایی پیوند با میانگین 18.7% درصد در شیوه پیوند T معکوس ثبت گردید (شکل 2). در بین صفات مورد ارزیابی در آزمایش اول فقط شاخص درصد گیرایی پیوند تحت تاثیر برهمکنش عامل ساکارز و روش پیوند بوده بطوری که بیشترین درصد گیرایی پیوند با میانگین 23% در تیمار ساکارز 50 میلی‌گرم در لیتر در شیوه پیوند T معکوس مشاهده شد (شکل 3). در تجزیه و تحلیل نتایج آزمایش اول می‌توان این گونه عنوان داشت که در پیوند نوک شاخساره به دلیل استفاده از پایه‌های اتیوله فاقد لپه، تامین انرژی از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار بوده، لذا افزایش ساکارز در محیط کشت MS می‌تواند، بواسطه تامین کربوهیدرات و انرژی، در افزایش موفقیت پیوند نوک شاخساره تاثیرگذار باشد (8). ولیکن این افزایش از جهتی می‌تواند به دلیل فراهم نمودن شرایط مناسب، در فعالیت بیشتر میکروارگانیسم‌ها نیز موثر واقع گردد که نتایج پژوهش مذکور تایید کننده این مسئله بوده که با بالا رفتن میزان غلظت ساکارز احتمال آلودگی نیز افزایش داشت (4). تجزیه واریانس آزمایش دوم بیان‌گر آن بوده که در بین پایه‌های مورد ارزیابی تفاوت آماری وجود نداشته که در تشریح این نتیجه می‌توان این گونه عنوان داشت که نوع پایه در میزان گیرایی پیوند رقم اُاری انشواوری نداشته، که نتایج فوق با گزارش Fifaei و همکاران (2007) مطابقت دارد (5). لذا در تولید گیاهان عاری از بیماری رقم مذکور می‌توان، از هر یک از این پایه‌های سه برگچه‌ای در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای استفاده نمود.



شکل 3: رشد گیاهچه انشو (رقم اُواری) حاصل از پیوند نوک شاخساره در شرایط *In vivo*



شکل 2: سبز ماندن و گیرایی پیوندک در پیوند T معکوس



شکل 1: سبز ماندن و رشد بهینه گیاهچه در ساکارز 5%

### منابع

- 1- رحیمیان، ح.، علوی، و. و شایگان، ح. 1379. زوال درختان پرتقال روی پایه نارنج نشانه‌ای بر احتمال آغاز انتقال طبیعی ویروس تریسترای مرکبات در مازندران. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. شهریور 1379. صفحه 132.
- 2- زارعی، ع. و رحیمیان، ح. 1376. عاری سازی دو رقم نارنگی انشو از ویروس تریسترا توسط پیوندک نوک شاخه. مجله بیماریهای گیاهی. جلد 33. 84-89.
- 3- فیفایی، ر. خوشکام، ص. رحیمیان، ح. تاجور، ی. و طاهری ح. 1385. کارائی تکنیک پیوند نوک شاخه در تولید پرتقال واشنگتن ناول عاری از ویروس تریسترا. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. جلد 13. شماره 6. 14-16.
- 4- Edriss, M.H., and Burger, D.W. 1984. Micrografting shoot tip culture of citrus on three trifoliolate rootstocks. *Scientia Horticulture*. 23: 255-259.
- 5- Fifaei, R. Golein, B. Taheri, H. and Y. Tadjvar, Y. 2007. Elimination of Citrus Tristeza Virus of Washington Navel Orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) Through Shoot-tip Grafting. *International Journal of Agriculture & Biology*. 9(1): 27-30.
- 6- Navarro, L. 1988. Application of shoot tip grafting to woody species. *Acta Hort*. 227: 43-55.
- 7- Navaro, L. 1992. Citrus shoot tip grafting in vitro. *Biotechnology in agriculture and forestry*. V. 18, 327-338.
- 8- Navaro, L., and Roistacher, C.N., and Murashigue, T. 1975. Improvement of shoot tip grafting in vitro for virus-free citrus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*. 100: 471-479.
- 9- Naure, E.M., Roistacher, C.N., Carson, T.L., and Murashigue, T. 1983. In vitro shoot tip grafting to eliminate citrus viruses and virus-like pathogens produces uniform budlines. *Hortscience* 18(3): 308-309.
- 10- Skaria, M., Roistacher, C.N., and Da gracia, J.V. 1996. A virus-free citrus budwood program for Texas. *Proc. Int. Soc. Citriculture*. 366-368.

### A study of sugar concentrations, grafting method and rootstock type in shoot tip grafting of *Citrus Unshiu* cv. Owari mandarin by *In Vitro* culture

Y.Tajvar\*1, M. Ghasemi1, M. Gol Mohammadi2 and S.M. Banyhashemian2

1- Dept. of Seed & Plant Improvement, Iran Citrus Research Institute, Ramsar-Iran

2- Dept. of Plant Protection, Iran Citrus Research Institute, Ramsar-Iran

\*Corresponding author: Yahya Tajvar (yahyataj80@gmail.com)

#### Abstract

The shoot tip grafting (STG) technique has been applied in different countries (with citrus culture) for supplying disease-free citrus. This research was conducted in Iran Citrus Research Institute (2011-2012) at two separated experiments. At the first experiment the interaction between sugar concentrations (MS media added with 3%, 5%

and 7% sugar) and grafting methods (heel, inverted-T and surface placement) and at the second experiment the effect of rootstock type (Citrange, Citrumello and Poncirus) were evaluated on increasing efficiency of shoot tip grafting of Citrus Unshiu mandarin. Grafted seedlings were planted on liquid medium and incubated in growth chamber at  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  and 16 h photoperiod with 1500 lux illumination. The first experiment results showed that, sugar concentration increased plantlet high (26mm), percentage of contamination (33%) and decrease root elongation (2.9mm) at 7% sugar percentage ( $P \leq 0.05$ ). At this experiment the interaction effect between sugar concentration and grafting method were significant on grafting percent ( $P \leq 0.05$ ) therefore the highest percent of grafting (23%) was observed in MS medium with 5% sugar at inverted-T grafting method. The result of second experiment showed that there was no significant difference between used rootstocks.

Keywords: Mandarin, Shoot tip grafting, Medium culture, Rootstock