Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 48, No 2, Summer 2017 (381-389)
DOI: 10.22059/ijhs.2017.140652.921

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۴۸، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۶ (ص ۳۸۹-۳۸۱)

افزونش انبوه لیموترش ایرانی (*Citrus latifolia*) در شرایط درون شیشه‌ای

نرگس مجتهدی*
استادیار، پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱۰/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱/۳۱)

چکیده

مناسب‌ترین راه ممکن برای مبارزه با بیماری جاروک لیموترش، استفاده از پایه‌ها و رقم‌های متحمل و سالم است. در این پژوهش، دستورکار ریزازدیادی لیموترش ایرانی (پرشین لایم) که تحمل بالایی نسبت به این بیماری دارد، در شرایط درون شیشه‌ای بررسی شده است. برای استقرار، جوانه‌های انتهایی و جانبی شاخه‌های جوان نهال‌های سه ساله پس از برش و ضدعفونی سطحی در محیط کشت پایهٔ بدون هورمون MS قرار داده شده و پس از ۲۰ تا ۳۰ روز، سرشاخه‌های تولیدشده برای پرآوری، به محیط‌های کشت MS و DKW و تنظیم‌کنندهٔ رشد بنزیل‌آمینوپورین منتقل شدند. برای طویل‌سازی ریزشاخه‌ها برای انتقال به محیط ریشه‌زایی، آزمایش دیگری با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد کاینتین و بنزیل‌آمینوپورین و برای تعیین محیط ریشه‌زایی، دو آزمایش جداگانه، با استفاده از سه غلظت ایندول استیک اسید (IAA) و نفتالن استیک اسید (NAA) و سه غلظت ایندول بوتیریک اسید (IBA) در محیط DKW حاوی ۲درصد ساکارز انجام شد. برای سازگاری، آزمایشی با شش ترکیب خاک انجام گرفت. نتایج نشان داد، محیط کشت DKW با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین (BAP) و ساکارز ۳درصد، بهترین محیط برای پرآوری، ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین (BAP) برای افزایش طول، نفتالن استیک اسید به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت DKW و ۲درصد ساکارز بهترین محیط برای ریشه‌زایی بودند. بهترین ترکیب خاک، شامل ماسه: پرلایت: پیت: رس سترون‌شده (استریل) با نسبت (۱: ۱: ۳: ۳) با میانگین ۸۸درصد زنده‌مانی بود. پس از دو ماه گیاهان به‌کلی سازگار شده و آمادهٔ انتقال به باغ بودند.

واژه‌های کلیدی: پرآوری، ریزازدیادی، ریشه‌زایی، سازگاری، طویل‌سازی، لیمو.

In vitro propagation of Persian lime (*Citrus latifolia*)

Narges Mojtahedi*
Assistant Professor, Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Seed and Plant Improvement Institutes Campus, Mahdasht Road, Karaj, Iran
(Received: Jan. 13, 2016 - Accepted: Apr. 19, 2016)

ABSTRACT

Application of tolerant and resistant rootstocks and varieties is the best way to overcome Witches' Broom Disease of Lime (WBDL). The aim of this research was to develop a practical protocol for micropropagtaion of Persian lime (*Citrus latifolia*) as one of the highly tolerant varieties. For culture establishment, apical and axillary buds of young stems of three-year-old trees were cultured in free hormone MS medium after surface sterilization. The explants were transferred to DKW and MS culture media containing different concentrations of BAP for proliferation after 20-30 days. Another experiment was carried out using Kinetin and BAP for determination of shoot elongation medium. Two separated experiments using three concentrations of IAA and NAA and three concentrations of IBA and NAA in DKW medium and 2% sucrose were used to obtain the best medium for rooting. To acquire the suitable soil mixture for acclimatization, an experiment using six different soil mixtures was done. The results showed that DKW basal culture medium supplemented with Gamborge's B5 vitamins, 1 $mg.L^{-1}$ BAP and 3% sucrose was the best medium for proliferation. DKW basal culture medium supplemented with Gamborge's B5 vitamins and 0.25 $mg.L^{-1}$ BAP was the best medium for elongation. The best rooting medium was DKW basal culture medium, Gamborge's B5 vitamins, 2% sucrose and 2 $mg.\ L^{-1}$ NAA. The optimum soil mixture with 88% of survival for acclimating *in vitro* plantlets was sand: perlite: peat: clay (1: 1: 3: 3). The plantlets could transfer to the orchard after 60 days.

Keywords: Acclimatization, elongation, lime, micropropagation, proliferation, rooting.

* Corresponding author E-mail: n_mojtahd@abrii.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

بیماری جاروک لیموترش (Witches' Broom Disease of Lime) یکی از بیماری‌های خطرناک لیموترش است که باعث مرگ درختان می‌شود و یکی از دلایل کاهش شدید تولید لیمو در ایران از سال ۱۳۷۸ است (FAO databank, 2014). در ایران لیموترش مکزیکی یا مکزیکن لایم (*Citrusaurantifolia* L.) به دلیل امکان آب‌گیری آسان‌تر و مزهٔ اسیدی‌تر میوه، وجود پایه‌های پاکوتاه و برداشت آسان‌تر میوه بیشتر کشت می‌شود، اما به دلیل نداشتن مقاومت این رقم در برابر بیماری جاروک لیموترش و هزینهٔ بالای آسیب وارده، خطر از بین رفتن کامل درختان لیموترش وجود دارد. بهترین راه ممکن مبارزه با بیماری، استفاده از پایه‌ها و رقم‌های متحمل و سالم است. تاکنون، گونه‌هایی از مرکبات مانند پرتقال شیرین، نارنج، گریپ‌فروت، لیموشیرین، نارنگی و رقم لیموترش ایرانی یا پرشین لایم (لایم تاهیتی) (*Citrus latifolia*) متحمل به این بیماری معرفی شده‌اند (Chung *et al*., 2006). لیموترش ایرانی، از لیموترش‌های درشت جهان و بدون بذر است. میوهٔ آن نسبت به لیموترش مکزیکی بزرگ‌تر، پوست نازک‌تر و مواد معطر کمتری دارد و میوهٔ آن خاصیت انبارمانی خوبی دارد. همچنین، در برابر شرایط نامساعد آب و هوائی مقاومت بیشتری دارد (Maurer, 1998). منشأ آن به‌طور کامل مشخص نیست، اما به نظر می‌رسد که یک دورگ (هیبرید) بین لیموترش مکزیکی (*Citrus aurantifolia* L.) و بالنگ (*C. medica* L.) و تریپلوئید (۲۷ کروموزوم) است (Bacchi, 1940; Moore, 2001)، هرچند ۱۸ کروموزوم طبیعی نیز گزارش شده است (Morton, 1987).

کشت بافت می‌تواند به‌عنوان یکی از روش‌های مکمل شیوه‌های متداول اصلاحی در لیموترش استفاده شود. امروزه ریزازدیادی مهم‌ترین کاربرد عملی کشت بافت است که در سطح گسترده‌ای برای افزایش گیاهان به‌صورت تجاری استفاده می‌شود و اهمیت ویژه‌ای در مورد گیاهان درختی و جنگلی که چرخهٔ (سیکل) زایشی طولانی‌تری داشته، دارد (Jones, 1986; Zimmerman, 1991). این روش به علت ساده بودن نسبی و نیز قابلیت آن در افزایش و تولید شمار زیادی گیاه یکسان از لحاظ ژنتیکی در یک دورهٔ به نسبت کوتاه و مستقل از فصل رشد، از نظر تجاری ترجیح داده می‌شود. یک برنامهٔ بهینهٔ ریزازدیادی در لیمو می‌تواند به‌طور مؤثری مواد گیاهی لازم را برای جایگزینی و نیز توسعهٔ باغ‌های لیمو در کشور از طریق همسانه (کلون) کردن مناسب‌ترین پایه‌ها و رقم‌های تجاری تأمین کند. بررسی‌های مختلفی در مورد ریزازدیادی مرکبات انجام شده است. به‌عنوان‌مثال، ریزازدیادی *C. aurantifolia*، *C. grandis* و *C. lemon*، با استفاده از ریزنمونه‌های سرشاخه‌های جانبی و انتهایی درختان بالغ انجام شده است (Al-Khayri & Al-Bahrany, 2001; Paudyal & Haq, 2000; Rathore *et al*., 2007). همچنین، کشت درون شیشه‌ای سرشاخه‌های بدون ویروس دورگ Kinnow (*Citrus nobilis* Lour × *Citrus deliciosa* Tenora) در محیط کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر 2iP و عصارهٔ مالت با موفقیت انجام شده است (Sharma *et al*., 2007). تأثیر ریزنمونه، محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزافزایی لیموشیرین (*Citrus limetta* Swing) نیز بررسی شده است (Khoshkhooi & Rezazadeh, 2000). در مرکبات، ریزشاخه‌های کوچک ریشه‌زایی ضعیفی دارند و تنها ریزشاخه‌هایی که طول مناسبی دارند، امکان انتقال به محیط ریشه‌زایی را دارند (Duran-Vila & Navarro, 1989). این امر نیاز به یک مرحلهٔ حد واسط افزایش طول را ضروری می‌سازد.

مرحله‌های ریشه‌زایی و سازگاری نیز دو مرحلهٔ مهم در تهیهٔ دستورکار ریزازدیادی گیاهان هستند. تحقیقات مختلفی در مورد مرحلهٔ ریشه‌زایی در ریزازدیادی مرکبات انجام شده است. به‌طورمعمول، نگهداری ریزشاخه‌ها در محیط حاوی غلظت‌های مناسبی از نفتالن استیک اسید یا ایندول بوتیریک اسید در ریشه‌زایی گونه‌هایی از مرکبات منجر به تولید ریشه شده است (Kotsias & Roussos, 2001). استفاده از نفتالن استیک اسید در مقایسه با ایندول بوتیریک اسید یا ایندول استیک اسید در سیترنج (Kitto & Young, 1981) و *C. halimii* (Normah *et*

Archive of SID

www.SID.ir

al., 1997) و ترکیبی از نفتالن استیک اسید، ایندول بوتیریک اسید و بنزیل آمینوپورین در القای ریشه‌زایی لیمو و نارنگی مؤثر بوده است (Singh *et al*., 1994). گیاهچه‌های کشت بافتی در محیط حاوی غلظت‌های بالای مواد مغذی و ساکارز رشد می‌کنند. لذا گیاهان تولیدی به‌طورمعمول پس از انتقال از محیط درون شیشه‌ای به گلخانه یا مزرعه، توان ادامهٔ حیات نخواهند داشت و نیاز به مرحلهٔ سازگاری برای گذر از مرحلهٔ درون شیشه به مرحلهٔ برون شیشه‌ای را دارند. ترکیب خاک مورد نیاز برای هرگونه یا رقم نیز متغیر و بسیار مهم است. مرحلهٔ سازگاری در مرکبات شامل انتقال به خاک ضدعفونی شده و قرار گرفتن در دما با شدت نور مناسب و رطوبت بالا (درصد ۹۸-۹۵) به مدت ۱۵ الی ۲۰ روز، کاهش تدریجی رطوبت با استفاده از باز کردن بخشی از در اتاقک رشد و سازگاری تا هنگامی‌که گیاهچه‌ها کامل قادر به تحمل شرایط گلخانه شوند، است.

در این پژوهش، مرحله‌های استقرار، پرآوری، طویل‌سازی، ریشه‌زایی و سازگاری لیموترش ایرانی بررسی و دستورکار افزایش انبوه آن، ارائه شده است.

مواد و روش‌ها

استقرار و پرآوری

نهال‌های سه ساله، از مؤسسهٔ تحقیقات مرکبات کشور (رامسر) دریافت و برای دریافت ریزنمونه‌ها و اجرای آزمایش‌ها در بخش کشت بافت و انتقال ژن پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی، در گلخانه نگهداری شدند. پس از جداسازی خارها و برگ‌ها و برش ساقه به قطعه‌های ۲-۱ سانتی‌متری از جوانه‌های انتهایی و جانبی شاخه‌های جوان نهال‌ها، ریزنمونه‌ها با الکل ۷۰درصد به مدت ۳۰ ثانیه و محلول وایتکس تجارتی ۱۰ درصد به مدت ده دقیقه و سه بار با آب مقطر سترون (استریل) ضدعفونی سطحی شدند. ریزنمونه‌ها در محیط کشت پایهٔ بدون هورمون موراشیگ و اسکوگ (MS) مستقر شده، سپس به اتاقک رشد با دمای۲ ± ۲۲ و ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی با شدت نور ۱۰۰-۸۰ $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ منتقل شدند. پس از حدود ۳۰-۲۰ روز از فعال شدن جوانه‌ها، سرشاخه‌های تولیدشده برای دستیابی به بهترین محیط کشت برای پرآوری، به محیط‌های کشت MS و DKW و تنظیم‌کنندهٔ رشد بنزیل‌آمینوپورین با غلظت‌های ۰، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر در قالب دو آزمایش جداگانه منتقل شدند. اطلاعات مربوط به شمار شاخه‌های جدید، شمار برگ و طول بلندترین شاخه در هر ریزنمونه، یک ماه پس از کشت گردآوری شد.

طویل‌سازی

برای طویل‌سازی ریزشاخه‌ها برای انتقال به محیط ریشه‌زایی، آزمایش دیگری با پنج غلظت بنزیل‌آمینوپورین (۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و سه غلظت کاینتین (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت DKW و ۳درصد ساکارز انجام شد. در آزمایش‌های طویل‌سازی، ریزنمونه‌های انتخاب‌شده، طول یکسان (۳ میلی‌متر) برای انتقال به محیط کشت طویل‌سازی داشتند. طول ریزشاخه‌ها یک ماه پس از کشت ارزیابی شد.

ریشه‌زایی

ریزشاخه‌ها پس از رشد مناسب، به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند. برای این منظور، دو آزمایش جداگانه با استفاده از سه غلظت ایندول استیک اسید (IAA) و نفتالن استیک اسید (NAA) (هر دو با غلظت ۱، ۱/۵، ۲ میلی‌گرم در لیتر) و آزمایش دوم با سه غلظت ایندول بوتیریک اسید (IBA) و نفتالن استیک اسید (NAA) (هر دو با غلظت ۱، ۱/۵، ۲ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت DKW و ۲درصد ساکارز انجام شد. در آزمایش‌های ریشه‌زایی، میانگین طول ریشه‌ها و شمار ریشه‌ها یک ماه پس از کشت ارزیابی شد.

سازگاری

برای بررسی شرایط سازگاری، آزمایشی با شش ترکیب خاک انجام شد. ترکیب‌های خاک مورد بررسی در زیر آورده شده است:

پیت: پرلایت (۱:۱)

رس: پیت: ورمیکولایت: پرلایت (۱:۱:۱:۱)

Archive of SID

www.SID.ir

رس: ماسه: پرلایت (۱:۱:۱)
رس: پیت: ماسه: پرلایت (۱:۱:۳:۳)
رس: ماسه: ورمیکولایت (۱:۱:۱)
رس: پیت: ماسه: پرلایت : ماسه (۱:۱:۱:۱)

ترکیب‌های خاک پیش از انتقال گیاهچه‌ها، در آون با دمای ۱۸۰ درجهٔ سلسیوس به مدت سه ساعت ضدعفونی شدند. از ظرف‌های پلاستیکی یک‌بارمصرف به‌عنوان گلدان استفاده شد و در انتهای هر ظرف سوراخ‌هایی برای زهکشی ایجاد و هر ظرف پلاستیکی با ظرف شفاف دیگری پوشش داده شد. پس از یک هفته، هوادهی تدریجی گیاهچه‌ها آغاز و پس از پایان هفتهٔ ششم، سرپوش لیوان‌ها به‌طور کامل برداشته شد. در آزمایش‌های ریشه‌زایی، میانگین طول ریشه‌ها، درصد ریشه‌زایی و شمار ریشه‌ها یک ماه پس از کشت گردآوری شد. در آزمایش سازگاری، درصد زنده‌مانی گیاهچه‌های ریشه‌دار پس از انتقال به هر ترکیب خاک بررسی شد.

همهٔ آزمایش‌ها در قالب فاکتوریل با طرح پایهٔ کامل تصادفی با پنج تکرار و دست‌کم پنج ریزنمونه در هر تکرار اجرا و تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SAS و مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام شد. طول ریزشاخه‌ها پیش از انتقال و یک ماه پس از کشت نیز اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث

نتایج آزمایش‌های پرآوری نشان داد، غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین (BAP) در محیط کشت DKW، شمار شاخه‌های بیشتری تولید کرد (جداول ۱ و ۲). در محیط کشت DKW، شمار برگ‌ها نسبت به محیط MS کاهش داشت. محیط کشت DKW با ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین، بهترین محیط کشت برای پرآوری بوده است. گزارش‌هایی مبنی بر اینکه، اکسین‌ها در پرآوری ژنوتیپ‌های مختلف مرکبات، مانند سیتوکینین‌ها ضروری نیستند، وجود دارد (Paudyal & Haq, 2000). تأثیر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آمینوپورین به‌تنهایی یا در ترکیب با کاینتین یا نفتالن استیک اسید در پرآوری (Perez-Molphe-Balch & Ochao-Alejo, 1997; Al-Khayri & Al-Bahrany, 2001) *C. aurantifolia*، (Khoshkhooi & Rezazadeh, 2000) *C. limetta* Swing و (Goswani *et al*., 2013) *C. limon* L. cv. Kaghzi Kalan نیز به اثبات رسیده است. تأثیر بنزیل آمینوپورین در پرآوری *C. limon* (Duran-Vila & Navarro, 1989)، *C. mitis* (Sim *et al*., 1989)، *C. reticulate* و *C. sinensis* (Perez-Molphe-Balch & Ochao-Alejo, 1997) گزارش شده است.

جدول ۱. تأثیر بنزیل آمینوپورین (BAP) بر پرآوری لیموترش ایرانی در محیط کشت MS یک ماه پس از کشت

Table 1. Effect of BAP concentration on Persian lime proliferation in MS medium one month after culture

BAP concentration ($mg.L^{-1}$)	Shoot number	Leaf number	Longest shoot length (mm)
0	1.17 ^{b}	4.16 ^{ab}	5.8 ^{a}
1	1.30 ^{a}	4.25 ^{a}	3.5 ^{b}
2	1.02 ^{c}	3.88 ^{ab}	3.2 ^{b}
4	1.00 ^{c}	3.21 ^{b}	2.6 ^{b}

میانگین‌های موجود در هر ستون با حرف‌های انگلیسی متفاوت اختلاف معنی‌دار در سطح ۱درصد با همدیگر با استفاده از آزمون دانکن دارند.

Different letters in each column indicate significant differences at the 1% level by Duncan's multiple-range test.

جدول ۲. تأثیر بنزیل آمینوپورین (BAP) بر پرآوری لیموترش ایرانی در محیط کشت DKW یک ماه پس از کشت

Table 2. Effect of BAP concentration on Persian lime proliferation in DKW medium one month after culture

BAP concentration ($mg.L^{-1}$)	Shoot number	Leaf number	Longest shoot length (mm)
0	2.41 ^{ab}	2.07 ^{c}	4.13 ^{ab}
1	2.79 ^{a}	2.80 ^{ab}	4.34 ^{a}
2	2.53 ^{a}	3.09 ^{a}	3.42 ^{bc}
4	2.04 ^{b}	2.50 ^{b}	2.69 ^{c}

میانگین‌های موجود در هر ستون با حرف‌های انگلیسی متفاوت برای صفت شمار شاخه در سطح ۵درصد و صفات شمار برگ و طول بلندترین شاخه در سطح ۱درصد اختلاف معنی‌دار با همدیگر با استفاده از آزمون دانکن دارند.

Different letters in each column indicate significant differences at the 5% level for "shoot number" and at 1% level for "highest shoot length" and "leaf number" by Duncan's multiple-range test.

نتایج آزمایش طویل‌سازی نیز نشان داد، غلظت ۰ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کاینتین و همچنین غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین (BAP)، برای افزایش طول تأثیر معنی‌دار

Archive of SID

www.SID.ir

داشتند (جدول‌های ۳ و ۴). همچنین اثر متقابل غلظت‌های این دو تنظیم‌کنندهٔ رشد نیز معنی‌دار بوده است (شکل ۱). بررسی نتایج نشان داد، غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین (BAP) در محیط کشت پایه DKW، به‌عنوان محیط مناسب برای افزایش طول مناسب است. نتایج این آزمایش مؤید نتایج خیری و بحرانی است که نشان دادند غلظت‌های بالای بنزیل‌آمینوپورین مهارکنندهٔ افزایش طول شاخه *Citrus aurantifolia* است (Al-Khayri & Al-Bahrany, 2001). برای حذف مرحلهٔ افزایش طول در ریزازدیادی رقم‌های مختلف لیمو، محققان اسپانیایی، استفاده از بنزیل‌آمینوپورین به همراه جیبرلیک اسید را توصیه کرده‌اند. اما درعین‌حال بروز رنگ‌پریدگی و ایجاد برگ‌های باریک با استفاده از جیبرلیک اسید نیز گزارش شده است (Pérez-Tornero *et al.*, 2009).

جدول ۳. اثر غلظت بنزیل آمینوپورین (BAP) بر افزایش طول لیموترش ایرانی یک ماه پس از کشت

Table 3. Effect of BAP on shoot elongation of Persian lime one month after culture

BAP concentration (mg.L^{-1})	Shoot length (mm)
0	12.75 ^{c}
0.25	14.48 ^{a}
0.5	14.59 ^{a}
1	12.94 ^{bc}
2	13.55 ^{b}

در هر ستون میانگین‌های دارای حرف‌های همسان از نظر آزمون آماری دانکن در سطح آماری ۱درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Different letters in each column indicate significant differences at the 1% level by Duncan's multiple-range test.

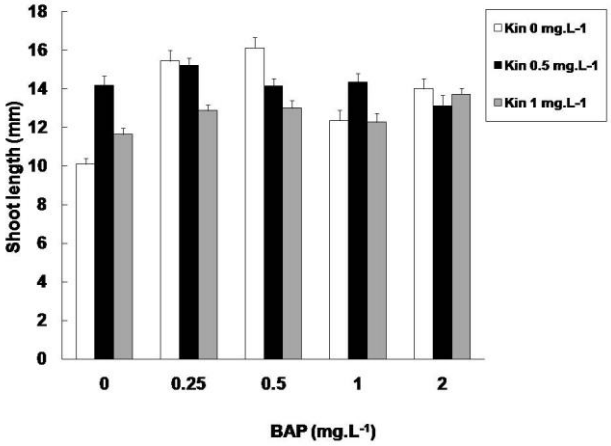
جدول ۴. اثر غلظت کاینتین بر افزایش طول لیموترش ایرانی یک ماه پس از کشت

Table 4. Effect of Kinetin (Kin) on shoot elongation of Persian lime one month after culture

Kin concentration (mg.L^{-1})	Shoot length (mm)
0	14.55 ^{a}
0.5	14.19 ^{a}
1	12.69 ^{b}

در هر ستون میانگین‌های دارای حرف‌های همسان از نظر آزمون آماری دانکن در سطح آماری ۱درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Different letters in each column indicate significant differences at the 1% level by Duncan's multiple-range test.



شکل ۱. اثر متقابل غلظت‌های مختلف تنظیم‌کنندهٔ رشد بنزیل‌آمینوپورین و کاینتین بر افزایش طول ریزشاخه‌های لیموترش ایرانی یک ماه پس از کشت. اطلاعات هر ستون شامل میانگین± SE هستند.

Figure 1. Effect of different concentration of BAP and Kin on shoot elongation of Persian lime one month after culture. Data are mean ± SE.

نتایج هر دو آزمایش ریشه‌زایی، نشانگر تأثیر معنی‌دار غلظت نفتالن استیک اسید بر هر دو صفت شمار و طول ریشه‌ها بود (جدول‌های ۵ و ۶). تأثیر ایندول استیک اسید بر ریشه‌زایی و همچنین اثر متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد با یکدیگر، معنی‌دار نبود. ایندول بوتیریک اسید با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر بیشترین شمار ریشه و با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بلندترین طول ریشه را تولید کرد (جدول ۷). با مقایسهٔ نتایج، غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید در محیط کشت DKW همراه با ویتامین‌های Gamborge's B5 و ساکارز ۲ درصد بهترین تنظیم‌کنندهٔ رشد و محیط کشت برای تولید بیشتر شمار ریشه‌ها با طول مناسب در مقایسه با غلظت‌های دیگر برای ریشه‌زایی لیموترش ایرانی بود (جدول‌های ۵ و ۶). حضور اکسین در محیط کشت

www.SID.ir

به‌طورمعمول برای ریشه‌زایی مرکبات ضروری است. تأثیر مثبت نفتالن استیک اسید و ایندول بوتیریک در ریشه‌زایی *C. limettiodies* در محیط MS با نصف غلظت عنصرهای پرمصرف و کم‌مصرف، همراه با مقادیر پایین ساکارز و تنظیم‌کننده‌های رشد نفتالن استیک اسید و ایندول بوتیریک اسید نیز به اثبات رسیده است (Khoshkhooi & Rezazadeh, 2000). همچنین، پس از انتقال شاخه‌های *C. aurentifolia* به محیط ریشه‌زایی با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید تا ۵۶ درصد ریشه‌زایی ایجاد کرد و۹۰ درصد گیاهان ریشه‌دار شده پس از انتقال به خاک سالم ماندند (Al-Khayri & Al-Bahrany, 2001).

نتایج آزمایش‌های سازگاری بیانگر تأثیر مثبت ترکیب چهارم خاک، رس: پیت: ماسه: پرلایت با نسبت‌های (۱:۱:۳:۳) و درصد زنده‌مانی ۸۸ درصد بود (جدول ۸). اهمیت و ارزش یک سامانهٔ ریزازدیادی تنها با انتقال و سازگاری موفق گیاهچه‌های کشت بافتی قابل سنجش و ارزیابی است. درصد زنده‌مانی گیاهچه‌های درون شیشه‌ای در مرکبات بین ۱۰ تا ۸۵ درصد متغیر است (Paudyal & Haq, 2000). در سال ۱۹۸۹ با استفاده از روش اتاق مرطوب و سامانهٔ مهپاش، سازگاری گیاهچه‌های کشت بافتی انجام و درصد زنده‌مانی بین ۶۰ تا ۹۰ درصد گزارش شد (Hidaka & Kajiura, 1989). استفاده از پاکلوبوترازول به‌عنوان پیش‌تیمار ریزشاخه‌های مرکبات، منجر به افزایش درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها شد. پاکلوبوترازول با کاهش طول گره‌ها، افزایش ضخامت ریشه‌ها و کاهش از دست دادن آب توسط برگ‌ها به دلیل تنظیم فعالیت روزنه‌ها و افزایش تولید سبزینه (کلروفیل)، به سازگاری گیاهچه‌ها کمک می‌کند (Hazarika *et al.*, 1998; 1999). ترکیب خاک شامل رس:پیت‌موس:ورمیکولایت با نسبت ۱:۱:۱ و آبیاری با کود NPK برای سازگاری *Citrus aurantifolia* Christm. Swing توصیه شده است (Al-Khayri & Al-Bahrany, 2001). در تحقیقی دیگر، ۹۵ درصد گیاهچه‌های ریشه‌دار شده *C. limon* در ترکیب خاک باغچه و کود ارگانیک سازگار شدند (Rathore *et al.*, 2007). در ایران نیز سازگاری گیاهچه‌های ریشه‌دارشده *C. limettiodies* در خاک سترون حاوی ورمیکولایت انجام شده است (Khoshkhooi & Rezazadeh, 2000). همچنین، گیاهچه‌های ریشه‌دارشده *C. aurantifolia* (christm) Swingle به خاک منتقل و حدود ۸۰ درصد نمونه‌ها سازگار شدند (Shahsavar, 2004).

جدول ۵. اثر غلظت‌های مختلف نفتالن استیک اسید (NAA) بر ریشه‌زایی لیموترش ایرانی در آزمایش تأثیر غلظت‌های مختلف ایندول استیک اسید (IAA) و نفتالن استیک اسید (NAA) بر ریشه‌زایی

Table 5. Effect of NAA on rooting of Persian lime in the "effect of NAA and IAA on rooting experiment"

NAA ($mg.L^{-1}$)	Root number	Root length (cm)
1	1.43 [a]	1.75 [b]
1.5	0.56 [b]	1.60 [b]
2	0.96 [ab]	2.91 [a]

میانگین‌های موجود در هر ستون با حرف‌های انگلیسی متفاوت برای صفت شمار ریشه در سطح ۵درصد و صفت طول ریشه‌ها در سطح ۱درصد اختلاف معنی‌دار با همدیگر با استفاده از آزمون دانکن دارند.

Different letters in each column indicate significant differences at the 5% level for "root number" and at 1% level for "root length" by Duncan's multiple-range test.

جدول ۶. اثر غلظت‌های مختلف نفتالن استیک اسید (NAA) بر ریشه‌زایی لیموترش ایرانی در آزمایش تأثیر غلظت‌های مختلف ایندول بوتیریک اسید (IBA) و نفتالن استیک اسید (NAA) بر ریشه‌زایی

Table 6. Effect of NAA on rooting of Persian lime in the "effect of NAA and IAA on rooting experiment"

NAA ($mg.L^{-1}$)	Root number	Root length (cm)
1	0.3 [b]	1.71 [b]
1.5	0.42 [b]	3.34 [a]
2	0.95 [a]	2.68 [a]

میانگین‌های موجود در هر ستون با حرف‌های انگلیسی متفاوت برای صفت شمار ریشه در سطح ۱درصد و صفت طول ریشه‌ها در سطح ۵درصد اختلاف معنی‌دار با همدیگر با استفاده از آزمون دانکن دارند.

Different letters in each column indicate significant differences at the 1% level for "root number" and at 5% level for "root length" by Duncan's multiple-range test.

جدول ۷. اثر غلظت‌های مختلف ایندول بوتیریک اسید (IBA) برریشه‌زایی لیموترش ایرانی در آزمایش تأثیر غلظت ایندول بوتیریک اسید (IBA) و نفتالن استیک اسید (NAA) بر ریشه‌زایی

Table 7. Effect of IBA on rooting of Persian lime in the "effect of NAA and IBA on rooting experiment"

IBA ($mg.L^{-1}$)	Root number	Root length (cm)
1	0.6 [a]	3.58 [a]
1.5	0.73 [a]	2.72 [a]
2	0.35 [b]	1.45 [b]

میانگین‌های موجود در هر ستون با حروف انگلیسی متفاوت در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار با همدیگر با استفاده از آزمون دانکن دارند.

Different letters in each column indicate significant differences at the 5% level by Duncan's multiple-range test.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۸. درصد زنده‌مانی لیموترش ایرانی با شش ترکیب خاک

Table 8. Survival rate of Persian lime using six different soil mixtures

Soil mixture	Survival rate (%)
Peat:Perlite (1:1)	33.3
Clay:Peat:Vermiculite:Perlite (1:1:1:1)	12.5
Clay:Sand:Perlite (1:1:1)	0
Clay:Peat:Sand:Perlite (1:1:3:3)	88.8
Clay:Sand:Vermiculite (1:1:1)	0
Clay:Peat:Sand:Vermiculite (1:1:1:1)	28.5

نتیجه‌گیری

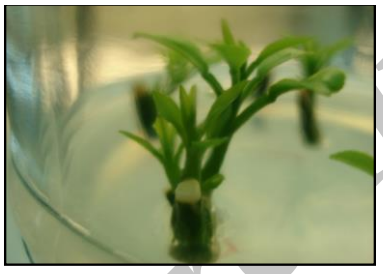
استقرار ریزنمونه‌های شاخهٔ لیموترش ایرانی پس از گردآوری سرشاخه‌های تازه از نهال‌ها یا درختان سالم سه ساله، جداسازی برگ‌ها و برش قطعه‌های ساقه شامل دست‌کم یک جوانهٔ جانبی (شکل ۲)، ضدعفونی سطحی با الکل ۷۰درصد به مدت ۳۰ ثانیه و محلول وایتکس تجارتی ۱۰ درصد به مدت ده دقیقه (شکل۳) و سه بار آبشویی با آب مقطر سترون و کشت در محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده‌های رشد، حاوی ویتامین‌های Gamborge's B5، ساکارز ۳درصد و آگار ۰/۷درصد (شکل ۴) انجام شد. پرآوری در محیط کشت DKW، ویتامین‌های Gamborge's B5، ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین، ساکارز ۳درصد و آگار ۰/۷درصد و واکشت ریزشاخه‌ها هر ۲۰ الی ۳۰ روز انجام گرفت (شکل ۵). افزایش طول در محیط کشت DKW، ویتامین‌های Gamborge's B5 و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین به مدت یک ماه انجام شد (شکل ۶). ریشه‌زایی ریزنمونه‌های لیموترش ایرانی در محیط کشت DKW حاوی ویتامین‌های Gamborge's B5، ۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید، ساکارز ۲درصد و آگار ۰/۷درصد به مدت یک ماه انجام شد (شکل ۷). پس از شستشوی کامل آگار از ریشه‌ها، گیاهچه‌ها به لیوان‌های یک‌بارمصرف منتقل شدند و سرپوش شفاف پلاستیکی روی هر گلدان قرار گرفت. سازگاری در ترکیب خاک شامل رس: پیت: ماسه: پرلایت با نسبت‌های (۱:۱:۳:۳) که پیش از انتقال سترون شده بودند، انجام گرفت (شکل۸). در سرپوش‌ها پس از پایان هفتهٔ دوم روزنه‌هایی ایجاد شد و شمار روزنه‌ها در بالای سرپوش‌ها افزایش یافت به‌طوری‌که درنهایت پس از انقضای هفتهٔ ششم سرپوش‌ها به‌طور کامل برداشته شدند (شکل ۹). پس از دو ماه گیاهچه‌ها آمادهٔ انتقال به باغ بودند.

شکل ۲. جداسازی سرشاخه‌ها و تهیهٔ ریزنمونه از سرشاخه‌های نهال سه‌سالهٔ لیموترش ایرانی

Figure 2. Explant preparation of three-year-old shoot tips of Persian lime

شکل ۳. ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌های لیموترش ایرانی با استفاده از محلول وایتکس تجارتی ۱۰درصد به مدت ۱۰دقیقه

Figure 3. Surface sterilization of Persian lime explants using 10% commercial bleach for 10 minutes



شکل ۴. ریزنمونه‌های سرشاخهٔ لیموترش ایرانی در محیط استقرار در محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده‌های رشد یک ماه پس از کشت

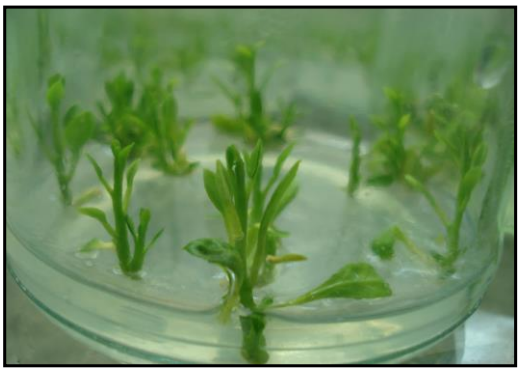
Figure 4. Culture establishment of Persian lime explants in free hormone MS media

شکل ۵. مرحلهٔ پرآوری لیموترش ایرانی در محیط کشت DKW و ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین یک ماه پس از کشت

Figure 5. Persian lime proliferation in DKW medium supplemented with 1 mg.L^{-1} BAP one month after culture

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۶. مرحلهٔ افزایش طول گیاهچه‌های لیموترش ایرانی در محیط کشت DKW و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین یک ماه پس از کشت

Figure 6. Persian lime shoot elongation in DKW medium supplemented with 0.25 mg.L^{-1} BAP one month after culture

شکل ۸. سازگاری گیاهچه‌های درون شیشه‌ای لیموترش ایرانی دو هفته پس از انتقال به ترکیب خاک

Figure 8. Acclimatization of Persian lime *in vitro* plantlets two weeks after transplantation

شکل ۷. ریشه‌زایی گیاهچهٔ لیموترش ایرانی در محیط کشت DKW، ۲میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید و ساکارز ۲درصد

Figure 7. Persian lime rooting in DKW medium supplemented with 2 mg.L^{-1} NAA and 2% sucrose.

شکل ۹. گیاهچهٔ سازگارشدهٔ رقم لیموترش ایرانی شش هفته پس از انتقال به ترکیب خاک

Figure 9. Persian lime adopted plantlets six weeks after transplantation

سپاسگزاری

از همکاری آقای محمد فتحی قره‌بابا در اجرای این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Al-Khayri, J. M. & Al-Bahrany, A. M. (2001). *In vitro* micropropagation of *Citrus aurantifolia* (Lime). *Current Science*, 81, 1242- 1246.
2. Bacchi, O. (1940). Observacoes citológicas em Citrus. I. Número de cromossô-mios de algumas espécies e variedades. *Jornal de Agronomia Piracicaba*, 3, 249-258.
3. Chung, K. R., Khan, J. A. & Brlansky, R. H. (2006). Citrus diseases exotic to Florida Witches Broom disease of lime (WBDL). Fact Sheet PP-228, Series of the Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
4. Duran-Vila, N. & Navarro, L. (1989). Morphogenesis and tissue cultures of three Citrus species. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 16, 123-133.
5. Goswami, K. Sharma, R. Singh, P. K. & Singh, G. (2013). Micropropagation of seedless lemon (*Citrus limon* L. cv. Kaghzi Kalan) and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19, 137-145.
6. Hazarika, B. N. Singh, I. P. Nagaraju, V. & Parthasarathy, V. A. (1998). An efficient method of acclimatization of micropropagated plantlets of citrus. *Annual Plant Physiology*, 12, 47-51.
7. Hazarika, B. N. Nagaraju, V. & Parthasarathy, V. A. (1999). Acclimatization techniques of citrus plantlets from *in vitro*. *Advances in Plant Science*, 12, 97-102.
8. Hidaka, T. & Kajiura, I. (1989). A simple method for acclimatization of *in vitro* plantlets of citrus. *Bulletin of the Fruit Tree Research*, 16, 19-28.
9. Jones, R. A. (1986). The development of salt-tolerant tomatoes: breeding strategies. *Acta Horticulturae*, 190, 101-114.

Archive of SID

www.SID.ir

10. Kitto, S. L. & Young, M. J. (1981). *In vitro* propagation of Carrizo citrange. *HortScience*, 16, 305-306.
11. Khoshkhooi, M. & Rezazadeh, R. (2000). Effect of explants, culture media and plant growth regulators on micropropagation of *Citrus limetta* Swing. *Journal of Horticultural Science and Technology*, 1, 1-14.
12. Kotsias, D. & Roussos, P. A. (2001). An investigation on the effect of different plant growth regulating compounds in *in vitro* shoot tip and node culture of lemon seedlings. *Scientia Horticulturae*, 89, 115-128.
13. Maurer, M. (1998). *Low desert citrus varieties*. College of Agriculture. University of Arizona. From https://cals.arizona.edu/fps/sites/cals.arizona.edu.fps/files/cotw/Mexican_Lime.pdf.
14. Moore, G. A. (2001). Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. *Trends in Genetics*, 17, 536-540.
15. Morton, F. J. (1987). Tahiti Lime. In: Fruits of warm climates. Julia F. Morton, Miami, FL. 172-175.
16. Normah, M. N. Hamidah, S. & Ghani, F. D. (1997). Micropropagation of *Citrns halimii*-an endangered species of South-east Asia. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 50, 225-227.
17. Paudyal, K. P. & Haq, N. (2000). *In vitro* propagation of Pummelo (*Citrus Grandis* L.). *In vitro Cellular and Developmental Biology* 36, 511-516.
18. Perez-Molphe-Balch, E. & Ochoa-Alejo, N. (1997). *In vitro* plant regeneration of Mexican lime and mandarin by direct organogenesis. *HortScience* 32, 931-934.
19. Pérez-Tornero, O. Tallón, C. I. & Porras, I. (2009). An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 100, 263-271.
20. Rathore, J. S., Rathore, M. S., Singh, R. P., Singh, M. & Shekhawat, N. S. (2007). Micropropagation of mature tree of (*Citrus limon*). *Indian Journal of Biotechnology*, 6, 239-244.
21. 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.
22. Shahsavar, A. (2004). Studied of rapid multiplication of *Citrus aurrantifolia* (christm) Swingle and *Citrus aurantium* L. using shoot tips. *Journal of Horticultural Science and Technology*, 5, 137-146.
23. Sim, G. E., Goh, C. J. & Loh, C. S. (1989). Micropropagation of *Citrus mitis* Blanco-multiple bud formation from shoot and root explants in the presence of 6-benzylarninopurine. *Plant Science*, 59, 203-210.
24. Singh, S., Ray, B. K., Bhattacharyya, S. & Deka, P. C. (1994). *In vitro* propagation of *Citrus reticulata* Blanco and *Citrus limon* Burm. *HortScience*, 29, 214-216.
25. Zimmerman, R. H. (1991). *Micropropagation of temperate zone fruit and nut crops*. In: Debergh, P.C. and Zimmerman, R. H. (eds.). Micropropagation technology and application. Kluwer Academic Publ. The Netherlands. 231-246.

Archive of SID

www.SID.ir