

مقایسه ریزازدیادی لیموی مکزیکی (*Citrus aurantifolia*) و لیموی ایرانی (*Citrus latifolia*) در شرایط درون شیشه‌ای: استقرار، پرآوری و طویل‌سازی

نرگس مجتهدی و محمد فتحی

پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی

چکیده

نظر به این که بیماری جاروک یکی از بیماری‌های مهم لیموترش است که باعث مرگ درختان در سالیان اخیر شده است و بهترین راه ممکن برای مبارزه با این بیماری، استفاده از پایه‌ها و ارقام مقاوم و سالم می‌باشد، لذا در این تحقیق تلاش شده است که پروتکل ریزازدیادی لیموی مکزیکی و ایرانی جهت تکثیر انبوه بدست آید. جهت استقرار، جوانه‌های انتهایی و جانبی شاخه‌های جوان پس از برش و ضدعفونی سطحی در محیط کشت پایه بدون هورمون MS قرار داده شده و پس از حدود ۳۰-۲۰ روز از رشد جوانه‌ها، سرشاخه‌های تولید شده جهت دستیابی به بهترین محیط کشت برای پرآوری، به محیط‌های کشت MS و DKW و تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپورین منتقل شدند. آزمایش‌ها، در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی انجام گردید. اطلاعات مربوط به تعداد شاخه‌های جدید، تعداد برگ و طول بلندترین شاخه در هر ریزنمونه، یک ماه پس از کشت جمع‌آوری گردید. جهت طویل‌سازی ریزشاخه‌ها برای انتقال به محیط ریشه‌زایی، آزمایش دیگری با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد کایتین و بنزیل‌آمینوپورین انجام شد و طول ریزشاخه‌های لیموی مکزیکی و ایرانی قبل و بعد از انتقال نیز اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که محیط کشت DKW و غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین (BAP) در تمامی صفات اندازه‌گیری شده، بهترین محیط جهت پرآوری هر دو لیمو بود. نتایج آزمایش طویل‌سازی نیز نشان داد که لیموی ایرانی افزایش طول بیشتری در مقایسه با مکزیکی داشت و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین (BAP) جهت افزایش طول هر دو گونه مناسب بود.

مقدمه

بیماری جاروک لیموترش (Witches' Broom Disease of Lime) یکی از بیماری‌های خطرناک لیموترش است که باعث مرگ درختان می‌شود. با توجه به سطح زیر کشت لیموترش در ایران و هزینه خسارت وارده، خطر از بین رفتن کامل درختان لیموترش وجود دارد. بهترین راه ممکن مبارزه با بیماری، استفاده از پایه‌ها و ارقام مقاوم و سالم می‌باشد. تا کنون، تنها رقم لیموی ایرانی (*Citrus latifolia*) مقاوم به این بیماری معرفی شده است. لیموی مکزیکی (*Citrus aurantifolia*)، گونه تجاری لیموترش است که بسیار حساس به این بیماری است. کشت بافت و مهندسی ژنتیک (بیوتکنولوژی) می‌تواند بعنوان یکی از روش‌های مهم و مکمل روش‌های متداول اصلاحی در لیموترش مورد استفاده قرارگیرد. مطالعات اندکی در مورد ریزازدیادی این گیاهان انجام شده است. به عنوان مثال، ریزازدیادی *Citrus aurantifolia* و *Citrus grandis* با استفاده از ریزنمونه‌های سرشاخه‌های جانبی و انتهایی درختان بالغ بدست آمده است (Al-Khayri and Al-Bahrany, 2001; Paudyal and Haq, 2000). اثرهای ریزنمونه، محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزافزایی لیمو شیرین (*Citrus limetta* Swing) نیز بررسی شده است (خوشخوی و رضازاده، ۱۳۷۹). همچنین، کشت درون شیشه‌ای سرشاخه‌های عاری از ویروس هیبرید Kinnow (*Citrus nobilis* Lour × *Citrus deliciosa* Tenora) در محیط کشت MS همراه با ۱

میلی گرم در لیتر 2iP و عصاره مالت با موفقیت انجام پذیرفته است (Sharma et al., 2007). یک برنامه روتین ریزازدیادی در لیمو خواهد توانست بطور مؤثری مواد گیاهی لازم را برای جایگزینی و نیز توسعه باغات لیمو در کشور از طریق کلون کردن مناسبترین پایه‌ها و ارقام تجاری تامین نماید. به علت تفاوت‌های ژنوتیپی بین ارقام مختلف و نقش مؤثر رقم در کشت بافت گیاهی و عدم شناسایی ارقام کاملاً مقاوم لیموترش نسبت به بیماری جاروک و مقاومت رقم لیموی ایرانی (*Citrus latifolia*) لذا ریزازدیادی لیموی ایرانی بررسی شده و با لیموی مکزیکی مقایسه شده است.

مواد و روش‌ها

پس از جداسازی خارها و برگ‌ها و برش ساقه به قطعات ۲-۱ سانتی متری از جوانه‌های انتهایی و جانبی شاخه‌های جوان، ریزنمونه‌ها با الکل ۷۰٪ و محلول وایتکس ۱۰٪ ضدعفونی سطحی شده و ۳ بار با آب مقطر استریل شسته شدند. ریزنمونه‌ها در محیط کشت پایه بدون هورمون موراشیگ و اسکوگ (MS) قرار داده شده، سپس به اتاقک رشد با دمای 22 ± 2 و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۲۵۰۰ لوکس منتقل می‌شوند. پس از حدود ۳۰-۲۰ روز از رشد جوانه‌ها، سرشاخه‌های تولید شده جهت دستیابی به بهترین محیط کشت برای پرآوری، به محیط‌های کشت MS و DKW و تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپورین با غلظت‌های ۰، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر در قالب دو آزمایش جداگانه منتقل شدند. اطلاعات مربوط به تعداد شاخه‌های جدید، تعداد برگ و طول بلندترین شاخه در هر ریزنمونه، یک و دو ماه پس از کشت جمع‌آوری گردید. جهت طولی‌سازی ریزشاخه‌ها برای انتقال به محیط ریشه‌زایی، آزمایش دیگری با پنج غلظت بنزیل‌آمینوپورین و سه غلظت کایتین انجام شد. همه آزمایش‌ها در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با ۵ تکرار اجرا و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام شد. طول ریزشاخه‌های هر دو گونه قبل از انتقال به ترتیب ۱ و ۰/۵ سانتی متر بود و یک ماه پس از کشت نیز اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث

نتایج آزمایش‌های پرآوری نشان داد که لیموی مکزیکی در مقایسه با نوع ایرانی تعداد شاخه‌های بیشتر که دارای طول بلندتری هستند، تولید می‌کند. محیط کشت DKW در مقایسه با محیط کشت MS در تمامی صفات اندازه‌گیری شده، نتایج بهتری نشان داد. غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین (BAP) در محیط کشت DKW، تعداد شاخه‌ها و برگ‌های بیشتری تولید نمود (جداول ۱ و ۲). لذا به نظر می‌رسد که محیط کشت DKW با ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین، بهترین محیط کشت برای پرآوری هر دو نوع لیمو باشد. تاثیر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آمینوپورین به تنهایی یا در ترکیب با کایتین یا نفتالن استیک اسید در پرآوری *Citrus aurantifolia* و *Citrus limetta* Swing نیز به اثبات رسیده است (خوشخوی و رضازاده، ۱۳۷۹؛ Al-Khayri and Al-Bahrany, 2001). تعداد شاخه‌ها پس از گذشت دو ماه از کشت دو برابر شد (میانگین ۵ تا ۶ شاخه در هر ریزنمونه) اما ریزش برگ‌ها در هر دو لیمو به خصوص لیموی ایرانی، مانع مهمی در واکشت دو ماهه بود. لذا واکشت هر ماه انجام شد. نتایج آزمایش طولی‌سازی نیز نشان داد که لیموی ایرانی افزایش طول بیشتری در مقایسه با مکزیکی دارد (۸ میلی‌متر در مقایسه با ۳ میلی‌متر). غلظت ۰ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کایتین تفاوت معنی‌داری نداشتند، در حالیکه غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین (BAP) جهت افزایش طول هر دو لیمو دارای تاثیر معنی‌دار بود. نتایج این آزمایش موید نتایج الخیری و البحرانی است که نشان دادند غلظت‌های بالای بنزیل‌آمینوپورین مهارکننده افزایش طول شاخه است (Al-Khayri and Al-Bahrany, 2001).

منابع

- خوشخوی، مرتضی و رضازاده، رمضان. ۱۳۷۹. اثرهای ریزنمونه، محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزافزایی لیموشیرین (*Citrus limetta* Swing). مجله علوم و فنون باغبانی. جلد ۱ (۱ و ۲): ۱۴-۱.
- Al-Khayri J.M. and Al-Bahrany A.M. 2001. *In vitro* micropropagation of *Citrus aurantifolia* (Lime). Current Science 81(9): 1242- 1246.
- Paudyal K.P. and Haq N., 2000. *In vitro* propagation of Pummelo (*Citrus Grandis* L.). *In vitro* Cellular and Developmental Biology. 36: 511- 516.
- Sharma S., Singh B., Rani G., Zaidi A.A, Hallan V., Nagpal A., Virk G.S., 2007. *In vitro* production of Indian citrus ringspot virus (ICRSV) free kinnow plants employing phytotherapy coupled with shoot tip grafting. *In vitro* Cellular and Developmental Biology. 43: 254- 259.

Micropropagation comparision of *Citrus aurrantifolia* and *Citrus latifolia*: Culture establishment, proliferation and shoot elongation

Narges Mojtahedi and Mohammad Fathi**

Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Seed and Plant Improvement Institutes Campus, Mahdasht Road, P. O. Box 31535-1897, Karaj, Iran

Abstract

Witches' Broom Disease of Lime (WBDL) is the most dangerous lime disease that causes death of so many lime trees during recent years. Using resistant rootstocks and varieties is the best way for eliminating WBDL. The aim of this paper is comparing some steps of *Citrus aurrantifolia* and *Citrus latifolia* micropropagtaion. So, apical and nodal explants cultured in MS basal medium after surface sterilization. 20 to 30 days later, growing buds of two limes transferred to MS and DKW basal culture medium separately combined with different concentrations of 6-Banzylaminopourine (BAP) in two independent experiments to establish a proliferation medium. Number of new shoots per explant, leaf numbers and the longest shoot length per explant were evaluated one and two months after culture as proliferation parameters. For shoot elongation, another examination carried out by using different concentration of kinetin and BAP. Shoot length measured before and after examination. All the experiments conducted in factorial based on completely randomized design (CRD). Results showed that DKW combined with 2 mg.L⁻¹ BAP was the best proliferation medium. One month was the best time for subculture and 0.5 mg.L⁻¹ BAP was the best concentration for Shoot elongation in both limes while Persian lime had more high length than Mexican lime, significantly.