

کارایی تکنیک پیوند نوک شاخه در تولید پرتقال واشنگتن ناول عاری از ویروس تریتزا

* رضا فیفائی^۱، صغری خوشکام^۲، حشمت ا... رحیمیان^۳، حیعی تاجور^۱ و حسین طاهری^۱

^۱اعضاء هیأت علمی موسسه تحقیقات مرکبات کشور، ^۲محقق پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی کرج،

^۳استاد گروه گیاهپزشکی دانشکده علوم کشاورزی مازندران

تاریخ دریافت: ۸۴/۶/۹؛ تاریخ پذیرش: ۸۴/۱۲/۱۳

چکیده

در این مطالعه که به منظور تولید نهال عاری از ویروس تریتزا در پرتقال رقم واشنگتن ناول انجام شد از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار، چهار تکرار و ده گیاهچه به عنوان واحد آزمایشی استفاده گردید. برای اجرای آن، بافت مریستم نوک شاخه پرتقال واشنگتن ناول آلوده به ویروس به همراه دو آغازه برگ^۱ به طول دو دهم تا چهار دهم میلی‌متر از آن جدا شده و روی اپی کوتیل سربرداری شده گیاهچه‌های تروریر سیترنج و سیتروملو پرورش یافته در محیط کشت مصنوعی، زمانی که سه تا پنج سانتی‌متر طول داشتند به دو روش تی معکوس و ماس با لایه زاینده آوندی گیاهچه پایه که قبلاً سربرداری شده بود پیوند گردید. گیاهان پیوندی پس از انتقال به محیط کشت مایع در اطاقک رشد با دمای ثابت ۲۷ درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی ۱۶ ساعت با شدت ۱۰۰۰ - ۵۰۰۰ لوکس استقرار یافتند. بعد از گبرایی پیوند، زمانی که پیوندک دارای دو برگ نمو یافته بود به ترکیب خاکی مناسب منتقل شدند. جهت بررسی آلودگی گیاهان حاصله، از گیاه محک و آزمون سرولوژیکی الایزا استفاده گردید و کلیه گیاهچه‌های پیوندی عاری از ویروس تریتزا بودند. نتایج حاصله نشان داد که قرار دادن نوک شاخه در شکاف تی معکوس موفقیت بیشتری در گبرایی پیوند داشته همچنین بین پایه‌های مورد استفاده اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید.

واژه‌های کلیدی: پیوند نوک شاخه، ویروس تریتزای مرکبات، محیط کشت ام اس، گیاه محک، آزمون الایزا

مقدمه

گذشته از بین برده است (فرگوسن و همکاران،

۲۰۰۰).

روش غالب در گذشته برای گریز از آلودگی به بیماری‌های ویروسی و شبه ویروسی مرکبات، انتخاب دانه‌های نوسلار از ارقام چند جنین بود. حسن روش مذکور بر این پایه استوار است که اکثریت ویروس‌های مرکبات طی مراحل جنین‌زایی

کاهش رشد، 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 است زیان‌های اقتصادی فراوانی در باغ‌های مرکبات دنیا و ایران ایجاد نموده است. به‌عنوان مثال بیماری ویروسی تریتزا به تنهایی حدود ۵۰ میلیون درخت را طی ۴۰ تا ۵۰ سال

*- مسئول مکاتبه: rezafifaei@yahoo.com

علاوه بر سالم سازی، در قرنطینه ارقام وارداتی و ممانعت از ورود عوامل بیماریزای ویروسی و شبه ویروسی نیز کاربرد دارد (دی لانگ، ۱۹۷۸).

تریسترا از لحاظ اقتصادی، مهمترین عامل بیماریزای ویروسی مرکبات و یکی از مشکلات اصلی تولید آن در جهان می باشد که توسط ناقلین منتقل می شود (رحیمیان و همکاران، ۱۳۷۹). میلیون ها درخت روی پایه نارنج در آرژانتین، برزیل، ایالات متحده، اسپانیا و ونزوئلا از بین رفته و یا غیر اقتصادی شدند و سایر کشورهایی که از پایه نارنج استفاده می کنند نیز مورد تهدید جدی این بیماری هستند. این بیماری که از آسیا منشأ گرفته و با مواد آلوده گیاهی و شته های ناقل به نقاط مختلف دنیا انتشار یافته است تمامی گونه ها، ارقام، دورگ های بین جنسی و برخی از خویشاوندان مرکبات را تحت تأثیر قرار داده و در سال ۱۳۴۲ با ورود پیوندک و نهال ارقام زودرس نارنگی به نام های ایشی کاوا و سوجی یاما از ژاپن وارد کشور شد (زارعی و همکاران، ۱۳۷۶).

عامل بیماری یک ویروس رشته ای شکل^۲ و قابل انعطاف به ابعاد تقریبی 2000×12 نانومتر می باشد. این ویروس، یک ریبونوکلیئیک اسید (آر آن ا) ^۳ تک رشته ای با وزن مولکولی تقریباً $10^6 \times 6/5$ را در بر می گیرد. پوشش^۴ پروتئینی اولیه، وزن مولکولی ۲۶۰۰۰ کیلو دالتون دارد. رشته قابل انعطاف آن، نسبت به تکه تکه شدن حساس است. آلودگی فقط با ذرات دارای طول کامل پایه گذاری می شود. این ویروس اساساً محدود به آوند آبکش است اما در پوست بیرونی^۵ شاخه های جوان نیز مشاهده شده است (فرگوسن و همکاران، ۲۰۰۰).

مطالعات دیگری نشان داد کاربرد غلظت های مختلف توفوردی و کینتین در زمان های مختلف به عنوان پیش تیمار پیوندک ها تأثیری بر موفقیت ریز پیوندی ندارد. در این آزمایش ها بیشتر پیوندک ها از بین رفته و یا به حالت

حذف شده و انتقال نمی یابند و گیاهان نوسلار که با روش جنین زایی غیرجنسی تولید می شوند همان خصوصیات گیاهان مادری را دارا هستند. تنها محدودیت کاربرد این روش، طولانی بودن دوره نهالی در نهال های نوسلار حاصله می باشد. از جمله معایب دیگر نوسلارها می توان به رشد رویشی زیاد، تیغ دار بودن و ... اشاره نمود (ناور و همکاران، ۱۹۸۳).

یکی دیگر از روش های تولید گیاهان مرکبات عاری از ویروس، گرما درمانی می باشد که گیاهان حاصله، خصوصیات نهالی ندارند. اما این روش برای حذف برخی از انواع بیماری های شبه ویروسی مثل اگزوکورتیس و زایلوپوروسیس مؤثر نبوده است (اسکاریا و همکاران، ۱۹۹۶). بنابراین بایستی روشی به کار گرفته شود که هم بیماری های ویروسی و شبه ویروسی را حذف کند و هم خاصیت نهالی را به همراه نداشته باشد. بدین منظور از کشت جوانه انتهایی در آزمایشگاه استفاده گردید. روشی که در سطح وسیع برای تولید گیاهان علفی سالم به کار گرفته شد اما همه تلاش های مذکور برای به دست آوردن یک نهال مرکبات از این طریق بی نتیجه ماند (ادریس و همکاران، ۱۹۸۴).

موراشیگی و همکاران در سال ۱۹۷۲ توانستند تعداد کمی نهال مرکبات را با روش پیوند نوک شاخه گیاهان بیمار روی پایه های جوان در حال رشد در آزمایشگاه به دست آورند که بعضی از این گیاهان، عاری از اگزوکورتیس و فاقد خصوصیات نهالی بودند. این روش به نام پیوند نوک شاخه^۱ نامگذاری شد. با کمک این روش بیماری های تریسترا، اگزوکورتیس، استابورن و کاجکسیا خیلی آسان حذف شده و تقریباً ۱۰۰ درصد گیاهان تولیدی با روش STG عاری از این بیماری ها هستند. گسترده ترین برنامه های مرکبات در اسپانیا بر مبنای STG صورت گرفته و ۳۱ میلیون درخت سالم از این طریق تولید و در باغات این کشور کشت گردیده است (ناوارو و همکاران، ۱۹۷۵، ۱۹۸۸ و ۱۹۹۲). تکنیک STG

2- Clostrovirus
3- RNA
4- Capsid
5- Cortex

1- Shoot- tip grafting (STG)

زاینده باشد. ۲- پیوند تی معکوس)

عملیات مرحله اول عبارتند از: ۱- تهیه پایه: جهت تهیه پایه، ابتدا پوسته‌های بذور آزمایشی را برداشته سپس به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم شش دهم درصد و توئین ۲۰^۱ یک دهم درصد غوطه‌ور و پس از آن سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو گردید. هر بذور در یک لوله آزمایش مستقل به ابعاد ۲۵×۱۵۰ میلی‌متر محتوی ۲۵ سانتی‌متر مکعب محیط کشت ام اس^۲ که با یک درصد آگار جامد شده بود کاشته شد. لوله‌های کشت به مدت دو هفته در محیط تاریک با دمای ثابت ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تهیه پیوندک: بعد از تکثیر نهال‌های واشنگتن ناول نوسلار روی پایه پونسپروس تریفولیانا، مایه‌زنی انجام شده و بعد از تندش جوانه‌ها، ابتدا شاخه‌ها به طول سه سانتی‌متر انتخاب، سپس برگ‌های آن حذف به طوری که طول شاخه با جوانه انتهایی به یک سانتی‌متر کاهش یافت.

پیوند: ابتدا دانهال پایه، تحت شرایط استریل از لوله آزمایش خارج و سربرداری شد به طوری که حدود یک و نیم سانتی‌متر از اپی‌کوتیل باقی ماند. همچنین نوک ریشه را قطع کرده به نحوی که اندازه باقی مانده به چهار تا شش سانتی‌متر تقلیل یافت. لپه‌ها و جوانه‌های جانبی آن نیز حذف گردید. جهت آماده‌سازی پیوندک، تمامی برگ‌های باقیمانده باستانی سه برگ آخر با استفاده از ابزار برش و بینوکولار حذف و نوک شاخه متشکل از مریستم انتهایی و سه برگ آخر به اندازه دو دهم تا چهار دهم میلی‌متر در شکاف تی معکوس یا سطح اپی‌کوتیل در لبه سربرداری شده پایه قرار گرفت.

رکود فرو رفتند. علاوه بر آن تعداد گیاهان پیوندی که با موفقیت منتقل شدند بسیار کم بود و آزمون گیاهان تولیدی نیز انجام نشد (شهسوار و همکاران، ۱۹۹۴). زارعی و رحیمیان (۱۳۷۰) گزارش کردند از مجموع ۵۰ پیوند انجام شده ۱۰ پیوند موفق بوده و پیوندک‌ها پس از انجام پیوند شروع به رشد نمودند. نتایج مطلوب‌تر از پیوندک‌هایی که پس از قطع از درختان باغ به مدت ۲۴ ساعت در کیسه‌های پلاستیکی تیره در یخچال نگهداری شده بودند به دست آمد.

تحقیق حاضر به منظور تولید نهال عاری از بیماری ویروسی تریتزا در پرتقال رقم واشنگتن ناول انجام شد و در واقع کارآیی تکنیک پیوند نوک شاخه در عاری سازی رقم مزبور از ویروس تریتزا مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

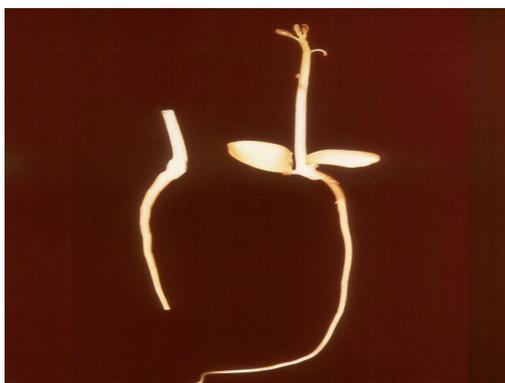
مرحله اول: در این مرحله، برخی از عوامل مؤثر بر ریزپیوندی نوک شاخه پرتقال واشنگتن ناول مورد بررسی قرار گرفته و مطالعه مذکور بر اساس روش استاندارد ارائه شده توسط ناوارو و همکاران (۱۹۹۲) می‌باشد. در این بررسی، از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار در چهار تکرار و ده گیاهچه در هر تکرار به عنوان واحد آزمایشی استفاده گردید. متغیرها شامل: پایه‌های مختلف در دو سطح (۱- ترویرسیترینج ۲- سیتروملو) و روش‌های مختلف قرار دادن پیوندک روی پایه در دو سطح (۱- قرار دادن نوک شاخه روی اپی‌کوتیل سربرداری شده به طوری که مقطع پیوندک مماس با لایه

1- Tween 20

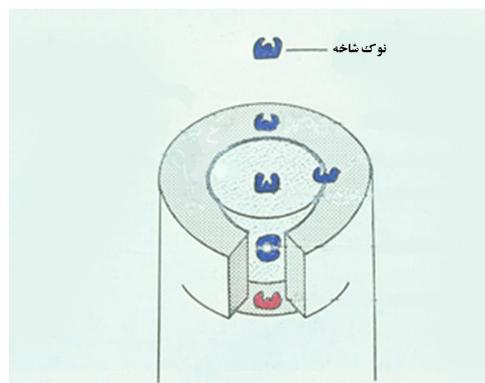
2- MS (Murashigue and Skoog)



شکل ۱- منبع تهیه پیوندک.



شکل ۳- آماده سازی دانهال‌های پایه جهت انجام پیوند



شکل ۲- نحوه انجام دو روش پیوند

مناسب برای رشد مرکبات انتقال می‌یابند. روی این گلدان‌ها، به وسیله کیسه‌های پلی‌اتیلنی پوشانده شده و دور گلدان‌ها با نوارهای لاستیکی بسته شده و در قسمتی از گلخانه و در سایه که دمای آن روی ۱۸-۲۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم و کنترل شده قرار گرفتند. بعد از هشت تا ده روز نوار دور کیسه‌های پلی‌اتیلنی باز شده ولی کیسه‌های مذکور روی نهال باقی ماند. هشت تا ده روز بعد از باز شدن نوار، این کیسه‌ها برداشته شده و گیاهان پیوندی تحت شرایط منظم گلخانه‌ای به رشد خود ادامه دادند. این روش نیازمند شرایط بسیار کنترل شده گلخانه‌ای و مراقبت‌های مداوم است و بسیاری از آزمایشگاه‌های دنیا در هنگام انتقال نهال، به دلیل آلودگی و رشد ضعیف تلفات زیادی را متحمل شده‌اند (ناوارو و همکاران، ۱۹۹۲؛ دی پاسکوال و همکاران، ۱۹۹۹).

کاشت گیاهان پیوندی در شرایط آزمایشگاهی: گیاهان پیوندی در محیط کشت مایع متشکل از محلول ام اس، ویتامین‌های وایت^۱ و محلول ساکارز با غلظت ۷۵ گرم در لیتر به مقدار ۲۵ سانتی‌متر مکعب در هر لوله آزمایش به ابعاد ۲۵×۱۵۰ میلی‌متر کاشته شده و در دمای ثابت ۲۷ درجه سانتی‌گراد و طول دوره روشنایی ۱۶ ساعت نگهداری شدند.

مرحله دوم: پس از اجرای مرحله اول و کسب موفقیت، شروع به تولید نهال در لوله آزمایش نموده و طرح وارد مرحله دوم گردید. در این مرحله، نهال‌های پیوندی به‌طور مستقیم به خاک منتقل می‌شوند. این نهال‌ها بایستی حداقل دارای دو برگ باشند که معمولاً سه تا شش هفته پس از پیوند، به این مرحله می‌رسند. بعد از آن، نهال‌های پیوندی به گلدان‌های محتوی ترکیب خاکی استریل با بخار آب و

1- White's vitamins



شکل ۴- انتقال گیاهان حاصل از پیوند نوک شاخه به خاک.

سپس عصاره مذکور در بافر رقیق شده و پس از طی مراحل مختلف آزمون الایزا، در صورت وجود آلودگی، تغییر رنگ درون چاهک‌های پلیت^۱ مشاهده خواهد شد که نمایانگر واکنش آنتی‌بادی و عصاره است که در واقع واکنش مثبت همان آلودگی به تریسترا تلقی می‌گردد (روستاگر، ۱۹۹۱).

نتیجه و بحث

جدول‌های ۱ و ۲ مبین تجزیه واریانس صفت مورد مطالعه (موفقیت پیوند) و مقایسه میانگین‌های آن می‌باشد که بررسی‌ها نشان می‌دهد روش پیوند در سطوح یک و پنج درصد معنی‌دار بوده و پیوند تی معکوس نسبت به روش قرار دادن نوک شاخه روی اپی‌کوتیل سربرداری شده ارجحیت دارد. ضمناً پایه‌های مختلف (ترویرسیترینج و سیتروملو) اثر معنی‌داری بر موفقیت پیوند نداشته است.

مرحله سوم: بعد از کسب موفقیت در ریزپیوندی و انتقال گیاهان تولیدی، این مرحله اجرا گردید. در این قسمت، جهت حصول اطمینان از تولید نهال‌های سالم پرتقال واشنگتن‌ناول، از گیاه محک و روش تست الایزا استفاده شد.

گیاه محک بیماری مذکور، لایم است که بسیار حساس بوده و بعد از مایه‌زنی علائم بیماری را سریعاً نشان می‌دهد. جهت انجام این کار، حداقل دو پیوندک از هر یک از نهال‌های تولیدی، تهیه و روی یک دان‌نهال کی‌لایم پیوند شد. پس از موفقیت در پیوند، آن‌ها را هرس شدید نموده تا شاخه‌های جدید بوجود آید. سپس در شرایط گلخانه‌ای خنک قرار داده شدند. در صورت وجود آلودگی، پس از چند هفته علائم روشن شدن رگبرگ‌ها و قاشقی شدن برگ‌ها روی گیاهان محک ظاهر خواهد شد. جهت انجام تست الایزا، از برگ‌ها و سرشاخه‌های جوان نهال‌های تولیدی، نمونه‌برداری و عصاره‌گیری کرده

جدول ۱- تجزیه واریانس صفت مورد مطالعه (موفقیت پیوند).

منابع تغییرات	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F محاسبه شده	سطح احتمال
نوع پایه	۱	۵۰۶,۲۵۰	۵۰۶,۲۵۰	۳,۵۲۱۷	۰,۰۸۵۱
روش پیوند	۱	۱۴۰۶,۲۵۰	۱۴۰۶,۲۵۰**	۹,۷۸۲۶	۰,۰۰۸۷
اثر متقابل	۱	۱۵۶,۲۵۰	۱۵۶,۲۵۰	۱,۰۸۷۰	۰,۳۱۷۷
خطا	۱۲	۱۷۲۵,۰۰۰	۱۴۳,۷۵۰	-	-

1- Plate wells

جدول ۲- مقایسه میانگین‌های صفت مورد مطالعه به روش دانکن.

تیمارها	میانگین	آزمون مقایسه دانکن % 5
گذاشتن نوک شاخه روی اپی کوتیل سربرداری شده پایه ترویرسیترنج	۷۲/۵۰۰	A
پیوند نوک شاخه به‌روش تی معکوس روی پایه ترویرسیترنج	۴۷/۵۰۰	AB
قراردادن نوک شاخه روی اپی کوتیل سربرداری شده پایه سیتروملو	۵۵/۰۰۰	B
پیوند نوک شاخه به‌روش تی معکوس روی پایه سیتروملو	۴۲/۵۰۰	B

حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. همچنین بررسی‌ها نشان داد استفاده از پیوندک‌های دارای دو آغاز برگی نقش مؤثری در تولید گیاهان عاری از بیماری ویروسی کانکیوگام دارد (چالوی و رحیمیان، ۱۹۹۲).

در تحقیق حاضر انتقال مستقیم گیاهان پیوندی به خاک (انتقال از شرایط آزمایشگاهی به محیط بیرون) با موفقیت بالایی صورت گرفته و به‌طور معمول بیش از ۹۰ درصد نهال‌های انتقال یافته رشد خوبی داشته و به بقاء خود ادامه دادند که با نتایج حاصل از مطالعات ناوارو مطابقت دارد. این روش نیازمند شرایط مساعد گلخانه‌ای و مراقبت‌های مداوم است و اکثر تلفات نهال‌های منتقل شده به دلیل عدم ایجاد شرایط مطلوب گلخانه‌ای است.

همچنین تست الایزای نمونه‌های انتقال یافته و استفاده از نبات محک جهت حصول اطمینان از سلامت آنها نشان داد که نمونه‌های مزبور عاری از ویروس تریستزا شده و روش پیوند نوک شاخه در حذف عامل بیماری‌زا موفقیت آمیز بوده است.

لذا بر اساس نتایج حاصله به نظر می‌رسد تکنیک پیوند نوک شاخه با بهره‌گیری از روش پیوند تی معکوس روی پایه‌های سه برگچه‌ای نقش بسیار مؤثری در حذف ویروس تریستزا داشته و می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های قدیمی سالم سازی همانند نوسلار گیری، گرما درمانی و ... باشد. علاوه بر آنکه می‌توان از این تکنیک در برنامه‌های سالم‌سازی، قرنطینه ارقام وارداتی و جداسازی ویروس‌ها در آلودگی‌های مرکب نیز بهره‌مند شد. گیاهان حاصله با این روش، خصوصیات نونهالی نداشته و معمولاً دو سال بعد از پیوند تشکیل گل و میوه می‌دهند. در این تحقیق از روش پیوند نوک شاخه در تولید تعداد محدودی

بررسی‌ها نشان داد بین پایه‌های مورد استفاده در این پژوهش (ترویرسیترنج و سیتروملو) اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید و در واقع پایه اثر معنی‌داری بر گیرایی و موفقیت ریزپیوندی نداشت که این مسئله با نتایج حاصله از آزمایش‌ها ناوارو و همکاران ایشان مطابقت دارد. ناوارو معمولاً در آزمایش‌ها خود از پایه ترویر سیترنج استفاده می‌کند امتیاز این پایه در سه برگچه‌ای بودن آن است به‌طوری که این صفت به عنوان مارکر عمل نموده و پایه و پیوندک به آسانی از همدیگر قابل شناسایی هستند.

همچنین تجزیه واریانس داده‌ها، مبین آن است که روش پیوند تی معکوس نسبت به روش قرار دادن نوک شاخه روی اپی کوتیل سربرداری شده ارجحیت دارد و درصد گیرایی پیوند بالاتر است. ناوارو در آزمایش‌ها خود اختلاف معنی‌داری بین این دو روش مشاهده نکرده است لیکن پیوند به روش تی معکوس به‌صورت استاندارد درآمده زیرا جوانه در این حالت به راحتی رشد کرده و با شاخه‌های نابجا اشتباه نمی‌شود.

اسکاریا و رویستاکر روش جدیدی را در نحوه پیوندزنی به کار بردند. به این ترتیب که از پیوند گاوای^۱ استفاده نموده و آن را با روش پیوند تی معکوس مقایسه نمودند. لیکن تفاوت معنی‌داری بین این دو روش مشاهده نگردید.

برخی مطالعات نشان داد پایه ترویر سیترنج از بین پایه‌های مورد استفاده شامل نارنج، ترویر سیترنج، پونسیروس و راف لمون، بهتر از سایرین بود همچنین بیشترین موفقیت پیوند زمانی حاصل شد که پیوندک در شکاف تی معکوس قرار داده شد. موارد مذکور با نتایج

1- Wedge grafting

آلوده نیز بایستی به طور همزمان انجام شود تا علاوه بر در اختیار داشتن منابع مادری سالم محیط سالمی نیز داشته و با افزایش عملکرد و کیفیت محصول، گام مؤثرتری در خودکفایی کشور عزیزمان در تولید نهال‌های سالم و عاری از بیماری برداشته شود.

نهال عاری از بیماری ویروسی ترستزا استفاده شده که تجاری کردن آن و تولید نهال سالم و عاری از بیماری‌های ویروسی و شبه ویروسی و همچنین استفاده توأم آن با گرما درمانی می‌تواند نقش مؤثری در تحقق اهداف کشاورزی و توسعه این روش ایفا نماید. البته بایستی بدین نکته نیز توجه نمود که ریشه کنی و امحاء درختان

منابع

۱. رحیمیان، ح.، علوی، و. و شایگان، ح. ۱۳۷۹. زوال درختان پرتقال روی پایه نارنج نشانه‌ای بر احتمال آغاز انتقال طبیعی ویروس ترستزای مرکبات در مازندران. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، شهریور ۱۳۷۹، صفحه ۱۳۲.
۲. زارعی، ع. و رحیمیان، ح. ۱۳۷۶. عاری‌سازی دو رقم نارنگی انشو از ویروس ترستزا توسط پیوندک نوک شاخه. مجله بیماریهای گیاهی، جلد ۳۳، صفحه ۸۹-۸۴.
3. Chalavi, V., Raeini saraj, M., and Rahimian, H. 1992. Elimination of Concave gum pathogen from Thomson navel trees through shoot tip grafting. Proc. Int. Soc. Citriculture, 814.
4. Delang, J.H. 1978. Shoot tip grafting, a modified procedure. Citrus and sub.fruit J. 53: 13-15.
5. De pasquale, F., Giuffrida, S., and Carimi, F. 1999. Minigrafting of shoots, roots, inverted roots, and somatic embryos for rescue of invitro citrus regenerants. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 124 (2): 152-157.
6. Edriss, M.H., and Burger, D.W. 1984. Micrografting shoot tip culture of citrus on three trifoliolate rootstocks. Scientia Hort. 23: 255-259.
7. Ferguson, J.J., and Garnsey, S.M. 2000. Citrus viruses and Virus-like diseases. Available on the WWW: URL: http://edis.ifas.ufl.edu/BODY_CH088.
8. Navarro, L. 1992. Citrus shoot tip grafting invitro. Biotechnology in agriculture and forestry, V. 18, 327-338.
9. Navarro, L. 1988. Application of shoot tip grafting in vitro to woody species. Acta Hort. 227: 43-55.
10. Navarro, L., Roistacher, C.N., and Murashigue, T. 1975. Improvement of shoot tip grafting invitro for virus-free citrus. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100: 471-479.
11. Nauer, E.M., Roistacher, C.N., Carson, T.L., and Murashigue, T. 1983. Invitro shoot tip grafting to eliminate citrus viruses and virus-like pathogens produces uniform budlines. Hortscience 18(3): 308-309.
12. Roistacher, C.N. 1991. Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis FAO publication.
13. Shamsavar, A., and Khosh-khui, M. 1994. The effects of several variables on shoot tip grafting of Clementine mandarin onto Troyer citrange. Iran agricultural research 13: 1-18.
14. Skaria, M., Roistacher, C.N., and Da graca, J.V. 1996. A virus – free Citrus budwood program for Texas. Proc. Int. Soc. Citriculture, 366-368.

Application of STG technique for production of Washington navel sweet orange free of tristeza virus

R. Fifaei¹, S. Khoshkam², H. Rahimian³, Y. Tadjvar¹ and H. Taheri¹

¹Scientific members of Iran Citrus Research Institute (Ramsar), ²Researcher of Agricultural Biotechnology Institute (Karaj), ³Professor College of Agriculture, Mazandaran University (Sari), Iran.

Abstract

In this research, that was carried out for produce CTV free plants, factorial design based on complete randomized design with four treatments and four replications was used. Each treatment had 10 plantlets. Shoot-tip of infected Washington navel orange by tristeza containing meristem and two leaf primordia was excised (0.2 – 0.4 mm). It was grafted on Troyer Citrange and Citrumelo seedlings by two methods, inverted T-budding and in contact with the vascular ring. These seedlings had 3-5 cm length. Grafted seedlings were planted on liquid medium and incubated on growth chamber in 27 °c and 16 hours photoperiod with 1000 lux illumination. If grafting was successful, plants were transplanted on suitable soil. Shoot-tip grafted plants were tested by DAS ELISA against tristeza virus. All of them were not infected. The results showed that inverted T- budding was more successful. There were no significant differences between used root stocks.

Keywords: Shoot-tip grafting (STG); Citrus tristeza virus (CTV); MS medium; Indicator plant; ELISA test