

اثرات نوع پایه، روش پیوند و روش کشت در ریز پیوندی مرکبات

ایمان جعفری¹، علی جعفری مفیدآبادی²، عبدالرضا کاوند³

1- دانشجوی دکتری تخصصی میوه کاری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، کرج. 2- عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، گرگان. 3- دانشجوی دکتری تخصصی میوه کاری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، کرج.

چکیده:

تولید پایه و پیوندکهای عاری از بیماری در مرکبات، بمنظور توسعه باغات مرکبات ضروری است. در حال حاضر روش پیوند درون شیشه‌ای به عنوان یکی از روشهای عاری سازی جدید کارآمد در تولید نهالهای عاری از بیماری، مورد استفاده قرار می‌گیرد. در تحقیق حاضر اثر فاکتورهای مهم در موفقیت گیرایی ریزپیوندی، نظیر پایه نارنج (*Citrus aurantium L.*) و نارنج سه برگ (*Poncirus trifoliata L.*)، روش پیوند (T واژگون و روش پیوند سطحی) و دو روش کشت درون شیشه‌ای محیط مایع (پل کاغذی) و جامد (مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور پیوندک‌های رقم واشنگتن ناول بر روی پایه‌های درون شیشه‌ای حاصل از کشت بذر دو پایه نارنج و نارنج سه برگ ریزپیوند شد. نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها به روش آزمون مقایسه میانگین کاسکور نشان داد که اختلاف معنی داری بین دو نوع پایه در گیرایی ریزپیوندی در سطح 1% وجود دارد و نارنج با 31/30% بیشترین میزان موفقیت گیرایی ریزپیوند را در قیاس با نارنج سه برگ (16/66%) داشته است. در بین روش‌های گوناگون پیوند درون شیشه‌ای اختلاف معنی داری مشاهده نشد علیرغم اینکه روش T واژگون درصد گیرایی ریزپیوندی بالاتری داشت (24/24%). تجزیه داده‌های حاصل از روش کشت بافت در گیرایی پیوند و رشد رویشی پیوندک، نشان داد که روش کشت مایع بصورت پل کاغذی در مقایسه با محیط کشت جامد برتری داشت و بیشترین میزان موفقیت و گیرایی پیوند درون شیشه‌ای، بر روی پایه نارنج در مقایسه با نارنج سه برگچه، دیده شد. بطور کلی بالاترین موفقیت گیرایی با استفاده از نارنج، به عنوان پایه، روش پیوند T واژگون و در محیط کشت مایع بصورت پل کاغذی بدست آمد و گیاهان ریز پیوند شده موفق، پس از سازگاری تدریجی در محیط گلخانه، به زمین اصلی منتقل گردیدند. کلمات کلیدی: پیوند T واژگون، ریز پیوندی، کربوهیدرات، مرکبات، واشنگتن ناول

مقدمه:

منشاء مرکبات بنظر بسیاری از پژوهشگران جنوب شرقی آسیا شامل کشورهای عربی در شرق آسیا، فلیپین و همچنین از جنوب هیمالیا تا اندونزی بوده است (قلی پور 1385). ایران رتبه 7 تولید مرکبات را دارا است و این در حالی است که بلحاظ سطح زیر کشت مرکبات در رده 8 و بلحاظ عملکرد در واحد سطح در جایگاه 10 قرار دارد (آمار نامه سازمان خوار و بار جهانی 2007). در بسیاری از مناطق مرکبات خیز دنیا بیماری‌های زیادی وجود دارند که توسط پیوندک‌های آلوده منتشر می‌شوند و اغلب عامل ایجاد کننده این بیماریها، ویروس‌ها، ویروئیدها¹، باکتری‌ها، اسپروپلاسم‌ها² و فایتو پلاسم‌ها³ می‌باشد. این عوامل جزء مهم‌ترین عامل محدود کننده تولید مرکبات بحساب می‌آید. از روش گرمادرمانی⁴ در دست‌یابی به گیاهان عاری از پاتوژن مرکبات استفاده شد اما این روش برای از بین عوامل بیماری‌زایی که مقام به گرما هستند نظیر انگزوکورتیس و ویروس لکه برگی مرکبات موثر نبود. Murashig و همکاران)

۱ - Viroids

۲ - Spiroplasm

۳ - Phytoplasma

۴ Termotraphy

1972) توانستند تعداد محدودی از گیاهان مرکبات را توسط روش ریز پیوندی عاری سازی نمایند. آنها ریز پیوندک‌های تهیه شده از گیاهان آلوده بر روی پایه‌های بذری جوان رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای، پیوند زده و و این تکنیک را پیوند نوک شاخساره 5 نامیدند. در سال 1975 توسط Navarro یک روش استاندارد (دستور العمل) برای ریز پیوندی ارائه داد شامل مراحل 1) آماده سازی پایه بذری 2) آماده سازی پیوندک 3) پیوند زنی 4) کشت درون شیشه‌ای گیاهان پیوند شده 5) انتقال به خاک می باشد. در این تحقیق بمنظور توسعه ریز پیوندی در کشور به بررسی فاکتورهای موثر در موفقیت ریز پیوندی، به عنوان یکی از روشهای عاری سازی در تولید نهال های گواهی شده پرداخته شد.

مواد و روش ها:

1- مواد گیاهی:

1-1- تهیه پایه:

برای تهیه پایه‌های درون شیشه‌ای بمنظور انجام عمل پیوند، بذور نارنج و نارنج سه بر گچه از موسسه تحقیقات مرکبات کشور تهیه شد. میوه های تهیه شده بدقت مورد شستشو قرار گرفت و بذور آنها با انجام یک برش عرضی در میوه ها استخراج گردید.

- پیش سترون سازی بذور پایه بمنظور حذف لایه ژلاتینی بذور:

- سترون سازی بذور پایه:

- اتانول 70% بمدت 30-60 ثانیه - شستشو با آب مقطر استریل به مدت 3 دقیقه - هیپوکلراید 20% به همراه Tween 20 به مدت 10 دقیقه - سه بار شستشو با آب مقطر استریل هر بار به مدت 5 دقیقه (جمعا به مدت 15 دقیقه). - حذف دو پوسته بذر

1-2- تهیه پیوندک: برای تهیه پیوندک شاخه‌های نازک رشد یافته از فلش‌های رشدی جدید درخت بالغ واشنگتن ناول نمونه‌ها جمع آوری و به قطعات 3 سانتی متری بریده شدند. سپس برگ‌ها از محل دم‌برگ به طول 1 سانتی متر قطع گردیدند.

- سترون سازی پیوندک‌ها بمنظور حذف آلودگی‌ها با برس نرم و مایع ضد عفونی کننده، برس کشی شده و پس از آن بلافاصله در معرض آب جاری قرار گرفت.

سترون سازی پیوندک‌ها: - قرار دادن قطعات تهیه شده در اتانول 70% بمدت یک دقیقه - شستشو با آب مقطر استریل بمدت 5 دقیقه - ضد عفونی با محلول هیپوکلراید 25% بمدت 15 دقیقه - در پایان سه بار شستشو با آب مقطر استریل هر بار بمدت 5 دقیقه جمعا 15 دقیقه

2- انجام عمل پیوند (ریز پیوندی):

در این مرحله پایه‌های بذری دارای رشد مناسب نارنج و نارنج سه بر گچه از محیط کشت جدا شد و به ارتفاع 2 سانتی متری سر زنی شدند. سپس ریشه‌های آنها بطول 3 سانتی متر هرس گردید همچنین تمامی برگ‌های آن حذف شد و به دو روش پیوند T واژگون (به طول 1 میلیمتر و عرض 2 میلیمتر) و روش پیوند سطحی (شکافی) پایه ها برش خوردند مرستم‌های جوانه‌های جانبی استریل شده، در زیر بینو کولار با دقت بسیار به اندازه تقریبی 0/1 الی 0/2 میلیمتر برش داده شده و در محل انجام پیوند بر روی پایه ها مورد پیوند قرار گرفتند. گیاهچه‌های ریز پیوند شده به به محیط‌های کشت MS حاوی 30 گرم بر لیتر ساکاز و 0,5 میلی گرم در لیتر IBA به دو

شیوه کشت محیط جامد و کشت در محیط مایع در قالب کشت پل کاغذی 6، و اطاقک رشد منتقل شدند. پس از آن بصورت دوره‌ای داده های حاصل جمع اوری شد و نمونه های ناموفق در گیرایی پیوند حذف گردیدند.

نتایج :

تجزیه و تحلیل داده های حاصل از واکنش پایه‌های درون شیشه‌ای نارنج و نارنج سه‌برگچه به دو فاکتور موثر، روش پیوند و نحوه کشت پس از پیوند نشان داد، که بلحاظ درصد موفقیت پیوند بین رقم‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح 1% بر اساس آزمون مقایسه میانگین عملکرد به روش کای-اسکوئر وجود دارد (جدول شماره 1). پایه درون شیشه‌ای نارنج با متوسط 31/3 درصد بیشترین موفقیت در انجام پیوند را در مقایسه با نارنج سه برگچه (16/6%) داشته است.

جدول شماره 1- بررسی اثرات فاکتورهای مختلف نوع پیوند، روش کشت و نوع پایه در گیرایی پیوند

اثرات معنی دار		گیرایی پیوند(درصد)	فاکتورهای موثر
ns	نوع پیوند	24/24	T واژگون
		23/07	سطحی
**	رقم	31/30	نارنج
		16/66	نارنج سه برگچه
ns	روش کشت	27/58	روش کشت پل کاغذی
		25/13	محیط جامد

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از بررسی اثر روش پیوند در موفقیت گیرایی پیوند بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌داری بین روش تی - معکوس و روش سطحی بکار گرفته شده وجود ندارد هرچند، درصد گیرایی پیوند در روش پیوند T واژگون (24/24%) بیشتر از روش سطحی (23/07%) است. لیکن نحوه اجرای پیوند بلحاظ فیزیکی سخت تر و مشکل تر می باشد. در بین روش های کشت در محیط مایع MS به روش پل کاغذی و کشت معمول (محیط کشت MS جامد) اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و روش کشت در محیط مایع حاوی IBA با 27,5% بیشترین موفقیت در پیوند را نسبت به کشت در محیط MS جامد (20%) نشان داد (شکل شماره 1)

بحث:

با توجه به نتایج بدست آمده، درصد ریزپیوندی های موفق بر روی پایه نارنج در شرایط روش پیوند یکسان و روش کشت یکسان گیاه ریز پیوند شده با متوسط 31,3% در مقایسه با نارنج سه‌برگچه با متوسط 16,66% عملکرد بهتری داشته است و اختلاف معنی‌داری در سطح 1% در بین دو پایه فوق مشاهده گردید که با نتایج (Sertkaya, 2004) و (شهسوار، 1383) مطابقت دارد. و این برتری می تواند بدلیل تحمل پذیری بهتر نارنج نسبت به شرایط محیطی در قیاس با نارنج سه برگچه، قدرت استقرار بهتر و شرایط فیزیولوژیکی متفاوت دو پایه فوق عملکرد نارنج بمراتب بهتر از نارنج سه برگچه بوده است. نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از این بررسی نشان داد که در شرایط یکسان (نوع پایه، روش کشت) روش ریز پیوندی T معکوس در مقایسه با پیوند سطحی از عملکرد بالاتری برخوردار بوده است. هر چند که اختلاف معنی‌داری در بین دو روش فوق مشاهده نگردید. که این نتایج با نتایج (Edriss, 1984) در ریز پیوندی مرکبات و (Deogratias, 1989) در ریز پیوندی ارقام گلابی و (Hamaraie, 2004) در ریز پیوندی گریپ فروت و

(Toma , 2010) در ریز پیوندی گلابی و سیب و (Naz, 2007) در ریز پیوندی مرکبات یکسان بوده است و (Fifaei, 2007) گزارش نمود که روش T واژگون در ریز پیوندی مرکبات در قیاس با روش سطحی دارای عملکرد بالاتری است و اختلاف معنی داری از خود نشان می دهد. ولی Onay و همکاران در سال 2004 اعلام نمودند که روش پیوند سطحی (V) برای پسته موفقیت آمیزتر است، که این نتایج با نتایج ما مغایرت داشت. احتمال می رود بدلیل آنکه در پیوند T معکوس در مقایسه با پیوند سطحی، تجمع شیره آوندی به دور از محل قرار گیری پیوندک می باشد و بدلیل عدم ارتباط مستقیم پیوندک با هوا و خطر آلودگی های احتمالی درصد گیرایی ریز پیوندی در این روش بالاتر شده است. علاوه بر آن بدلیل تماس بیشتر پیوندک با لایه کامبیوم پایه درصد گیرایی ریز پیوندی در روش T واژگون بالاتر است. دلیل اصلی برتری درصد گیرایی در روش تی - معکوس علیرغم مشکل بودن عمل پیوند، تماس بهتر پیوندک با لایه زاینده گزارش شد. با توجه به نتایج بدست آمده روش کشت اختلاف معنی داری را نشان نداد هرچند در شرایط استفاده نمودن از پایه و روش پیوند یکسان، روش کشت مایع با کمک پل کاغذی نسبت به کشت در محیط جامد از عملکرد بالاتری برخوردار بوده است. که این نتایج با نتایج گزارش شده توسط Deogratias (1989) در ریز پیوندی گلابی یکسان است. دلیل عملکرد بالاتر محیط کشت مایع نسبت به محیط کشت جامد را می توان به امکان جذب سریعتر و راحت تر مواد توسط ریشه گیاه ریز پیوند شده، در محیط کشت مایع دانست.

منابع مورد استفاده:

- 1-- شهسوار، ع.، 1383. مقایسه پایه های مختلف مرکبات برای ریز پیوندی. مجله علوم و فنون باغبانی ایران. ج 5. ش 2. ص 109-116.
- 2- قلی پور، د.، 1385. باغداری مرکبات. انتشارات شلفین.
- 3- Chapot. H. (۱۹۷۵). The citrus plant in Citrus. Ernst Hafliger, Ed., Technical Monograph No. ۴, Ciba-Geigy Agrochemicals, basel, Switzerland, pp. ۶-۱۳.
- ۴- Deogratias, A. V. Castellani, F. Dosba, J. Juarez, J.M. Arregui, C. Ortega, V. Ortega, G. Llacer, L. Navarro (۱۹۸۹). Study Of Growth Parameters On Apricot Shoot-Tip Grafting In Vitro (STG). Acta Horticulture ۲۹۳: [IX International Symposium on Apricot Culture](#).
- ۵- Edriss, M.H. and D.W. Burger. (۱۹۸۴). Micro-grafting shoot-tip culture of citrus on three trifoliolate rootstocks. Sci. Hort. ۲۳: ۲۵۵-۲۵۹.
- ۶- Fifaei. R, B. Golein, H. Taheri And Y. Tadjvar. (۲۰۰۷). Elimination of Citrus Tristeza Virus of Washington Navel Orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) Through Shoot-tip Grafting. International Journal Of Agriculture & Biology. ۱۵۶۰-۸۵۳۰/۲۰۰۷/۰۹-۱-۲۷-۳۰.
- ۷- Hamaraie M. A. Ali , Osman M. Elamin. and Mohamed A. Ali (۲۰۰۴). Propagation of grapefruit by shoot tip micrografting. www.arcsudan.sd/proceedings/۳۸thmeeting/fulltext/۲۰۰۴/۲۰۳/Grapefruit.pdf.
- ۸- Navarro, L. Roistacher, C.N. and Murashige, T. (۱۹۷۵). Improvement of shoot-tip grafting In vitro for virus free citrus. Journal of the American Society for Horticultural Sciences ۱۰۰, ۴۷۱-۴۷۹.
- ۹- Navarro, L. Roistacher, C.N. and Murashige, T. (۱۹۷۶). Effect of size and source of shoot-tips on psorosis-A and exocortis content of navel orange plants obtained by shoot-tip grafting In vitro. In: Calavan, E.C. (ed.) Proceedings of the Seventh conference of the international Organization of Citrus virologists. IOCV, Riverside, California, pp. ۱۹۴-۱۹۷.
- ۱۰- Naz, A. Muhamed J. Jaskani, Haider Abbas and M. Qasim. (۲۰۰۷). In Vitro Studies On Micrografting Technique In Two Cultivars Of Citrus To Produce Virus Free Plants. Pak. Journal. Bot., ۳۹(۵): ۱۷۷۳-۱۷۷۸, ۲۰۰۷.
- ۱۱- Sertkaya, G. (۲۰۰۴). Effects of Different Rootstocks in Micrografting on Growing of Washington Navel Orange Plants Obtained by Shoot tip Grafting. Journal of Biotechnol. & Biotechnol. Eq. ۲۰۰۴.
- ۱۲- Toma. S. and Mosleh M. S. (۲۰۱۰). Factors Involved In Micropropagation And Shoot-Tip Grafting Of Apple (*Malus domestica* Borkh.) AND PEAR (*Pyrus sp. L.*). World Food System –A Contribution from Europe. Tropentag, September ۱۴ ۱۶، ۲۰۱۰ in Zurich.

Effect of Rootstock, Grafting and Tissue culture methods on Citrus Micrografting

I. Jafari ^{1*}, A. Jafari Mofidabadi² and Ar. Kavand³

Department of Horticultural Sciences, Science and Research Branch Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Golestan Research Center for Agriculture and National Resource. Gorgan-Iran.

Department of Horticultural Sciences, Science and Research Branch Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

The production of disease free scion and rootstocks are an urgent task to improve citrus commercial orchard. In vitro grafting has recently become a new applicable method for production of disease free seedling production. In this research, the effect of important factors on grafting such as rootstocks Sour orange (*Citrus aurantium* L.) trifoliolate orange (*Poncirus trifoliolate* L), grafting methods (inverted T and surface placement) and two kind of in vitro culture were evaluated. For this, scions of Washington Novel cultivar have been micrografted on in vitro derived *Citrus aurantium* L and *Poncirus trifoliolate* L. rootstocks. Analysis of collected data by ki-squire mean comparison, indicated there was significant difference between two rootstock species (sour orange and Ponsirus) for micrografting at 1% level. Sour orange with 71,3% showed highest successful rate of micro grafting then Ponsirus 56,66%. There was no significant difference between two different kind of micrografting (inverted T and surface placement). In spite of no significant difference, inverted T grafting method showed highest successful grafting rate 74,24%. Analysis of data originated from tissue culture method, showed that liquid MS medium through bridge culture has better effect on grafting rate and scion growth rate than the solidified medium. Highest successful rate of micrografting was observed for grafting of Washington Novel scion on sour orange rootstock than Ponsirus. Generally highest successful rate of micrografting have been obtained by grafting of Washington Novel scion on sour orange rootstock as a inverted T grafting method with bridge culture in liquid MS medium. Successful acclimatized grafting was then transferred to the green-house before being transferred to the field.

Keyword: Citrus, Washington Navel, Micrografting, Carbohydrate, Inverted T