مجله ایمنی زیستی
دوره ۱۱، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷

بررسی باززایی و ریشه‌زایی نارنج (*Citrus aurantium* L) با بکارگیری تنظیم‌کننده‌های رشد NAA, IAA, Kinetin و سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز

عیسی قادری، محمد سوهانی، علی محمودی*
کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، گیلان، ایران
دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دنشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، گیلان، ایران
***کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران**

alimahmoudi68@yahoo.com

چکیده

نارنج با نام علمی *citrus aurantium*، نام درخت و میوه‌ای از تیره سدابیان (Rutaceae) و جنس مرکبات (Citrus) است. به‌منظور مطالعه جوانه‌زنی، باززایی و ریشه‌دهی نارنج (*Citrus aurantium L*) تحت شرایط in vitro، ریزنمونه‌های نارنج که شامل قطعات هیپوکوتیل و اپیکوتیل بودند، از دانه‌نهال‌هایی که به مدت چهار هفته در تاریکی و پس از آن به‌مدت هفت روز در روشنایی قرار داده شده بودند، تهیه شد. این ریزنمونه‌ها در محیط MS تکمیل شده با چهار سطح از تنظیم‌کننده‌های رشد کینتین (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و ایندول‌استیک‌اسید (IAA) (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. بیشترین میزان جوانه‌زنی در سطح ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و پس از آن ترکیب دو میلی‌گرم در لیتر IAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kinetin مشاهده شد که بیانگر هورمون IAA به‌منظور افزایش میزان جوانه‌زنی کارآمد نیست. در بخش ریشه‌زایی اثر سویه‌های 15834، 9534 و 318 اگروباکتریوم رایزوژنز و همچنین غلظت دو میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده‌ی رشد NAA بر ریشه‌زایی شاخساره‌های نارنج (*Citrus aurantium*) در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. در بین تیمارهای مورد بررسی، تیمارهای ترکیبی NAA و سویه 318 مناسب‌ترین تیمارها برای صفات در این پژوهش بودند.

کلمات کلیدی: اگروباکتریوم رایزوژنز، ایندول‌استیک‌اسید، باززایی، کینتین، نارنج.

مقدمه

مرکبات (Citrus) عضوی از خانواده روتاسه (Rutaceae) هستند که در سرتاسر جهان کشت می‌شوند. این جنس از نظر مزه خوب و کیفیتش شناخته شده است. اگرچه این گیاهان می‌توانند از طریق قلمه‌گیری و پیوند تکثیر پیدا کنند، اما کارآیی این روش‌ها پایین است (٤).

باززایی گیاهان می‌تواند از طریق جنین‌زایی سوماتیکی یا ارگانوژنز (اندام‌زایی) اتفاق بیافتد و به این صورت تعریف می‌شود که سلول‌ها و بافت‌ها متحمل تغییراتی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]
[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.1.2.8]

می‌شوند که در نهایت منجر به تشکیل یک ساختار واحد با ویژگی‌های مشخص می‌شود. این فرآیند معمولا در مرحله تمایز سلولی اتفاق میافتد که با تشکیل جوانه‌های نابجا تعریف می‌شود. ارگانوژنز می‌تواند به دو صورت مستقیم و غیرمستقیم انجام شود. اندام‌زایی مستقیم هنگامی اتفاق می‌افتد که تشکیل جوانه بدون تولید کالوس انجام شود، در حالی که پروسه تولید جوانه در ارگانوژنز غیرمستقیم به وسیله تولید کالوس دنبال می‌شود (۲۱).

نارنج (*Citrus aurantium* L) به عنوان پایه، دارای خصوصیات مطلوبی است (٦). پایه نارنج برای قلمه‌های پرتقال (sweet orange) بسیار مناسب است، هرچند که استفاده از آن به‌خاطر حساسیت به ویروس تریستزا که یکی از مخرب‌ترین بیماری‌ها برای مرکبات است و منجر به تخریب بسیاری از درختان می‌شود، به شدت محدود شده است (۵). در شرایط درون‌شیشه‌ای، ارگانوژنز در چندین گونه از مرکبات انجام شده است که در آن از قطعات اپی‌کوتیل و هیپوکوتیل در محیط کشت MS بهینه با BAP استفاده شده است (۲،۳). همچنین از محیط‌های کشت MS بهینه با BAP و NAA نیز گزارش شده است (۱۷،۱۸)

مطالعات متعدد انجام شده در زمینه‌ی ریشه‌زایی شاخساره‌های درون‌شیشه‌ای در گونه‌های چوبی مثل بلوط (۷) شاه‌بلوط (١٦)، درخت زبان گنجشک، صنوبر (١٤) و آوکادو بیانگر نقش بسزای اکسین به عنوان یک پیش‌نیاز جهت القای ریشه در گونه‌های چوبی سخت‌ریشه‌زا است. شمار زیادی از مطالعات فیزیولوژیکی از نقش مرکزی اکسین در فرآیند تشکیل ریشه گزارش کرده‌اند (۱۵) اکسین در مرحله طویل شدن و رشد ریشه نقشی ندارد (۱۳). پژوهش‌ها نشان داده است که نوعی از اکسین مورد استفاده، به‌طور مستقیم بر میزان و الگوی ریشه‌زایی تاثیر می‌گذارد (۹). به‌طوری که القای ریشه در شاخساره‌های درون-شیشه‌ای به=علت ماندگاری بیشتر NAA در محیط، در غلظت‌های پایین‌تری نسبت به IBA نیاز دارد. همچنین سرعت جذب اکسین‌های مختلف متفاوت است (٢٦).

اگروباکتریوم رایزوژنز از طریق منافذ طبیعی و یا زخم وارد بافت گیاهی شده و سبب شکل‌گیری ریشه‌های نابجا می‌شود. دو نوع نگرش درباره‌ی نحوه‌ی اثر اگروباکتریوم بر القای ریشه‌های موئین شکل گرفته است: ۱- تغییر در سوخت و ساز اکسین در سلول‌های تراریخته نقش مهمی در ایجاد فنوتیپ ریشه‌های موئین ایفا می‌کند (۱۰)؛ ۲- در مطالعات فیزیولوژیک انجام گرفته مشاهده شد که سلول‌های تراریخت حساسیت بیشتری نسبت به اکسین از خود نشان می‌دهند (۲۵). ریشه‌زایی موفق رایزوژنز توسط Chavez-Vela و همکاران (۸) روی نهال‌های بذری نارنج با استفاده از سویه‌ی وحشی A4 رایزوژنز حاوی وکتور pESC4 گزارش شده است.

هدف از این پژوهش بررسی میزان باززایی نارنج (*Citrus aurantiium* L) تحت شرایط درون‌شیشه‌ای با استفاده از تیمارهای مختلف Kinetin و IAA و همچنین ریشه‌زایی شاخساره‌های باززایی شده با بکارگیری فاکتورهای NAA و سویه‌های 15834، 318 و 9534 اگروباکتریوم رایزوژنز و ترکیبات آن‌ها و نیز رسیدن به یک روش بهینه برای تکثیر نارنج در شرایط کشت درون شیشه‌ای است که امکان تجزیه و بررسی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.1.2.8]

در سطح مولکولی و یا انتقال ژن را تسهیل کند.

مواد و روش‌ها

این مطالعه که در آزمایشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه گیلان صورت گرفت از بذور نارنج (*citrus aurantium* L) تازه و رسیده جهت کشت در محیط MS جامد استفاده شده است. بذور مورد نظر، پس از خارج‌سازی پوسته آن‌ها، با محلول ۷۰ درصد هیپوکلریدسدیم به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند (شکل۱- الف). ضدعفونی بعدی با اتانول ۷۰ درصد انجام شد که مدت آن یک دقیقه بود. پس از هر بار ضدعفونی، بذور سه مرتبه با آب مقطر استریل، آب‌کشی شدند و در مرحله بعد به محیط‌کشت ذکر شده انتقال پیدا کردند و به مدت چهار هفته در اتاقک رشد، در تاریکی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (شکل۱- ب). پس از یک ماه، ظرف‌های شیشه‌ای حاوی دانهال‌های نارنج به محیط با تیمار ۱۶ ساعت روشنایی در همان شرایط دمایی منتقل شدند. در پایان ۷ روز رنگ دانهال‌ها از سفید به سبز تغییر یافت که مناسب برای نمونه‌گیری از قسمت‌های هیپوکوتیل و اپیکوتیل است.

به‌منظور تاثیرگذاری بهتر تنظیم‌کننده‌های رشد مورد آزمایش بر ریزنمونه‌ها، انتهای دو طرف هر کدام از قطعات هیپوکوتیل و اپیکوتیل به اندازه دو تا سه میلی‌متر در جهت طولی برش داده شد و به محیط کشت MS جامد تکمیل شده با سطوح مختلف کینتین شامل ۰، ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌گرم در لیتر و ایندول‌استیک اسید (IAA) با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌گرم در لیتر و نیز ترکیب‌های مختلف این هورمون‌ها با یکدیگر انتقال داده شدند. نمونه‌ها در اتاقک رشد با شرایط کنترل شده، دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد همراه با روشنایی ۱۶ ساعته قرار داده شدند و هر دو هفته یک‌بار، نمونه‌ها به محیط کشت جدید با همان شرایط منتقل شدند. بعد از گذشت یک ماه از کشت (شکل ۱)، نمونه‌ها از نظر باززایی ارزیابی شدند (شکل ۱- پ، ت).

آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار انجام شد که در هر تکرار پنج ریزنمونه قرار داشت. نتایج در برنامه SAS ver 9 تجزیه و تحلیل شد و میانگین‌ها توسط آزمون دانکن مقایسه شدند.

به منظور رشد بیشتر شاخساره‌ها، آن‌ها به محیط کشت MS فاقد ترکیبات هورمونی منتقل شدند. پس از مدت سه هفته، از شاخساره‌ها جهت تلقیح با سویه‌های باکتری 15834، 318 و 9534 و تنظیم کننده‌ی رشد NAA به میزان دو میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. به‌منظور تاثیرگذاری بهتر این عوامل، انتهای این شاخساره‌ها به میزان دو الی سه میلی‌متر برش زده شد.

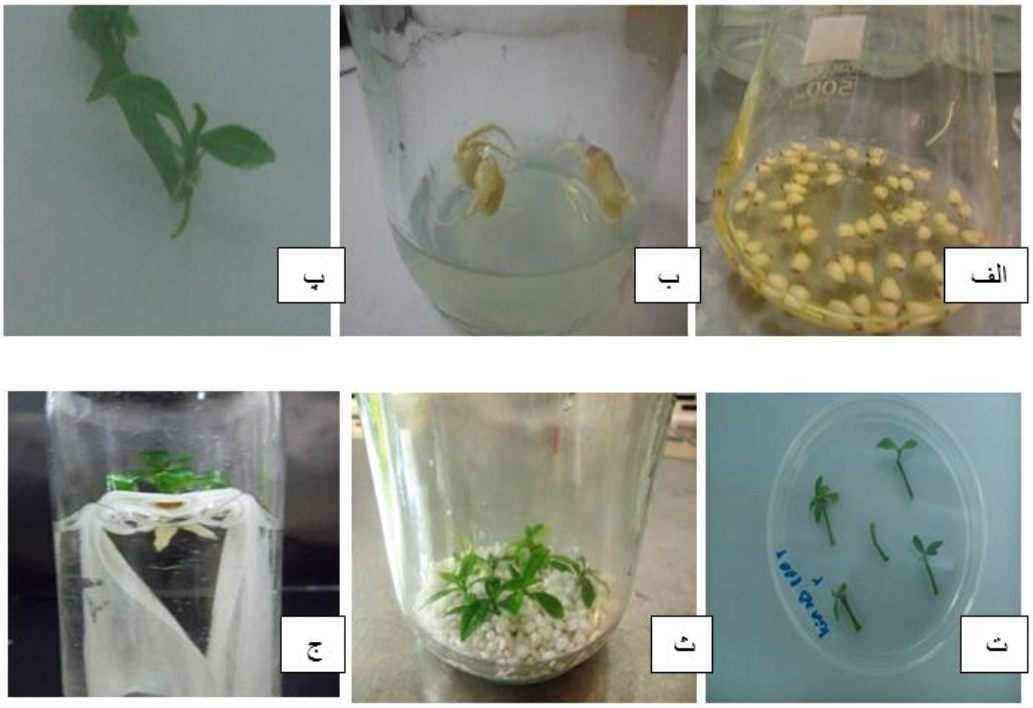
برای آماده‌سازی باکتری ابتدا سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز (15834, 318, 9534) در محیط YEP جامد حاوی آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت کشت داده شدند. پس از این دوره، از کلونی‌های رشد یافته در این محیط، جهت کشت در محیط YEP مایع حاوی آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین استفاده شد. سپس در داخل دستگاه شیکر انکوباتور (Amperetablle Multiron II) ساخت کشور آلمان به مدت ۱۶ ساعت و دور ۲۰۰ با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. مقدار باکتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل PG Instruments

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.1.2.8]

ItdT80+UV/VIS اندازه گرفته شد که عدد ۰/۸ را نشان داد و برای انجام سانتریفیوژ مناسب است. محلول‌های باکتری با دور ٤٥٠٠ به مدت ٥ دقیقه سانتریفیوژ شد.

انتهای شاخساره‌ها با محیط تلقیح که حاوی باکتری مورد نظر و مواد تشکیل دهنده‌ی محیط MS نیمه‌جامد بود به مدت یک ساعت آغشته شدند و سپس به محیط هم‌کشتی حاوی عناصر محیط MS مایع و پرلیت به مدت سه روز، در تاریکی و دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شدند (شکل ۱- ث). در این مدت باکتری فرصت لازم برای رشد روی بافت گیاهی را پیدا می‌کند. در انتهای سه روز، شاخساره‌ها با آب‌مقطر حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون به مدت ۲۰ دقیقه شسته شدند. سپس به منظور ریشه‌زایی، به محیط کشت MS مایع حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون منتقل شدند و هر دو هفته یک بار به محیط کشت جدید با همان ترکیبات جایگزین شدند (شکل۱- ج).



شکل۱- الف) ضدعفونی بذور نارنج، ب)جوانه‌زنی، پ و ت) باززایی، ث) تلقیح شاخساره‌های باززایی شده با سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز، ج) ریشه‌زایی شاخساره‌های باززایی شده.

آزمایش‌ها به صورت طرح کاملا تصادفی انجام شد. برای هر تیمار نه تکرار در نظر گرفته شد. هر تکرار شامل یک لوله‌ی آزمایش حاوی یک شاخساره بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS ver 9 و مقایسه‌ی میانگین با آزمون دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

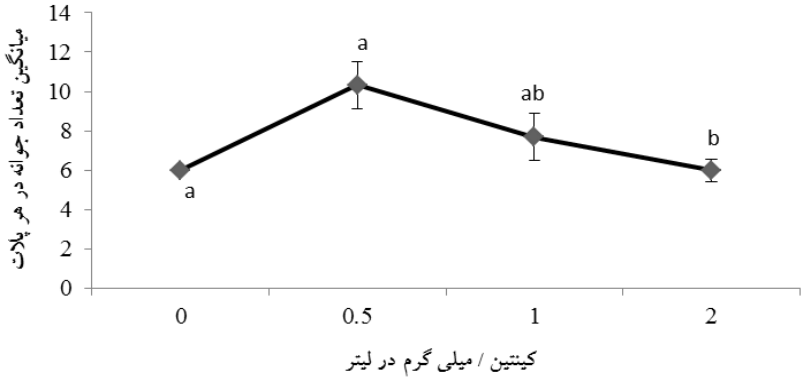
بخش باززایی

تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که بین سطوح مختلف هورمون کینتین اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد وجود داشت همچنین اثر متقابل Kinetin

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.1.2.8]

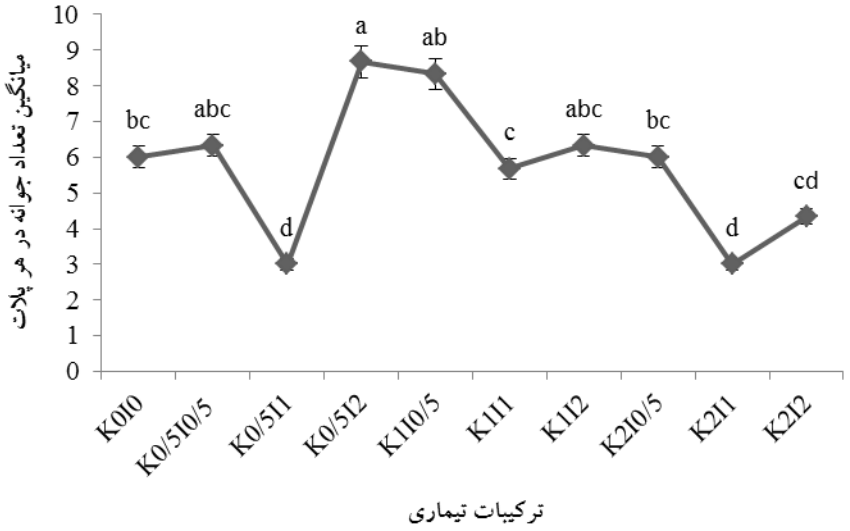
و IAA در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری را نشان داد. این پژوهش مشخص کرد که تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف هورمون IAA در باززایی نارنج وجود ندارد. اولین جوانه‌های مشاهده شده در این آزمایش، پس از گذشت ۱۰ روز از کشت آن‌ها مشاهده شد. بیشترین میزان جوانه‌زنی در تیمارهای مختلف این آزمایش، به تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین مربوط می‌شد که با مشاهده ۳۱ جوانه در سه تکرار، ۷۲ درصد افزایش در جوانه‌زنی را نسبت به تیمار شاهد که فاقد هورمون بود نشان داد (شکل ۲). Goswami و همکاران در سال (۱۲) نتایج مشابهی را برای باززایی لیموشیرین (*citrus limon*) بدست آوردند. به‌همین ترتیب، کمترین میزان جوانه‌زنی، در تیمار ترکیبی حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kinetin رخ داد که تعداد نه جوانه را نشان داد. همچنین همین مقدار جوانه‌زنی در تیمار ترکیبی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر Kinetin و یک میلی‌گرم در لیتر IAA مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد ۵۰ درصد افت را نشان داد. تجزیه و تحلیل‌ها افزایش معنی‌داری در سطح یک درصد در تیمار حاوی دو میلی‌گرم در لیتر IAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kinetin نسبت به شاهد نشان داد که تعداد جوانه ثبت شده در این تیمار ۲۶ جوانه بود. همچنین در تیمار ترکیبی حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و یک میلی‌گرم در لیتر Kinetin، تعداد ۲۵ جوانه به ثبت رسید که ۳۸ درصد افزایش را در جوانه‌زنی نسبت به شاهد را نشان داد (شکل۲). پژوهش Rogayah و همکاران نیز در سال (۲۲) در این زمینه روی Pummelo (*Citrus grandis*) نتایج مشابهی را در بیان کردند. نتایج به دست آمده از پژوهش (۱۹) نشان داد که تیپ‌های ساقه گیاه *Citrus reticulata* کشت شده در محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱/۵ میلی‌گرم کینتین، بیشترین درصد باززایی را نشان دادند. بیشترین میزان متوسط تعداد ساقه در هر ریزنمونه مربوط به ۱/۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و BAP بود.



شکل۲- تغییرات در میزان جوانه‌زنی با غلظت‌های مختلف کینتین. وجود حروف مشابه در غلظت‌های کینتین، نشانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر پایه مقایسه میانگین است.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.1.2.8]



شکل ۳- مقایسه میانگین جوانه‌زنی ترکیب‌های Kinetin و IAA. وجود حروف مشابه نشانگر عدم معنی‌داری بر پایه مقایسه میانگین است. K= Kinetin, I= IAA.

بر همین اساس به نظر می‌رسد هورمون Kinetin نقش موثری در جوانه‌زنی نمونه‌های اپیکوتیل و هیپوکوتیل نارنج (*citrus aurantium* L) در شرایط *in vitro* دارد. با افزایش غلظت کینتین تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، میزان باززایی در سطح قطعات هیپوکوتیل و اپیکوتیل افزایش یافت، در حالی‌که با افزایش غلظت آن بیش از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، روند رو به زوال در تولید جوانه مشاهده شد. با این‌حال در این طیف غلظتی، حداقل میزان باززایی در نمونه‌های شاهد دیده شد.

هورمون IAA در هیچ‌کدام از غلظت‌هایی که به‌کار برده شد، تفاوت معنی‌داری از نظر عملکرد، نسبت به نمونه‌های شاهد از خود نشان نداد که می‌توان این چنین استنتاج کرد که IAA به تنهایی، نقش موثری در تولید جوانه و باززایی گونه‌ی نارنج ندارد.

شکل ۳ نشان می‌دهد که نوسانات بسیار زیادی در تولید جوانه و باززایی نارنج در ترکیبات تیماری هورمون‌های Kinetin و IAA نشان داده شده است. مقایسه میانگین این ترکیبات، بیانگر تفاوت معنی‌داری در عملکردشان نسبت به یکدیگر است همچنین از این شکل می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب هورمون‌های Kinetin و IAA می‌تواند در دو جهت منفی و مثبت در باززایی نارنج نقش ایفا کنند. بنابراین در جوانه‌زنی یا باززایی نارنج، ترکیب هورمون‌های Kinetin و IAA می‌تواند تیمارهای مناسبی را برای اهداف مورد نظر به‌همراه داشته باشند.

بخش ریشه‌زایی

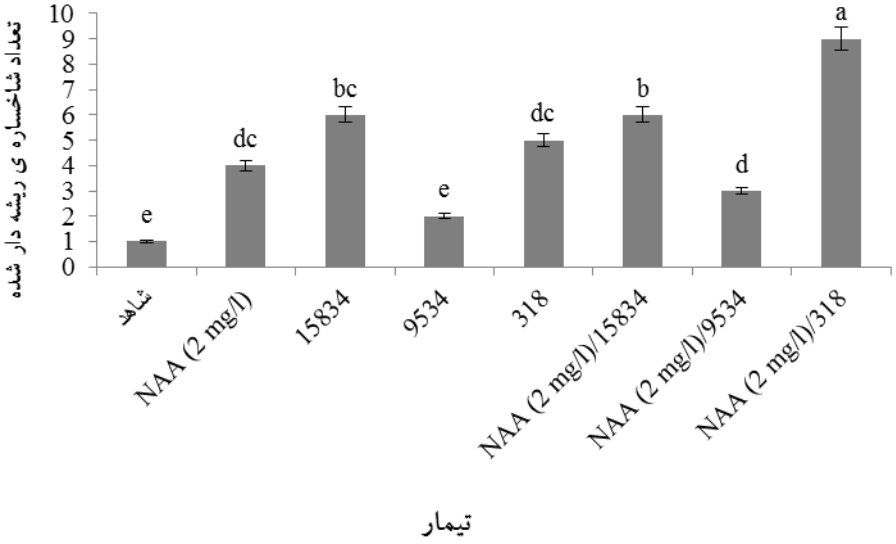
پس از گذشت ٤٥ روز از کشت شاخساره‌های نارنج در محیط کشت ریشه‌زایی، تعداد شاخساره‌های ریشه‌دار شده، درصد ریشه‌زایی و میانگین طول ریشه در هر تیمار ارزیابی شد. اولین ریشه‌های مشاهده شده مربوط به تیمار 15834 بود که ۱۰ روز پس از کشت شاخساره‌های نارنج مشاهده شد. تجزیه‌ی داده‌ها نشان داد که تعداد شاخساره‌های ریشه‌دار شده در تیمارهای مختلف این آزمایش، افزایش معنی‌داری با تیمار شاهد

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.1.2.8]

(فاقد هورمون و باکتری) در سطح یک درصد داشت. به‌طوری که بیشترین میزان آن مربوط به تیمار ترکیبی حاوی هورمون NAA به میزان دو میلی‌گرم در لیتر و سویه‌ی 318 اگروباکتریوم رایزوژنز بود که ۱۰۰ درصد ریشه‌زایی را نشان داد. این نتایج با گزارش‌های Ghorbel و همکاران (۱۱) روی ریشه‌زایی شاخساره‌های *Troyer citrange* مطابقت داشت. بخش‌های گره‌ای کشت داده شده در پژوهش Mokhtar و همکاران (۲۰۰۵) روی MS حاوی دو میلی‌گرم NAA، بیشترین میزان ریشه‌دهی را شامل بود. در آزمایش‌های انجام شده بر روی نارنج، بهترین تیمار ریشه‌زایی یک میلی‌گرم در لیتر IBA در ترکیب با یک میلی‌گرم در لیتر NAA گزارش شده و تیمار ترکیبی را موثرتر از حضور NAA به تنهایی دانستند (۲٤). در مطالعه‌ای دیگر بر روی نارنج، بیشترین میزان ریشه‌زایی در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به تنهایی یا در ترکیب با دو میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آمد (۱).

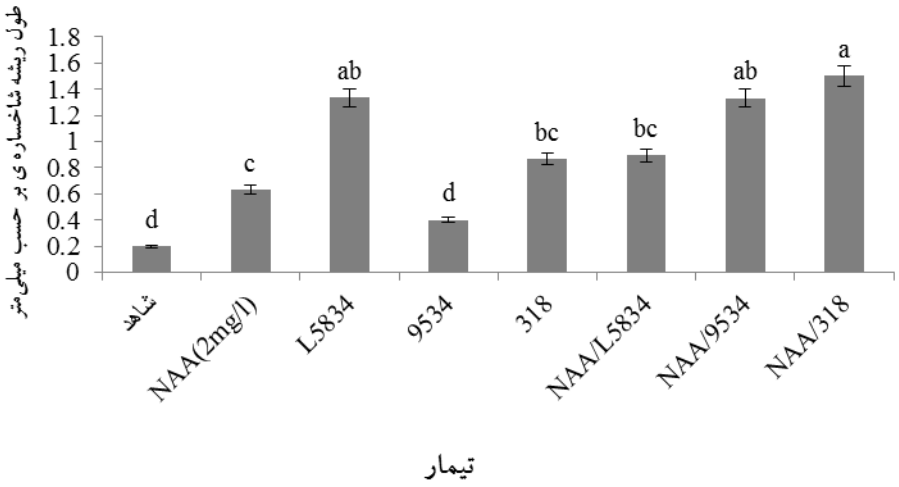
کمترین میزان ریشه‌زایی مربوط به تیمار شاهد این آزمایش بود که هیچ تیمار هورمونی و باکتریایی روی آن انجام نشد، میزان این ریشه‌زایی برابر ۱۱ درصد بود (شکل۱). در نتایج تجزیه‌ی داده‌های مربوط به صفت طول ریشه، به غیر از سویه 9534 بقیه تیمارها در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری با شاهد داشتند که این افزایش طول ریشه، در تیمارهای ترکیبی با میزان بیشتری همراه بود و با نتایج ریشه‌زایی هم‌پوشانی وجود دارد. اگروباکتریوم رایزوژنز با تغییر دادن فعالیت طبیعی اکسین در گیاه سبب بهبود ریشه‌زایی می‌شود (۲۰). بنابراین تیمارهای ترکیبی NAA و سویه‌های 15834 و 318 در افزایش ریشه‌زایی و همچنین طول ریشه نقش مستقیمی داشتند که نشان دهنده‌ی ریشه‌زایی و رشد کارآمدتر در محیط ترکیبی است.



شکل۴- میانگین تعداد شاخساره‌ی ریشه‌دار شده در تیمارهای مختلف حروف مشابه نشانه عدم معنی داری بین سطوح است.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.1.2.8]



شکل۵- میانگین طول ریشه شاخساره‌ی ریشه‌دار شده در تیمارهای مختلف. حروف مشابه نشانه عدم معنی‌داری بین سطوح است.

این مشاهدات نشان داد که تیمارهای هورمونی و باکتریایی می‌تواند تاثیر زیادی در افزایش ریشه‌زایی شاخساره‌های نارنج داشته باشد. این افزایش در ریشه‌زایی هنگامی بیشتر دیده می‌شود که تیمارهای هورمونی و باکتریایی در ترکیب با هم به‌کار برده شوند و اثر متقابل آن‌ها روی هم باعث افزایش در میزان ریشه‌زایی شاخساره‌های نارنج می‌شوند.

فهرست منابع

References

1. **Al-Bahrany AM. 2002.** Effect of phytohormones on in vitro shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia (Christm.)* Swing. Scientia Horticulturae 95: 285-295.
2. **Almeida WAB, Mourao Filho FAA, Mendes BMJ, Rodriguez APM. 2006.** Histological characterization of in vitro adventitious organogenesis in *Citrus sinensis*. Biologia Plantarum 50: 321-325.
3. **Almeida WAB, Mourao Filho FAA, Mendes BMJ, Rodriguez APM. 2002.** In vitro organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. Scientia Agricola Piracicaba 59:35-40.
4. **Anonymous, 2004.** Agriculture Statistics of Pakistan. Ministry of Food, Agriculture & Cooperatives. Govt. of Islamabad, Pakistan, p. 89.
5. **Bar-Joseph MR, LEE RF. 1989.** The continuous challenge of *citrus tristeza* virus control. Annual Review of Phytopathology 27: 291- 316.
6. **Castle WS, Tucker DPH, Krezdorn AH, Youtsey CO. 1993.** Rootstocks for Florida citrus. University of Florida, Gainesville.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.1.2.8]

7. Chalupa V. 1984. In vitro propagation of oak (*Quercus robur L.*) and linden (*Tilia cordata Mill*.). Biologia Plantarum 26: 374-377.

8. Chavez-Vela NA, Chavez-Ortiz LI, Perez-Molphe Balch E. 2003. Genetic transformation of sour orange using Agrobacterium rhizogenes. Agrociencia 37:629-639.

9. Deklerk GJ, Krieken VDW, Jong DJ. 1999. The formation of adventitious root: New concepts, new possibilities. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 35: 189-199.

10. Gelvin SB. 2006. Agrobacterium virulence gene induction. Agrobacterium Protocols 343: 77-85.

11. Ghorbel R, Navarro L, Duran-Vila N. 1998. Morphogenesis and regeneration of whole plants of grapefruit (*Citrus paradisi*), sour orange (*C aurantium*) and alemow (*C. macrophylla*). The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 73: 323-327.

12. Goswami K, Sharma R, Singh PK, 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

13. Hartmann H.T, Kester DE, Davies FT. 1989. Plant Propagation: Principles and Practices, 5th edn. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 199-255.

14. Hausman JF, Kevers C, Gaspar T. 1994. Involvement of putrescine in the inductive rooting phase of poplar shoots raised in vitro. Physiologia Plantarum. 92:201-206.

15. Jarvis BC. I.Shaheed A. 1986. Adventitious root formation in relation to the uptake and distribution of supplied auxin. New Phytologist Journal 103: 23-31.

16. Mato MC, Vieitez AM. 1986. Changes in auxin protectors and IAA oxidases during the rooting of chestnut shoots in vitro. Physiologia Plantarum, 66(3): .491-494.

17. Moreira-Dias JM, Molina RV, Bordon Y, Guaediola JL, Gaecia-luis A. 2000. Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotilyl cuttings of Troyer citrange differ in hormone requirements and their response to light. Annals of Botany 85: 103-110.

18. Moreira-Dias JM, Molina RV, Bordon Y, Guaediola JL, Gaecia-luis A. 2001. Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange. Scientia Horticulturae 87: 275-290.

19. Mukhtar RASHID, Khan MM, Fatima B, Abbas M, Shahid ADNAN. 2005. In vitro regeneration and multiple shoots induction in *Citrus reticulata* (Blanco). International Journal Agricultural Biology 7: 414-416.

20. Ouartsi A, Clérot D, Meyer AD, Dessaux Y, Brevet J, Bonfill M. 2004. The TDNA ORF8 of the cucumopinetype Agrobacterium rhizogenes Ri plasmid is involved in auxin response in transgenic tobacco. Plant Science. 166: 557-567.

21. Phillips RC. 2004. Invited review: in vitro morphogenesis in plants – recent advances. In Vitro Cellular & Developmental Biololy – Plant 40: 342-4
5.

22. Rogayah S, Shaib JM, Marzukhi H. 2006. Preliminary studies on direct plant regeneration from stem segments of pummelo (Citrus grandis) cv. Melomas. Journal of Tropical Agriculture and Food Science 34(1):111.

23. Ridout MS, Hammatt N. 1992. Micropropagation of common ash *(Fraxinus excelsior*). Plant Cell Tissue Organ Culture 31: 67-74.

24. Singh S, Ray BK, Bhattacharyya S, Deka PC. 1994. In vitro propagation of *Citrus reticulata* Blanco and

Citrus limon Burm. f. HortScience 29: 214-216.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.1.2.8]

25. Shen WH. Petit A, Guern J, Temp J. 1988. Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. Proceedings of the National Academy of Sciences 85: 3417-3421.

26. Van der krieken H, Breteler H, Visser MH, mavridou D. 1993. the role of conversion of IBA into IAA on root regeneration in apple: introduction of a test system. Plant cell Repor 12: 203-206.

Study of Regeneration and Rooting of Orange *(citrus aurantium L.)* Using Kinetin, IAA, NAA and Agrobacterium rhizogenes Strains

Isa Ghaderi, Mohamad Sohani, Ali Mahmoudi*
MSc of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Gilan, Iran
Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Guilan, Iran
* MSc of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, Guilan University, Guilan, Iran

alimahmoudi68@yahoo.com

Abstract
Orange is with academic name of Citrus aurantium from Rutaceae family and citrus of Citrus. In order to study the germination, regeneration, and root of orange (*Citrus aurantium L.*) under in vitro conditions, orange primers containing hypocotyl and epicotyl fragments were seeded for four weeks in the dark and then for seven days in Lighting was provided. These explants were cultured in MS medium supplemented with four levels of kinetin growth regulators (0, 0.5, 1 and 2 mg / L) and indole acetic acid (IAA) (0, 0.5, 1 and 2 mg / L). The highest level of germination was observed at 0.5 mg / L Kuintin, and then 2 mg / L IAA in addition to 0.5 mg / L Kinetin, which indicates that IAA hormone is not effective for increasing germination. In rooting section, the effects of strains 15834, 9534 and 318 Agrobacterium rhizogenesis, also the concentration of 2 mg / L of NAA growth regulator on rooting of orange citrus (*citrus aurantium)* strains were investigated. Among the treatments, NAA and strain 318 combination treatments were the most suitable treatments for traits in this study.
Keywords: Agrobacterium rhizogenesis, IAA, Kinetin, orange, regeneration.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.1.2.8]