

# In the Name of God

# **Recent Topics in Horticulture**

**M. Gholami**



**MICROGRAFTING**

or

**SHOOT-TIP GRAFTING (STG)**



2012

Rank	Area	Production (Int \$1000)	Flag	Production (MT)
1		3481071	*	18012560
2		1578237	*	8166480
3		1256177	*	6500000
4		966290	*	5000000
5		708636	*	3666790
6		566980	*	2933800
7		538493	*	2786397
8		342163	*	1770503
9		321194	*	1662000
10		311691	*	1612828
11		311490	*	1611784
12		275392	*	1425000
13		248336	*	1285000
14		185863	*	961738
15		173932	*	900000
16		155092	*	802517
17		152983	*	791600
18		120786	*	625000
19		104785	*	542207
20		100657	*	520845

2011

Rank	Area	Production (Int \$1000)	Flag	Production (MT)
1	Brazil	3575879	*	18503139
2	United States of America	1445168	*	7477924
3	India	1153054	*	5966400
4	China, mainland	1047071	*	5418000
5	Mexico	783010	*	4051631
6	Spain	601960	*	3114800
7	Egypt	464015	*	2401015
8	Italy	462594	*	2393663
9	Indonesia	392101	*	2028904
10	Turkey	330567	*	1710500
11	Pakistan	290853	*	1505000
12	Iran (Islamic Republic of)	290431	*	1502819
13	South Africa	273379	*	1414585
14	Greece	174183	*	901300
15	Morocco	164114	*	849197
16	Argentina	161077	*	833486
17	Viet Nam	140962	*	729400
18	Syrian Arab Republic	129270	*	668900
19	Algeria	112572	*	582496
20	Ghana	112089	*	580000

# 2005

Rank	Area	Production (Int \$1000)	Flag	Production (MT)
1	Brazil	3450320	*	17853443
2	United States of America	1622066	*	8393270
3	Mexico	794814	*	4112711
4	India	640457	*	3314000
5	China, mainland	492244	*	2547084
6	Spain	459225	*	2376230
7	Italy	437034	*	2261404
8	Iran (Islamic Republic of)	435450	*	2253209
9	Indonesia	427876	*	2214019
10	Egypt	375001	*	1940420
11	Pakistan	332597	*	1721000
12	Turkey	279257	*	1445000
13	South Africa	240887	*	1246454
14	Greece	180907	*	936094
15	Argentina	171201	*	885871
16	Morocco	161370	*	835000
17	Viet Nam	116206	*	601300
18	Ghana	96629	*	500000
19	Australia	96264	*	498112
20	Syrian Arab Republic	87468	*	452600

# 2000

Rank	Area	Production (Int \$1000)	Flag	Production (MT)
1	Brazil	4122243	*	21330258
2	United States of America	2278643	*	11790680
3	Mexico	736831	*	3812683
4	India	516907	*	2674700
5	Spain	505605	*	2616220
6	Italy	362587	*	1876182
7	Iran (Islamic Republic of)	356283	*	1843564
8	Egypt	311245	*	1610520
9	Pakistan	256646	*	1328000
10	South Africa	226074	*	1169806
11	Turkey	206786	*	1070000
12	China, mainland	203693	*	1054000
13	Greece	182776	*	945765
14	Morocco	168134	*	870000
15	Argentina	152112	*	787096
16	Indonesia	124468	*	644052
17	Australia	98556	*	509973
18	Venezuela (Bolivarian Republic of)	96004	*	496768
19	Cuba	90925	*	470487
20	Viet Nam	82463	*	426700

# 1998

Rank	Area	Production (Int \$1000)	Flag	Production (MT)
1	Brazil	4029526	*	20850504
2	United States of America	2396592	*	12401000
3	Mexico	643771	*	3331152
4	Spain	474523	*	2455390
5	India	454967	*	2354200
6	Iran (Islamic Republic of)	338044	*	1749185
7	Egypt	278610	*	1441652
8	Pakistan	251815	*	1303000
9	Italy	249994	*	1293580
10	Morocco	213318	*	1103800
11	China, mainland	207559	*	1074000
12	Argentina	190133	*	983833
13	Turkey	187460	*	970000
14	South Africa	186221	*	963589
15	Greece	157225	*	813553
16	Australia	96587	*	499784
17	Indonesia	94877	*	490937
18	Venezuela (Bolivarian Republic of)	91802	*	475023
19	Syrian Arab Republic	84832	*	438960
20	Viet Nam	77593	*	401500

سطح زیر کشت، میزان تولید و عملکرد مرکبات کشور به تفکیک استان در سال ۱۳۸۷  
جدول شماره ۲-۳ (( واحد: هکتار ))

نام استان	سطح کشت باغات (با احتساب درختان مخلوط و پراکنده)					
	بارور			غیربارور		
	جمع	دیم	آبی	جمع	دیم	آبی
ایلام	۳۹۱,۸	۶۶,۹	۰	۳۲۴,۹	۰	۳۲۴,۹
بوشهر	۳۲۰۴,۱	۲۳۷۲,۸	۰	۸۳۱,۳	۰	۸۳۱,۳
خوزستان	۵۸۰۱,۲	۴۱۱۷	۰	۱۶۸۴,۲	۰	۱۶۸۴,۲
سیستان و بلوچستان	۳۰۶۳,۴	۲۰۳۵,۶	۰	۱۰۲۷,۸	۰	۱۰۲۷,۸
فارس	۶۶۸۵۱,۹	۵۷۱۸۰,۶	۰	۹۶۷۱,۳	۰	۹۶۷۱,۳
کرمان	۱۴۵۸۱,۳	۱۳۱۹۹,۳	۰	۱۳۸۲	۰	۱۳۸۲
کرمانشاه	۳۱۸,۷	۳۱۵,۷	۰	۳	۰	۳
کهگیلویه و بویراحمد	۳۸۶۷,۸	۲۲۴۰,۲	۰	۱۶۲۷,۶	۰	۱۶۲۷,۶
گلستان	۵۲۱۲	۳۷۰۵,۲	۰	۱۵۰۶,۸	۸	۱۴۹۸,۸
گیلان	۱۹۳۸۷,۸	۱۴۶۴۴,۵	۱۴۶۰۲,۷	۴۱,۸	۴۷۴۳,۳	۴۷۱۶
لرستان	۴۲۳,۵	۳۵۷	۰	۳۵۷	۰	۳۵۷
مازندران	۱۰۳۲۱۱,۲	۸۳۳۰۶,۲	۲۰۷۵۴,۶	۶۳۵۵۱,۶	۱۹۹۰۵	۶۸۸۷,۶
هرمزگان	۳۳۳۷۴,۶	۲۹۸۸۰,۳	۰	۳۹۸۸۰,۳	۳۴۹۴,۳	۰
یزد	۱۰۹,۹	۷۲,۸	۰	۷۲,۸	۳۷,۱	۰
منطقه جیرفت و کهنوج	۳۰۷۷۶,۳	۲۷۰۶۸,۶	۰	۲۷۰۶۸,۶	۳۷۰۷,۷	۰
کل کشور	۲۹۰۵۷۵,۸	۲۴۰۵۶۳,۹	۳۵۳۵۷,۴	۲۰۵۲۰۵,۵	۵۰۰۱۲,۹	۱۱۶۱۱,۶

### - میزان تولید:

تولید مرکبات کشور حدود ۴ میلیون تن برآورد شده و ۸۶,۳ درصد آن از اراضی آبی حاصل شده است. در بین استان‌ها، بیشترین تولید مرکبات با ۴۵,۱ درصد از کل تولید این محصول در استان مازندران بوده است. استان‌های فارس، منطقه جیرفت و کهنوج، هرمزگان، گیلان و کرمان به ترتیب با ۲۷,۵، ۹,۷، ۹,۴، ۲,۵ و ۲,۱ درصد سهم در تولید مرکبات کشور در رتبه‌های بعدی قرار دارند. شش استان مزبور در مجموع ۹۶,۴ درصد مرکبات کشور را تولید کرده‌اند.

### - عملکرد در هکتار:

راندمان تولید مرکبات آبی در کشور ۱۶۹۳۱,۶ کیلوگرم در هکتار است. بیشترین و کمترین عملکرد آبی به ترتیب با ۲۱۸۳۲,۲ و ۴۸۳,۷ کیلوگرم به استان‌های مازندران و لرستان تعلق دارد. متوسط تولید در هکتار مرکبات دیم کشور ۱۵۵۶۱,۳ کیلوگرم می‌باشد. استان مازندران با تولید ۲۱۶۶۲,۲ کیلوگرم در هکتار بالاترین و استان گیلان با تولید ۶۸۹۰,۲ کیلوگرم در هکتار کمترین عملکرد دیم را داشته‌اند.



موسسه تحقیقات مرکبات کشور



IRAN CITRUS RESEARCH INSTITUTE

سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	تریستزای مرکبات
۲	اگزوکورتیس
۳	کیسه صمغی
۵	چاروی جادوگر
۵	میوه سبز
۶	استایورن
۸	شانکر باکتریایی
۹	لکه قهوه ای آلترناریایی
۱۰	نماتد مرکبات
۱۳	منابع

# بیماریهای مهم مرکبات



گردآوری و تالیف:  
یعقوب محمدعلیان  
حسین طاهری  
فرید بیگی  
رضا مقصدی

تهیه شده در واحد رسانه های ترویجی  
زمستان ۱۳۸۴



## بیماری ترپستزای مرکبات

ترپستزا به عنوان یکی از مخربترین بیماریهای ویروسی مرکبات، در بسیاری از کشورهای مرکبات خیز جهان باعث خسارت فراوان به این محصول گردیده است.

اولین اپیدمی بزرگ ترپستزا در آرژانتین و برزیل اتفاق افتاد. این بیماری همراه با نهال های پیوندی نارنگی انشوی زودرس از ژاپن وارد ایران (باغ مهدشت ساری) گردید و پس از گذشت ۳۰ سال انتشار آن به وسیله شته سبز جالیز در شرق مازندران گزارش شده است.



زوال درختان مرکبات توسط ویروس ترپستزا



خسارت ترپستزای مرکبات

### علائم:

رایجترین علائم بیماری شامل توقف رشد، ضعف، زردی، گلدهی بی موقع، زوال تدریجی یا سریع درختان آلوده روی پایه نارنج و سایر پایه های حساس است. این حالت در اثر تخریب آوندها و اختلال در رسیدن مواد غذایی به ریشه ایجاد میگردد.

با آغاز آلودگی ریشه های کوچکتر به تدریج پوسیده و قدرت جذب آب و مواد غذایی در درخت کاهش مییابد و در اثر انسداد آوندهای آبکش تجمع شیره پرورده در بخش بالایی گیاه افزایش یافته و باعث تولید بیش از حد گل و میوه میگردد. گاهی نشانه های دیگر نظیر نوارهای زرد یا قهوه ای در محل پیوند و یا فرورفتگی ریز زیر پوست نارنج تحت عنوان علائم لانه زنبوری (Honey combing) یا ساقه آبله ای معکوس (Inverse stem pitting) را میتوان با برداشتن نواری از پوست در محل پیوند درختان آلوده مشاهده نمود.



علائم لانه زنبوری معکوس در محل پیوند



علائم ساقه آبله ای روی لیمو ترش



علائم بیماری روی لیمو ترش گیاه بزرگ

برخی از نژادهای عامل بیماری ایجاد علائم ساقه آبله ای میشوند که در آن فرورفتگیها یا شیارهای ریز یا طولی در روی چوب سرشاخه ها، شاخه و تنه درختان آلوده به وجود میآید که با برداشتن پوست این قسمتها قابل رویت است.

### چگونگی اپیدمی ویروس:

در شرایطی ویروس به حالت اپیدمی در میآید که:

- 1- نژاد ویروس حالت نهاجمی داشته باشد.
- 2- ناقل در منطقه موجود و دارای انتقال مؤثر باشد.
- 3- ترکیب پایه و پیوندک (پایه نارنج و لیمو ترش حساس است).

### کنترل:

- 1- رعایت مسائل قرنطینه ای
- 2- تهیه پیوندک از درختان سالم و غاری از ویروس و نظارت بر مراکز تولید نهال.
- 3- ریشه کنی درختان آلوده در شروع آلودگی.
- 4- استفاده از ترکیب پایه و پیوندک مناسب و متحمل به بیماری.

## علامه بیماری

در درختهای بیمار توقف رشد و شیارهای طولی و با پوسته پوسته شدن نواری پوست تنه (Bark scalling) در قسمت پایه دیده میشود. این علامت ۳ تا ۸ سال پس از پیوند ارقام آلوده مرکبات روی پایه های حساس به ویژه پونسایروس (*Poncirus trifoliata*) و تعدادی از درخت های آن مانند سیترنج ها ایجاد میگردد.

برخی دیگر از ارقام نظیر لیمو شیرین، لیمون و پالتنگ نیز به این بیماری حساسند ولی شدت علامت تنه در آنها خفیف تر است. اگر ارقام آلوده به بیماری روی پایه های متحمل پیوند شوند، ممکن است حالت پا کوتاهی و کاهش رشد درخت مشاهده گردد. در هر صورت عامل بیماری در چنین ارقامی (حتی بدون وجود علامت) قادر به تکثیر بوده و میتواند به عنوان منابع آلودگی عمل نماید. شناسایی بیماری با ایندکس بر روی گیاهان محک امکانپذیر میباشد.



علامت پوسته پوسته شدن روی پایه پونسایروس در درخت سیلابه گروکورتیس

## کنترل

استفاده از پیوندک سالم، عدم استفاده از میزبانهای حساس و ضدعفونی ادوات باغبانی یا هیپوکلریت سدیم.

## بیماری گزوکورتیس مرکبات

گزوکورتیس یکی از بیماریهای مهم ویروئیدی مرکبات در شمال ایران است. ارقام مرکبات پیوند شده روی پایه پونسایروس یا هیبریدهای آن مانند سیترنج حساس به بیماری میباشند. عامل بیماری، ویروئید گزوکورتیس مرکبات است. این ویروئید از طریق پیوندک آلوده و به صورت مکانیکی با ابزار باغبانی قابل انتقال میباشد.



### عامل بیماری:

عامل بیماری احتمالا ویروس است و از طریق پیوندک آلوده به راحتی قابل انتقال است. بعضی گزارشها درباره انتقال بیماری با بذر و دانه گرده نیز وجود دارد.

### علامه بیماری:

در درختان آلوده ارقام حساس (پرتقال تامسون ناول، نارنگی و تانجلو) وجود حفرات طولی با ابعاد مختلف روی تنه و شاخه ها همراه با ترشح صمغ و ضعف عمومی درخت به همراه خشکیدگی مشاهده میگردد و در وضعیت شدید زوال و مرگ درختان را موجب میگردد. در حالتیکه تعداد حفرات زیاد باشد باعث تغییر شکل تنه و شاخه ها میشود. در بعضی شرایط ترشح صمغ از سطح پوست در لبه یا وسط فرورفتگی یا شکافهای اطراف دیده میشود. روی برگهای جوان علامه نقش برگ بلوطی در شرایط خنک سال (بهار و پاییز) ظاهر میگردد که با گرم شدن هوا و کامل شدن برگها این علامه محو میشود.



فرورفتگیهای روی تنه در درختان آلوده

### کنترل بیماری:

- 1- شناسایی و حذف درختان و نهال های آلوده مرکبات خصوصا رقم تامسون ناول با عارضه سرخشکیدگی و زوال با علامه مشخص آلودگی به بیماری کیسه صمغی
- 2- تهیه بذر و پیوندک از درختان مادری سالم جهت کنترل بیماری توصیه میشود.

### بیماری کیسه صمغی

بیماری کیسه صمغی اولین بار در دهه ۱۹۳۰ بوسیله باغداری در کالیفرنیا مشاهده و توسط Fawcett, 1936 گزارش گردید. با واردات ارقام مرکبات از سال ۱۳۰۹ از کشورهای مختلف این بیماری وارد ایران شد.



## جاروی جادوگر مرکبات

### عامل بیماری: *Candidatus phytoplasma aurantifolia*

این بیماری اولین بار در اواخر دهه ۱۹۷۰ میلادی در کشور عمان مشاهده شد. این بیماری در حال حاضر در استانهای هرمزگان و سیستان و بلوچستان به شدت درختان لیمو ترش (لایم) را مورد حمله قرار داده است.

### علائم بیماری:

در لایم آلوده فاصله میان گره ها کم شده و تعداد زیادی سرشاخه های ضعیف، متراکم و غیرطبیعی با برگهای ریز و رنگ پریده تولید میشود که حالت جارویی به سرشاخه آلوده میدهد. در شاخه های جارویی گل و میوه تشکیل نمیشود. با پیشرفت بیماری شاخه ها خشک شده و در نهایت منجر به مرگ درخت میشود. این بیماری توسط پیوندک آلوده و زنجیرک منتقل میشود.

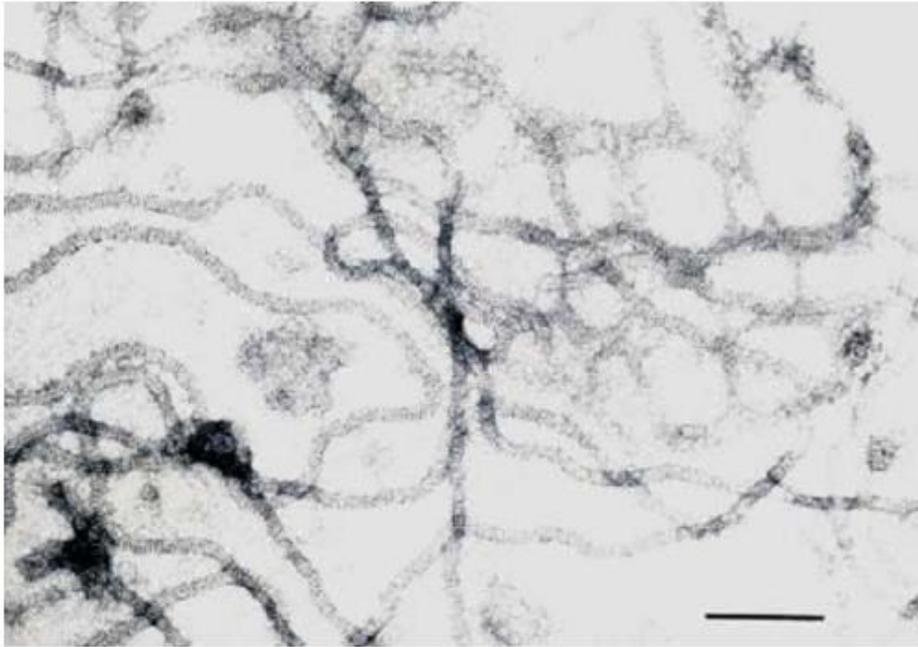


علائم سرخشیدگی

### کنترل:

بهترین روش مبارزه با آن جلوگیری از ورود بیماری به مناطق سالم و ریشه کنی درختان آلوده میباشد. استفاده از ارقام مقاوم و مبارزه با حشرات ناقل نیز توصیه میشود



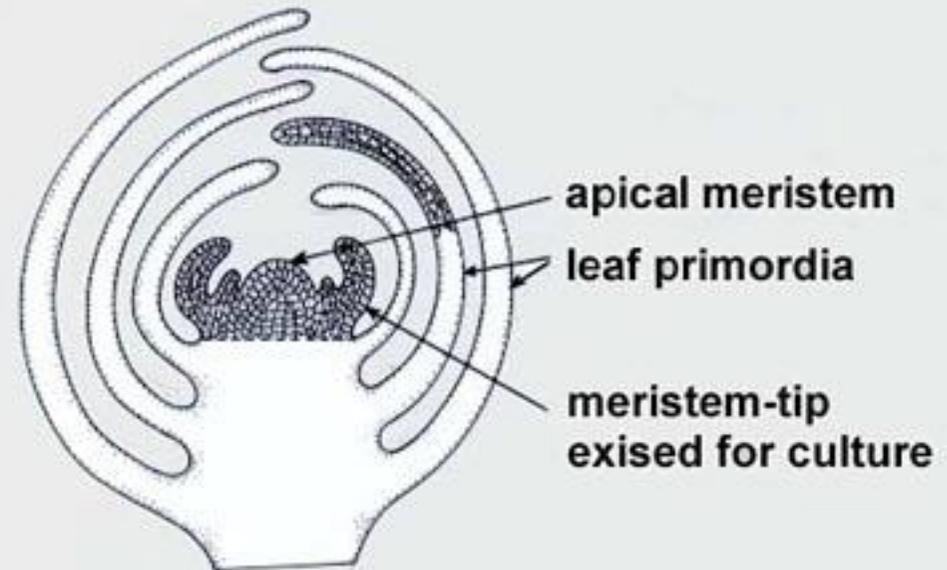
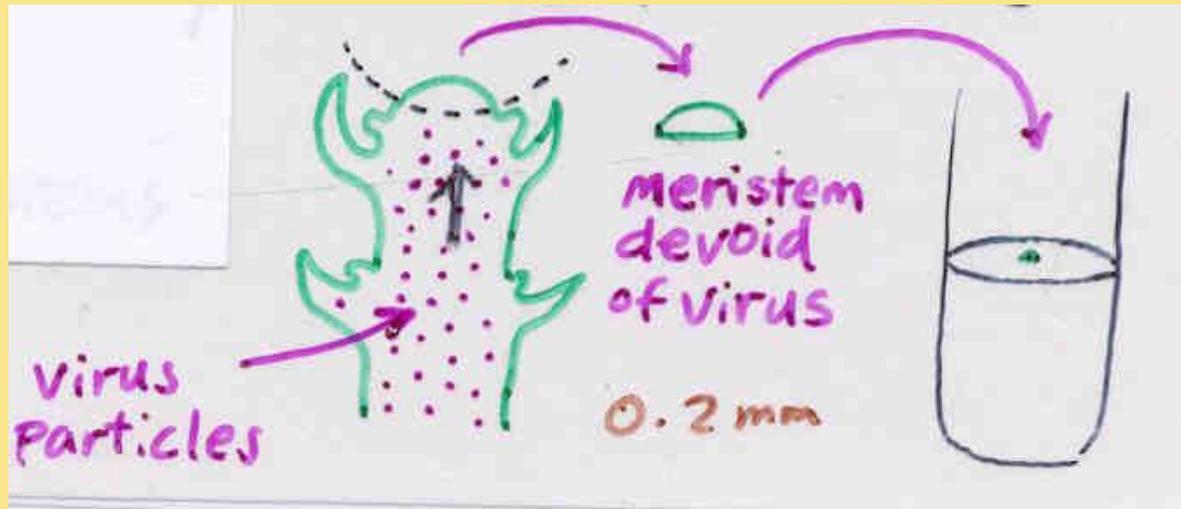


*Electron microscopic picture showing Citrus tristeza closterovirus particles. Bar represents 100 nm.*



*Yellowing symptom on younger leaves of Eureka lemon seedlings caused by seedling yellows strain of CTV on left; healthy seedling on right.*





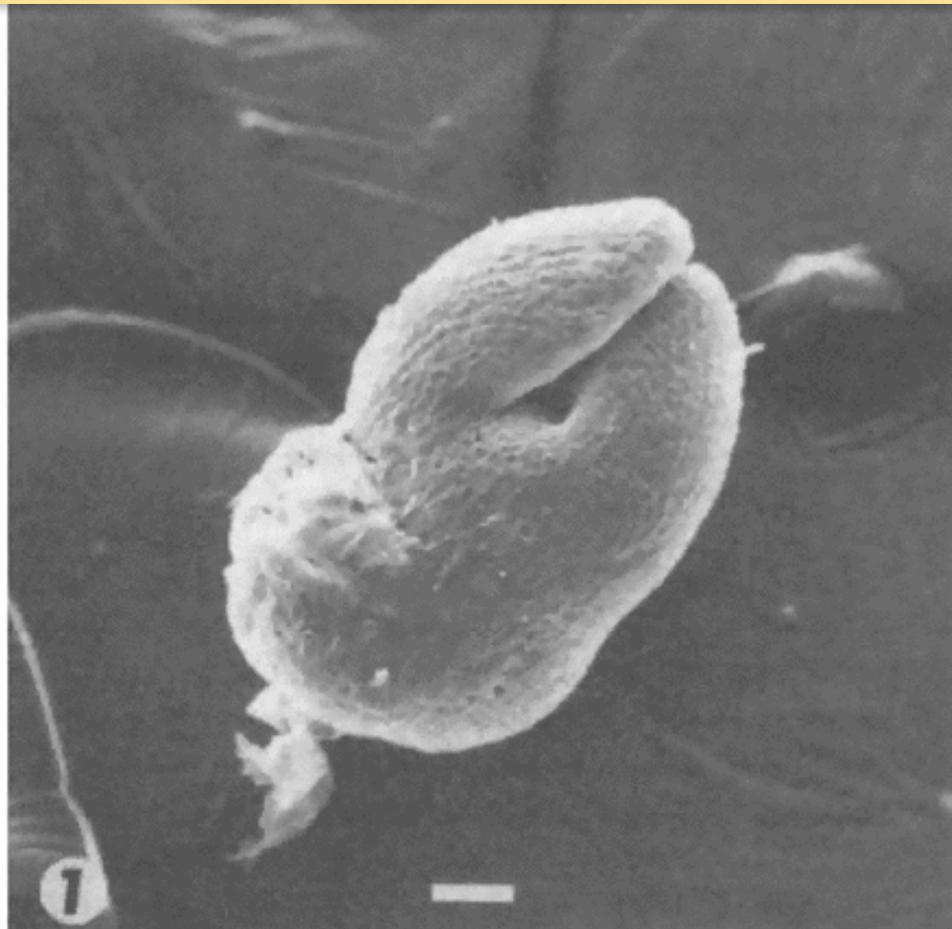


Fig. 1. A freshly excised meristem tip from an axillary bud of the potato *Solanum tuberosum*. The two smallest emergent leaf primordia are present. Scale bar represents 50  $\mu\text{M}$ .



Somatic embryogenesis from nucellar embryos in kinnow mandarin: (a) Embryogenic callus from nucellar embryos on MS medium supplemented with malt extract ( $400 \text{ mg L}^{-1}$ ) and 2,4-D ( $9.02 \text{ } \mu\text{M}$ ). (b) Somatic embryo formation on MS medium containing malt extract ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) and ABA ( $7.56 \text{ } \mu\text{M}$ ). (c) Plantlet development from somatic embryos on  $\frac{1}{2}$  MS medium with NAA ( $10.74 \text{ } \mu\text{M}$ ). (d) A single plantlet on  $\frac{1}{2}$  MS medium with NAA ( $10.74 \text{ } \mu\text{M}$ ). (e) Nucellar embryo culture raised acclimatized plantlet

## ESTABLISHMENT OF VIRUS-FREE CITRUS NURSERY SYSTEM

Shoot-tip micrografting (STG)

Preparation of rootstock seedling

Preparation of citrus shoot

Micrografting of shoot-tip

Double grafting



## *Preparation of rootstock seedling*

Troyer of Carrizo citrange is the commonly used rootstock for STG. However, other citrus cultivars such as pummelo, lemon and sweet orange are also used.

*(A) Culture of rootstock in solid medium.*



### **<sup>15</sup>Preparation of Citrus STG Medium (pH 5.7)**

1. Solid medium for growing rootstock seedling: MS salt mixture (Gibco BRL), 2.5 g; sucrose, 20 g; ddH<sub>2</sub>O, 1 L; Agar, 1% (10 g)
2. Liquid medium for growing STG seedling: MS salt mixture, 2.5 g; sucrose, 30 g; growth factors (1 L/100X stock; i-inositol, 100 mg; thiamine-HCl, 0.2 mg; pyridoxine-HCl, 1 mg; nicotine acid, 1 mg); ddH<sub>2</sub>O, 1 L



## *Preparation of citrus shoot*

Young shoots are collected from infected citrus trees in orchards. Alternatively potted citrus plants in green house are forced to sprout by defoliating and/or pruning. Young shoots of adequate size (0.5 cm~3 cm) are as scion collected for STG.

*shoots of different sizes for STG.*



## *Micrografting of shoot-tip*



*(C) Cutting knife consists of cutting edge of razor blade and edge holder; pliers for making blade edge.*

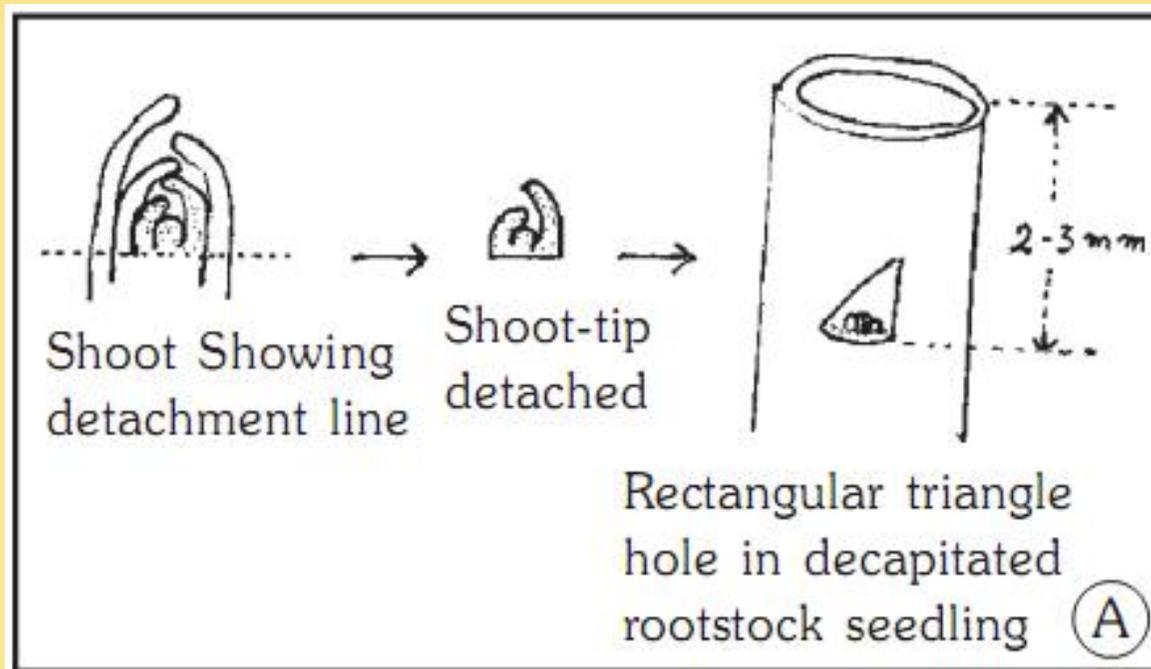


*(D) Making STG incision on upper top of rootstock seedling with tip-bended forceps and cutting knife.*



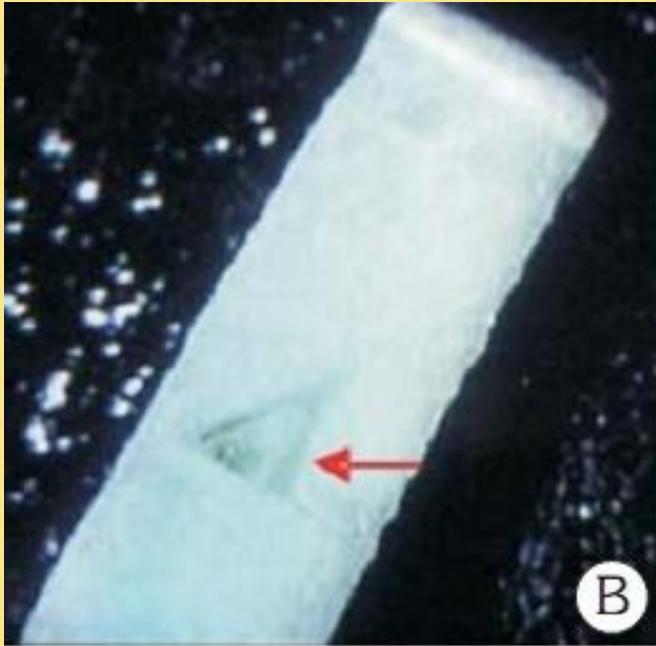
*(E) Cold beam illuminator, binocular microscope and accessories within a laminar-flow bench. (F) Making STG incision on upper top of rootstock seedling with tip-bended forceps and cutting knife.*





(A) Diagram showing excision of shoot-tip with 2-leaf primordia and rectangular triangle hole (0.3~0.5 mm) on a decapitated rootstock seedling by removing cortex layer with cutting edge of STG knife.





*(B) A shoot tip placed in the hole on a decapitated rootstock seedling.*





(C) Two-week old rootstock seedlings in solid medium (left), a sterile test tube with a center-perforated filter-paper platform containing liquid medium (center), and a test tube containing the micrografted rootstock seedling supported by filter paper platform on liquid medium (right). (D) Different stages of STG rootstock seedlings, also showing a new sprout regenerated from the grafted shoot-tip (right).



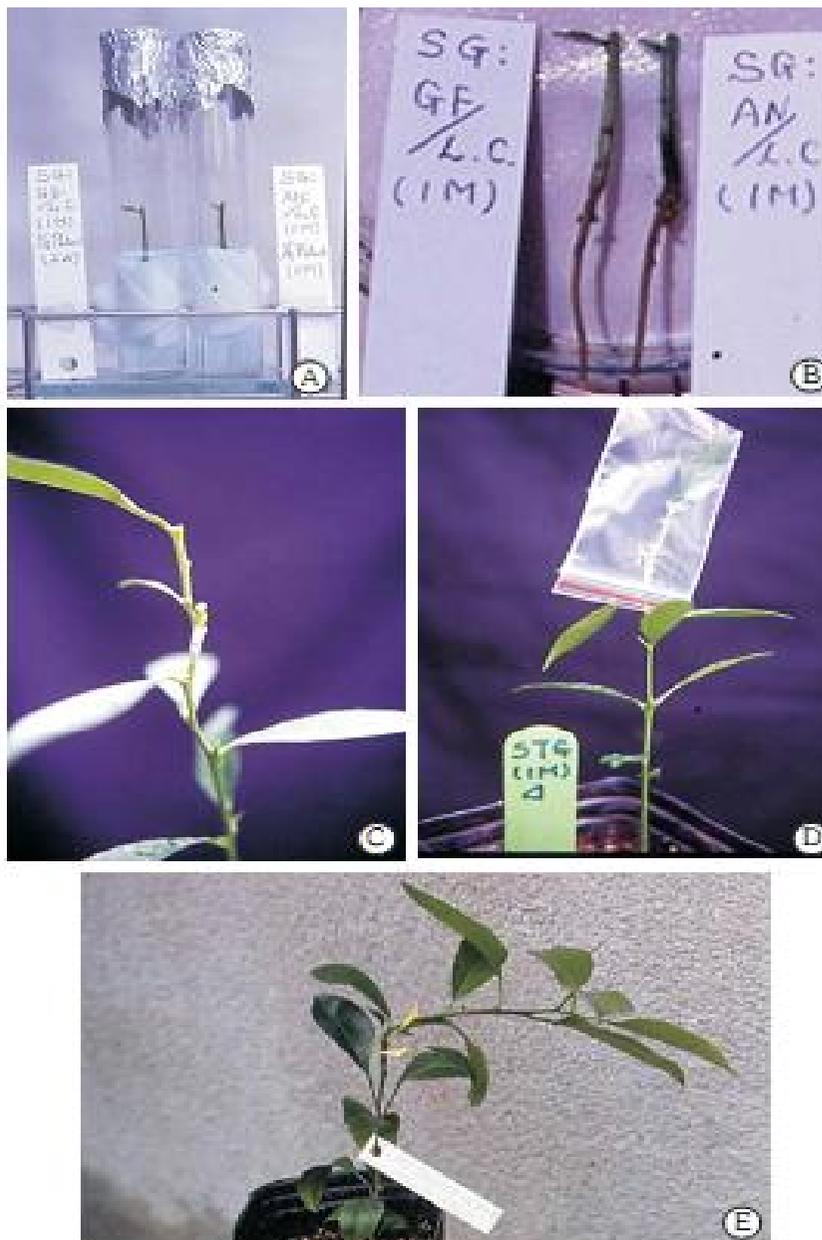
*(E) Two new shoots of Hong China sweet orange regenerated from ST in rectangular hole (left) and in V-shaped incision (right) of rootstock seedlings one month after micrografting. (F) A new sprout from ST in rectangular hole on rootstock.*



## *Double grafting*

A double grafting technique has been developed to enhance the growth of STG-plants.





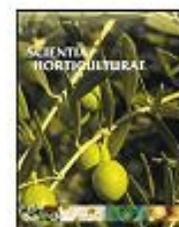
Procedure of double grafting with micrografted rootstock seedlings as scion. (A) Sprouting of micrografted seedlings in test-tube culture. (B) Two STG seedlings with sprouts taken out from test tubes for secondary grafting. (C) A potted vigorous rootstock seedling side-grafted with a scion from the STG-seedling. (D) The grafted part of rootstock seedling covered with a mouth-sealed plastic bag. (E) A new mature twig grown from the double grafted rootstock three months after double grafting.



Contents lists available at ScienceDirect

Scientia Horticulturae

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/scihorti](http://www.elsevier.com/locate/scihorti)



## Micrografting of almond (*Prunus dulcis* Mill.) cultivars “Ferragnes” and “Ferraduel”

H. Yıldırım<sup>a,\*</sup>, A. Onay<sup>b</sup>, V. Süzerer<sup>b</sup>, E. Tilkat<sup>c</sup>, Y. Ozden-Tokatli<sup>d</sup>, H. Akdemir<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Dicle University, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, 21280 Diyarbakır, Turkey

<sup>b</sup> Dicle University, Faculty of Science and Arts, Department of Biology, Diyarbakır, Turkey

<sup>c</sup> Batman University, Faculty of Science and Arts, Department of Biology, Batman, Turkey

<sup>d</sup> Gebze Institute of Technology, Faculty of Science, Department of Biology, Kocaeli, Turkey

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 December 2009

Received in revised form 21 March 2010

Accepted 13 April 2010

#### Keywords:

Almond  
Micrografting  
Restoring  
Rejuvenation  
Rootstocks  
Scions

### ABSTRACT

The success of various *in vitro* micrografting techniques, establishment of the rootstock, size of the microscion, and the effects of culture medium on the grafted seedling development for almond cultivars “Ferragnes” and “Ferraduel” were studied. *In vitro* germinated wild almond seedlings developed from seeds were used as rootstocks. Shoot culture initiation was successfully achieved from the above almond cultivars by culturing mature shoot tips from forced nodal buds, about 3–5 mm, on 0.7 mg/L BA and 0.01 mg/L NAA containing a MS medium. The regenerated adventitious shoots from *in vitro* cultures were maintained and proliferated by sub-culturing on a fresh medium every three to 4 weeks. Regenerated shoot tips, which were micrografted onto *in vitro* seedlings, resulted in the restoration of shoot proliferation. The results indicated that the most successful method for the grafting of tested almond cultivars was slit micrografting. High levels of micrograft take were achieved with all ranges of scions (4–15 mm) obtained from the regenerated shoot tips. Slow growth and lack of axillary shoot development on the micrografts were noticeable when the micrografts were cultured on hormone-free germination medium. *In vitro* micrografted plantlets were successfully acclimatized and no problems were encountered with the establishment of micrografted plants *in vivo*. The developed technique has demonstrated a high potential for application in the micropropagation of almond cvs. “Ferragnes” and “Ferraduel” and thereby, represents a feasible method for the renewal of almond orchards in Turkey and elsewhere in the world.



ELSEVIER

Scientia Horticulturae 92 (2002) 177–182

SCIENTIA  
HORTICULTURÆ

www.elsevier.com/locate/scihorti

Short communication

## In vitro grafting of cashew (*Anacardium occidentale* L.)

Thimmappaiah\*, G.T. Puthra, Shirly Raichal Anil

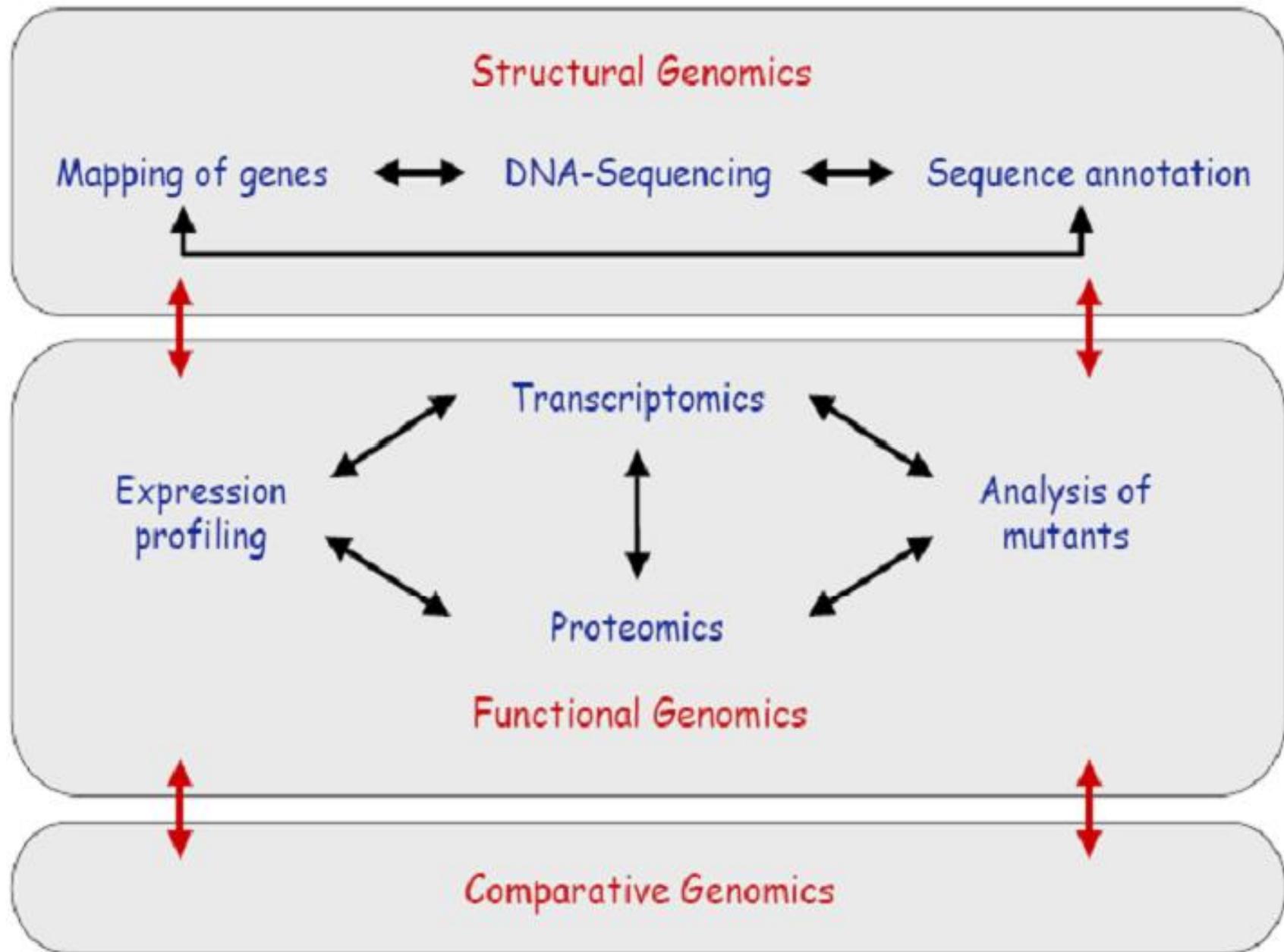
*National Research Centre for Cashew, Indian Council of Agricultural Research,  
Puttur, Karnataka 574202, India*

Accepted 11 May 2001

### Abstract

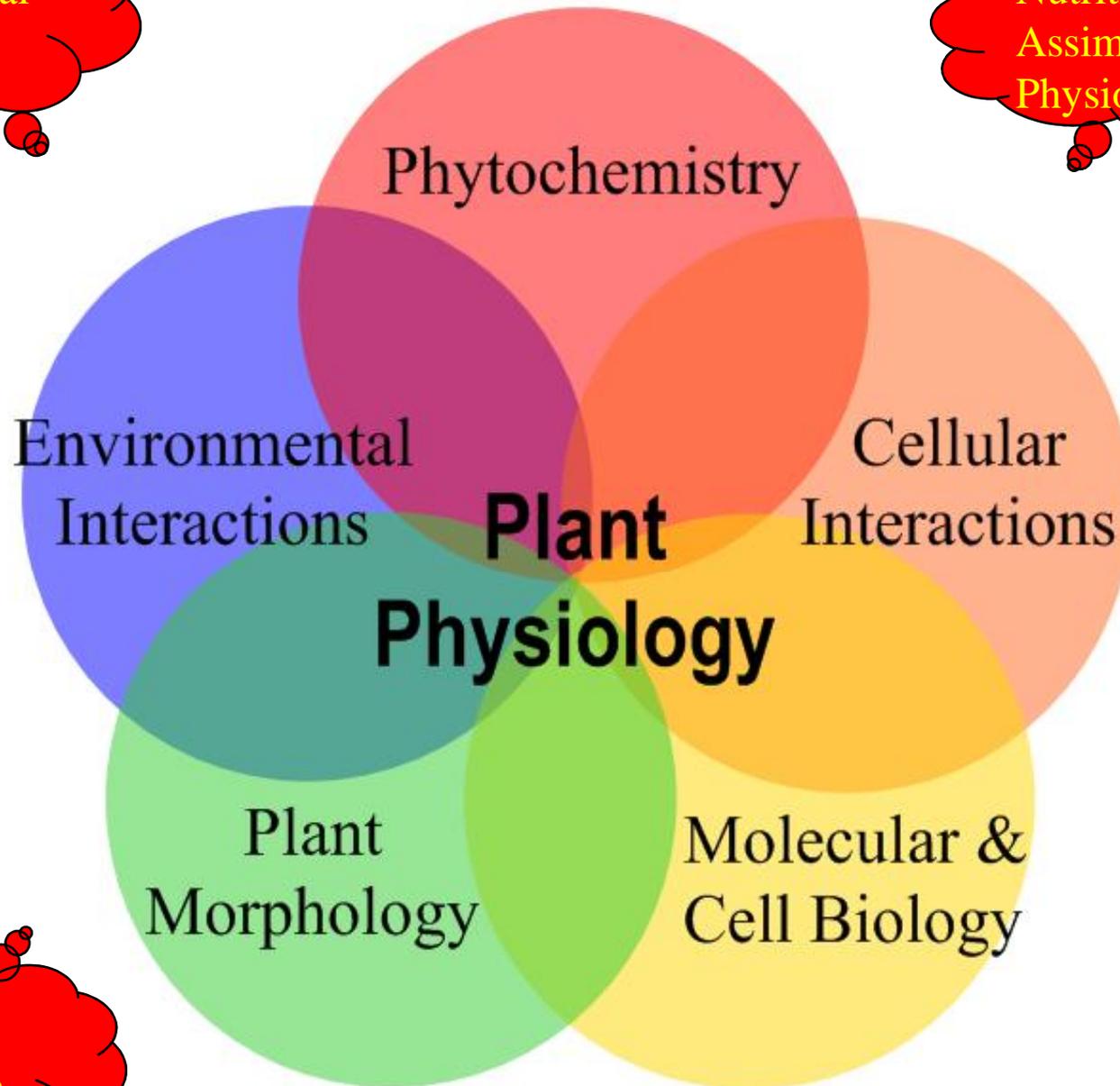
A successful micrografting technique in cashew was developed using in vitro germinated seedlings as rootstocks and axenic shoot cultures (shoot-tip and nodal cultures) established from mature tree source as microscions. In vitro germinated seedlings, which emerged 20–25 days after inoculation on absorbent cotton, were decapitated and used as rootstock. Mature tree explants initiated on hormone-free Murashige and Skoog [Physiol. Plant. 15 (1962) 473] (MS) modified medium were made into scion of 3–15 mm length for grafting. Micrografts could be easily cultured on hormone-free liquid half-MS medium and were potted out after 10–12 weeks of culture growth. Grafting success was dependent on the method of grafting and size of the scion. Shoot-tip grafting and side grafting were equally successful (79.5–100%). Length of scion shoot had significant effect on micrografting success. Graft success was high (79.5%) when the scion length was >5 mm and it was less (0.5%) when size of scion was small (3–5 mm). Scion presoaked in either water or 0.01% ascorbic acid and 0.015% citric acid (1:1) reduced phenolic browning and drying of scion. Micrografting techniques standardized could be used for rejuvenation of shoot explants of mature tree. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

# Three levels of genome research

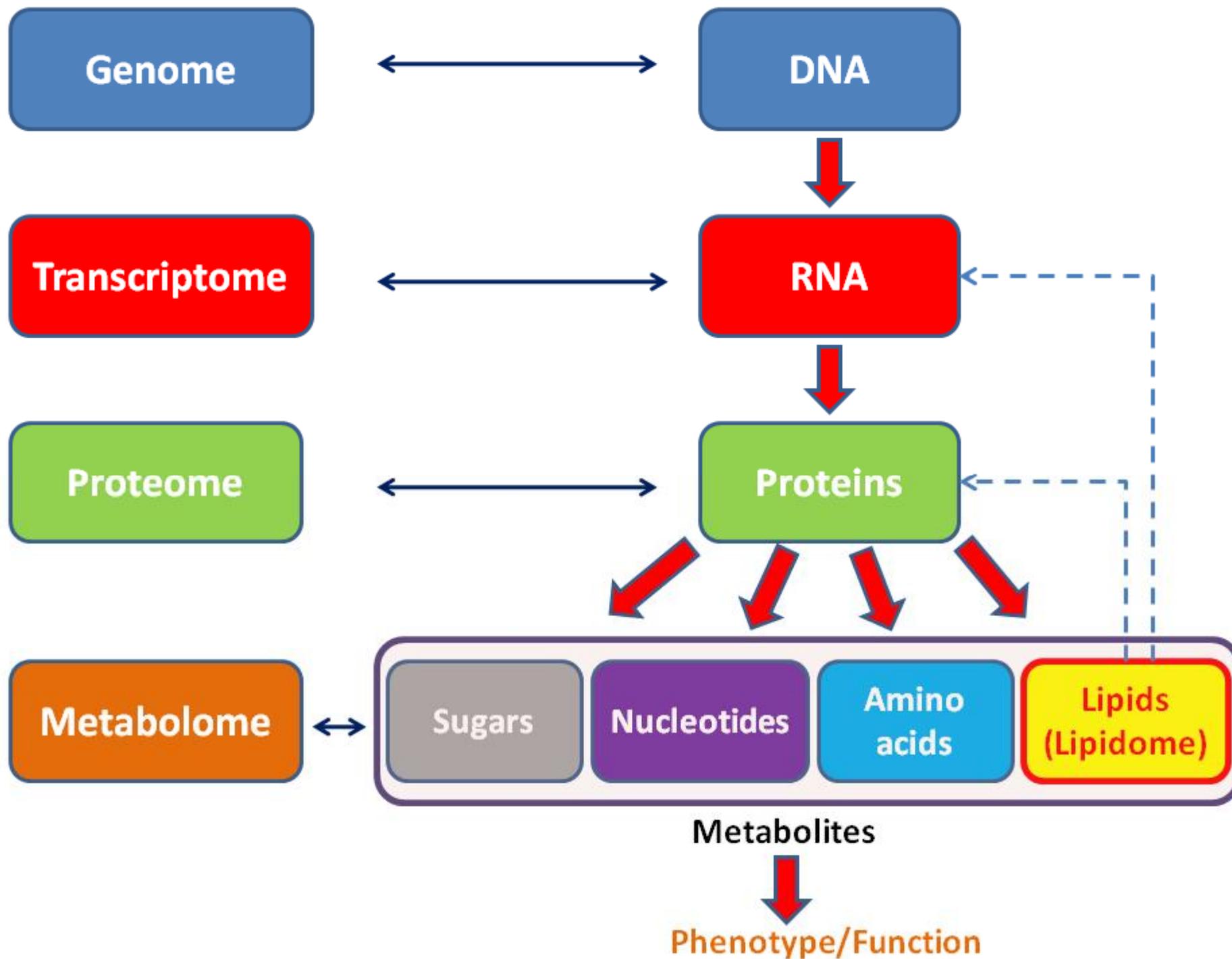


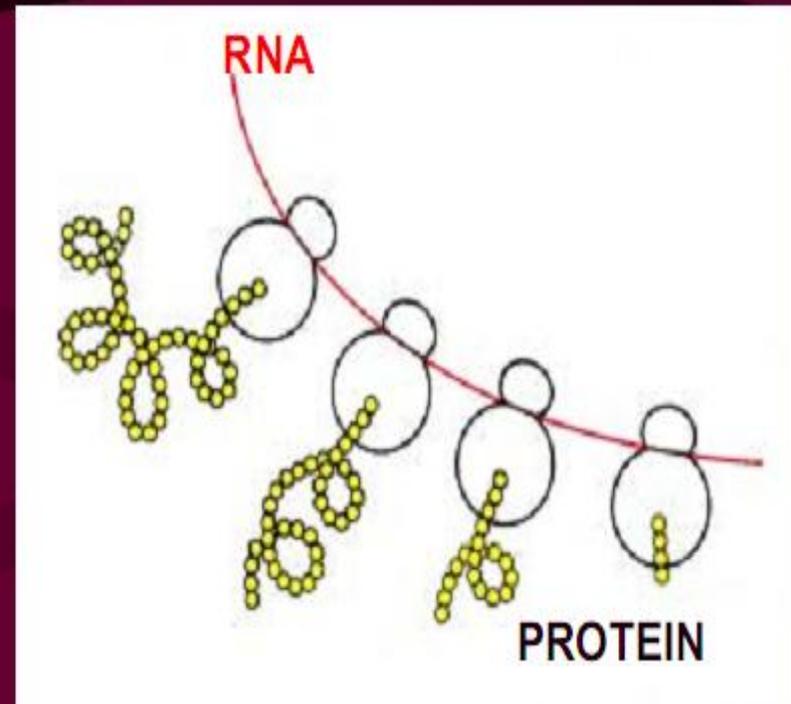
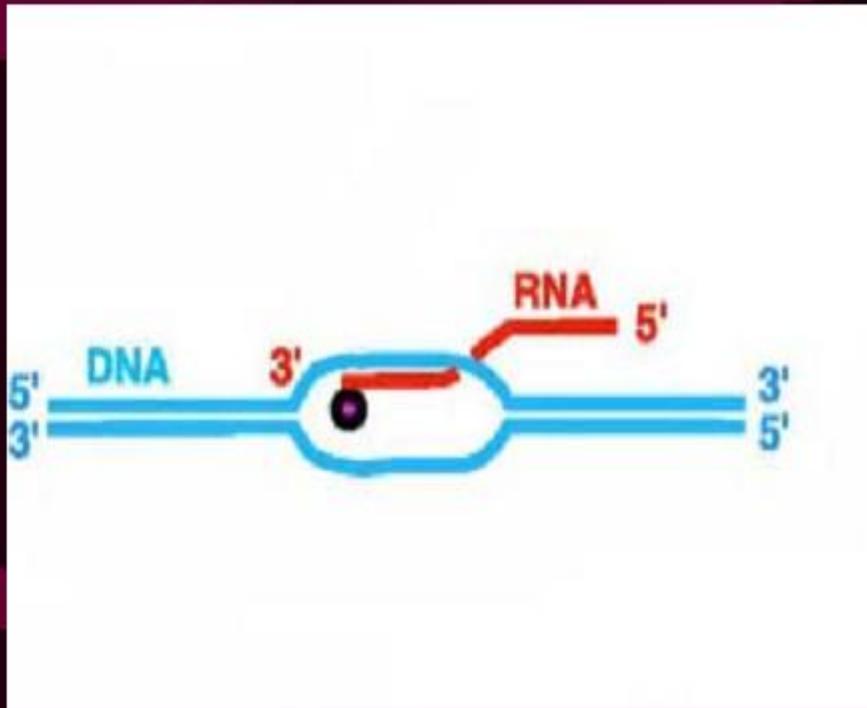
Environmental  
Physiology

Nutrition and  
Assimilation  
Physiology



Growth and  
Reproductive  
Physiology





**GENOME**



**TRANSCRIPTOME**

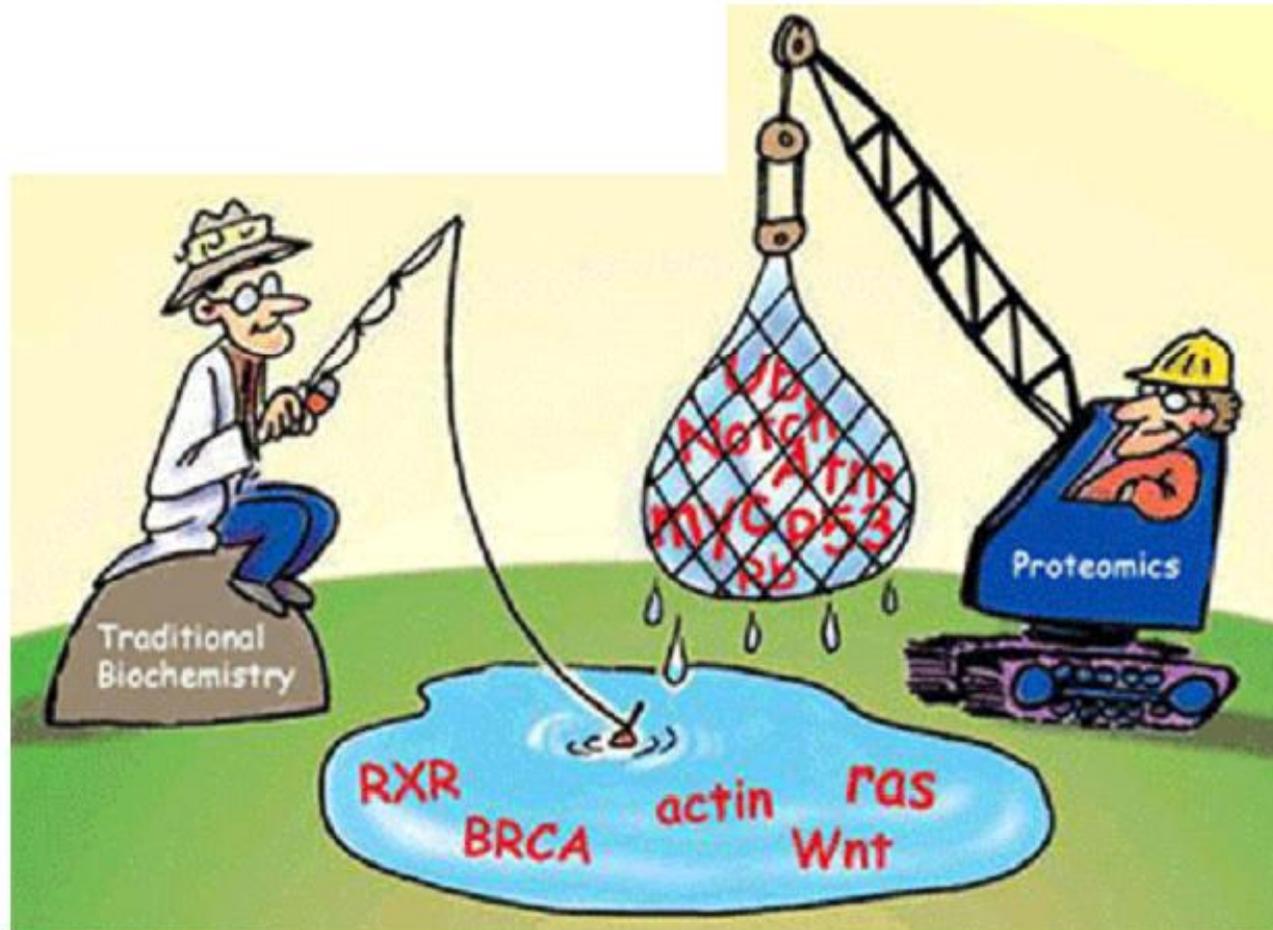
**TRANSLATION**



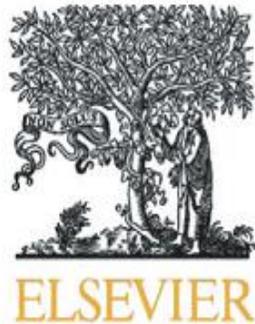
**PROTEOME**

**TRANSCRIPTION**

# Proteomics



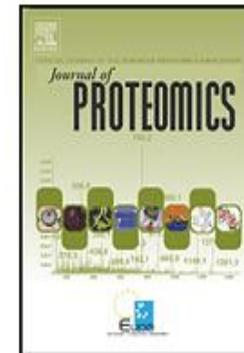
- The complete set of proteins found in each cell is known as the proteome
- Approximately 25,000 proteins in a plant cell
- Proteins concentration (and activity) may be different than gene expression due to post-translational modification



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



[www.elsevier.com/locate/jprot](http://www.elsevier.com/locate/jprot)



Review

## Plant proteome changes under abiotic stress — Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response

Klára Kosová<sup>a,\*</sup>, Pavel Vítámvás<sup>a</sup>, Ilja Tom Prášil<sup>a</sup>, Jenny Renaut<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Genetics and Plant Breeding, Crop Research Institute, Drnovská Street 507, 161 06 Prague 6 – Ruzyně, the Czech Republic

<sup>b</sup>Centre de Recherche Public, Gabriel Lippmann, Rue du Brill, 4422 Belvaux, Luxembourg

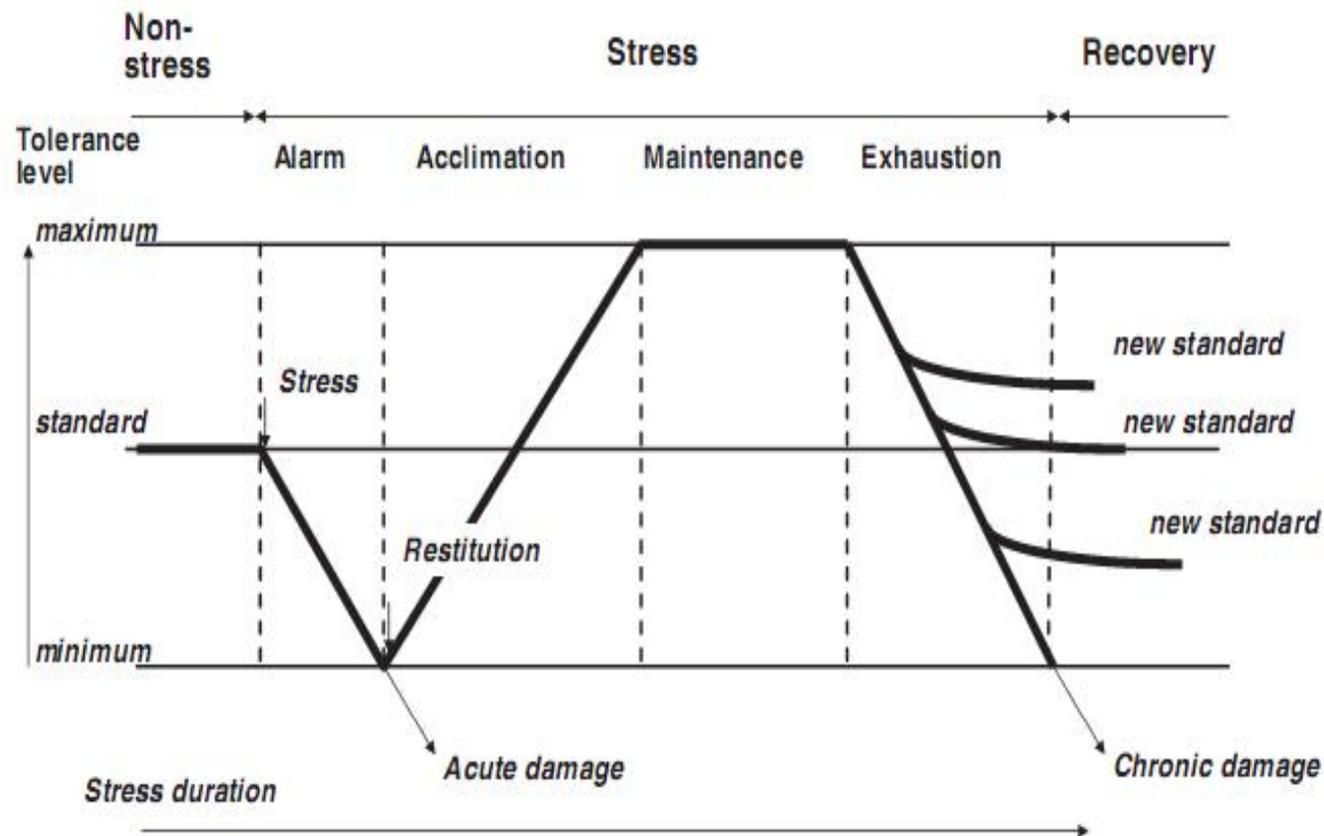
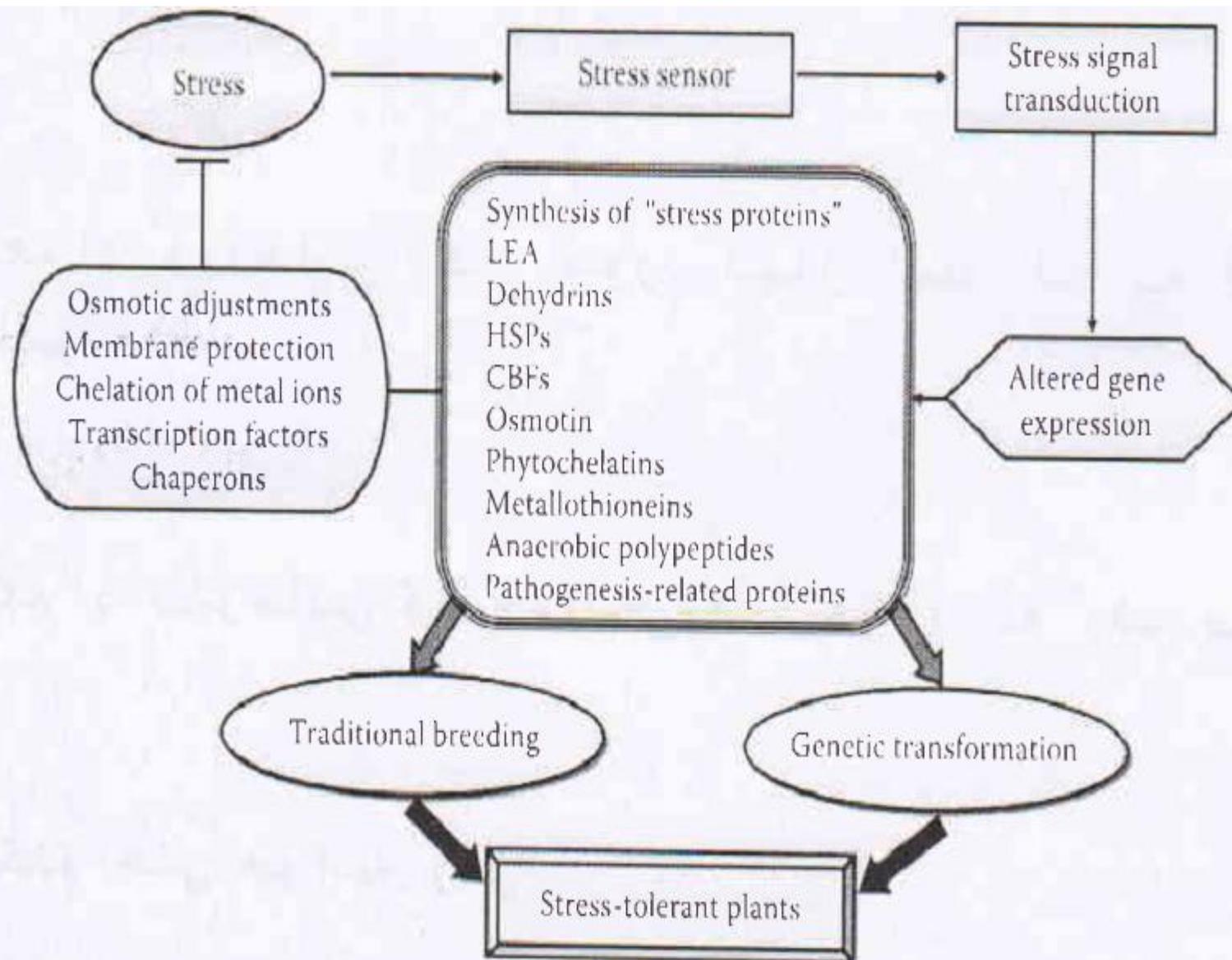
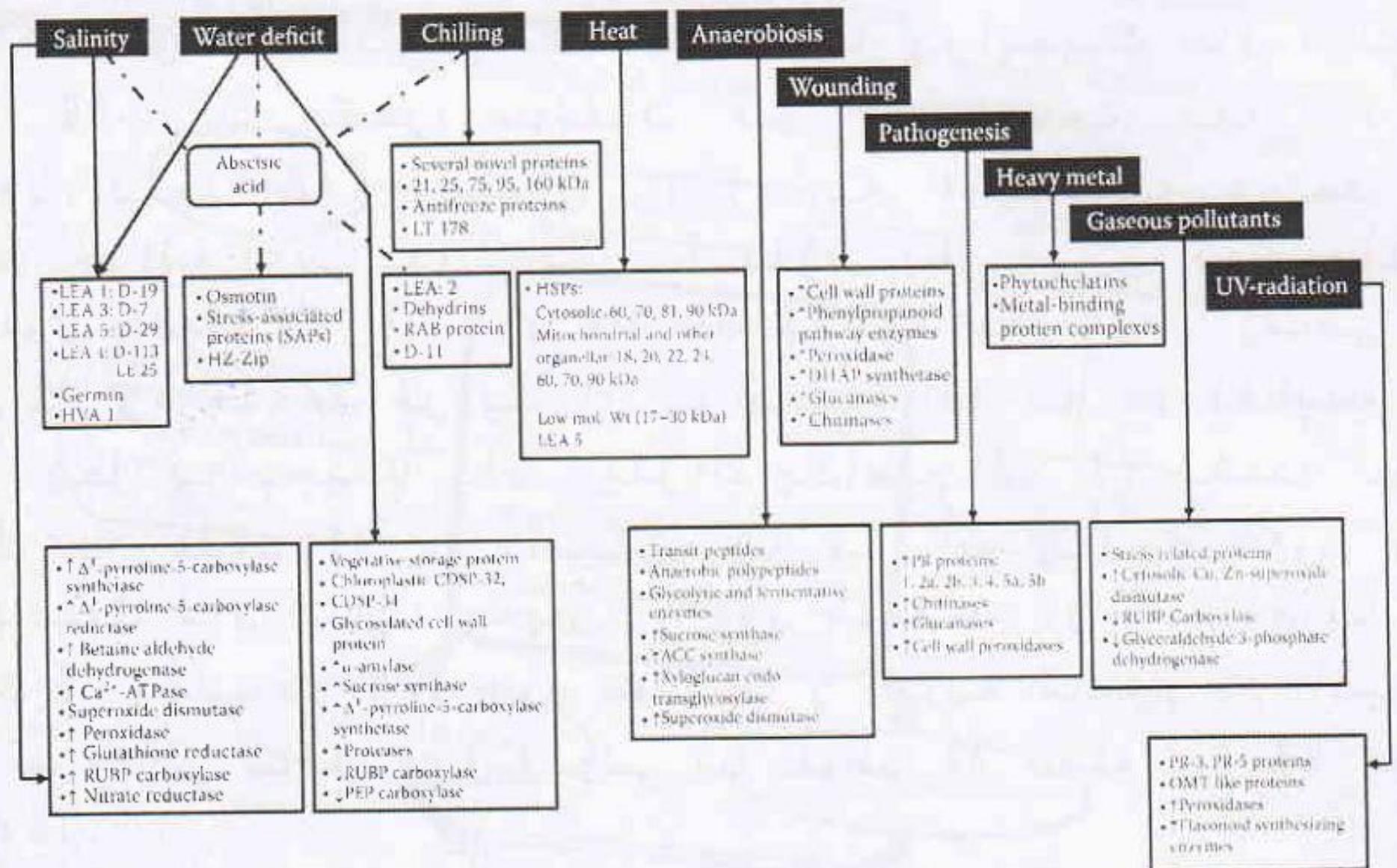


Fig. 1 – A generalised scheme of a dynamics of plant response to abiotic stress factors (modified after [2]). Each stage of plant stress response corresponds to a different proteome composition. Non-stressed plants reveal active growth and developmental progress based on cell division. These processes are associated with a *de novo* biosynthesis of several cellular components. In stressed plants, a profound reorganisation of the whole cellular metabolism is observed. There is a shift from an active growth and developmental progress to stress acclimation. Early stages of plant stress response (alarm phase) are associated with an induction of stress-responsive signalling pathways and a strong oxidative stress. Later stages (acclimation phase) are associated with a *de novo* biosynthesis of several stress-protective proteins (e.g., chaperones, COR/LEA, PCs, ROS scavenging enzymes) and other compounds (e.g., antioxidants — carotenoids, tocopherols; osmoprotectants — GB, proline). During recovery, processes leading to degradation of stress-protective compounds are activated and a new cellular homeostasis is being established.

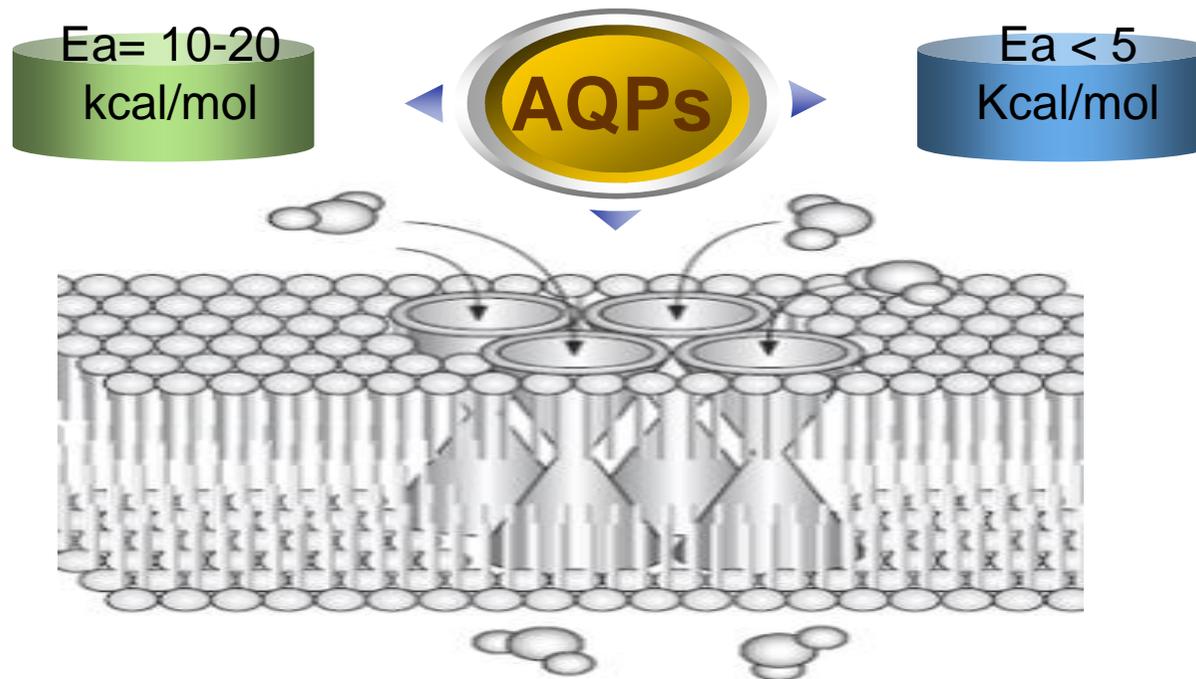


**FIGURE 19.1** Stress-induced protein synthesis in plants. Stresses cause important modifications in the gene expression in plants, which leads to the synthesis and accumulation of stress-related proteins. These proteins provide enhanced survival value to plants under adverse environmental situations and can be used to produce stress-tolerant plants by genetic transformations. For details, refer Section 19.2.



**FIGURE 19.2** An overview of stress-induced protein-synthetic responses in plants. Different stresses induce the synthesis of various groups of proteins and cause either elevation (↑) or decline (↓) in the levels of enzymes. Some of the responses of salinity, drought, and chilling are common and are mediated via elevated levels of ABA. For details, refer Section 19.1.

# Aquaporins (AQPs)



Two main topics were of special interest

- ◇ The high water transport rate ( $10^9$  molecules per second)
- ◇ The high selectivity for water

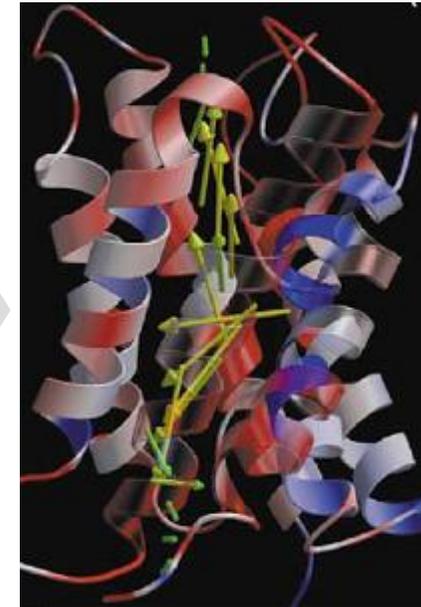
## AQPs subfamilies:

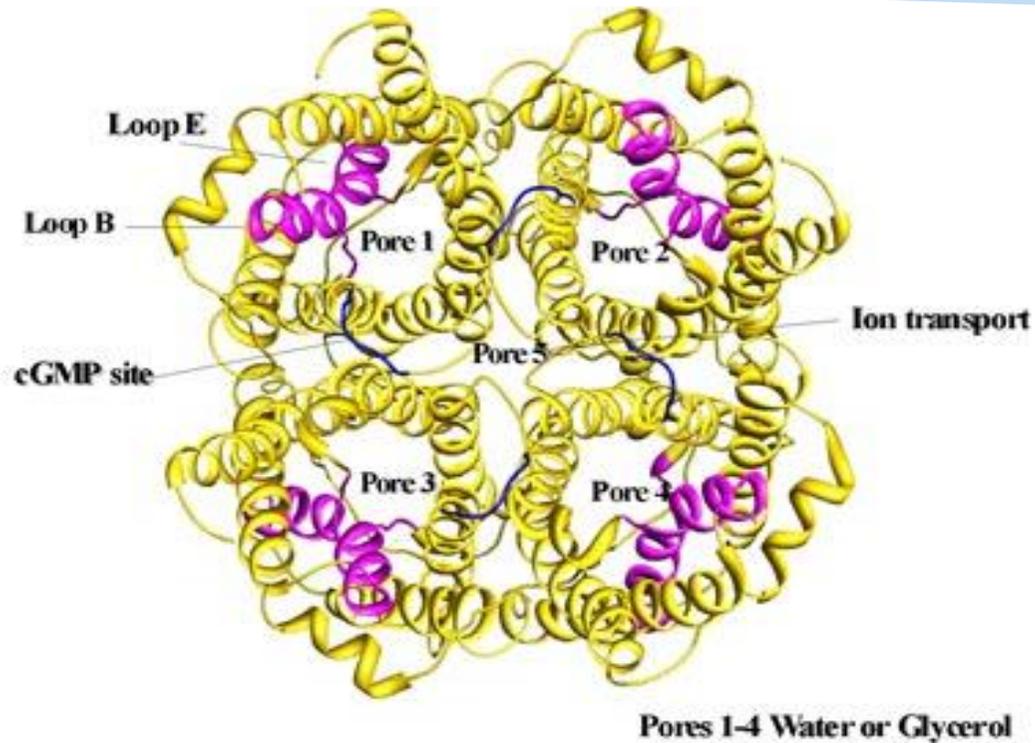
Plasma membrane intrinsic proteins  
(PIP)

Tonoplast intrinsic proteins  
(TIP)

Nodulin26-like intrinsic proteins  
(NIP)

Small basic intrinsic proteins  
(SIP)





**In the membrane, AQPs form tetrameric structures with each monomer acting as an independent water channel**

# Control of water permeability

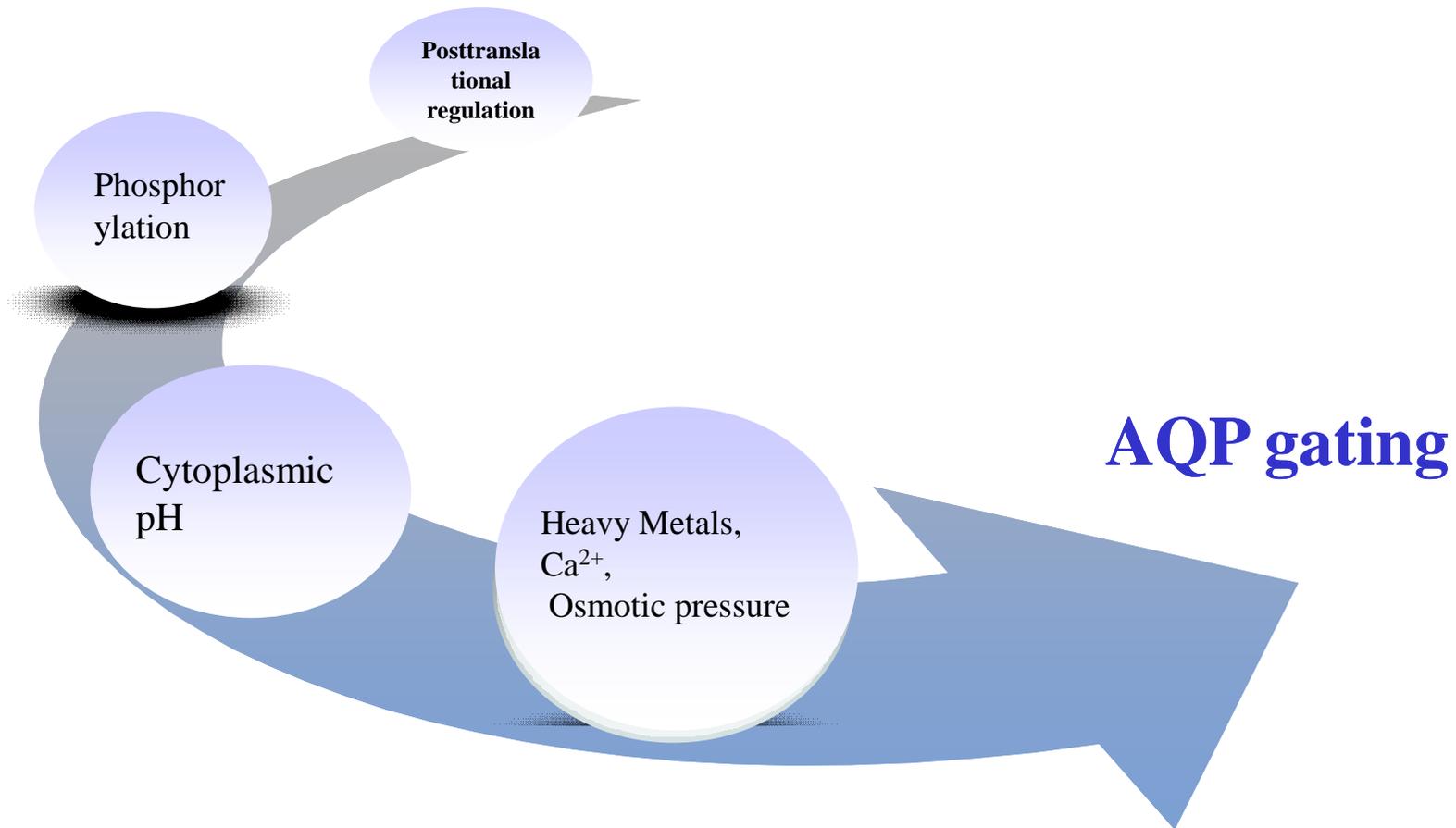
**Mechanisms of control  
flow across the  
membrane by **AQPs****

**By changing  
their abundance  
in the membrane**

**By changing the  
rate of flow  
through the  
water channel**



▼ Change in the rate of water flow



# Separating the Proteome

- The protein genome is separated by several different methods.
- The most commonly used method is 2-dimensional gel electrophoresis.
  - Consists of using isoelectric focusing with SDS polyacrylamide gel electrophoresis

# Isoelectric focusing

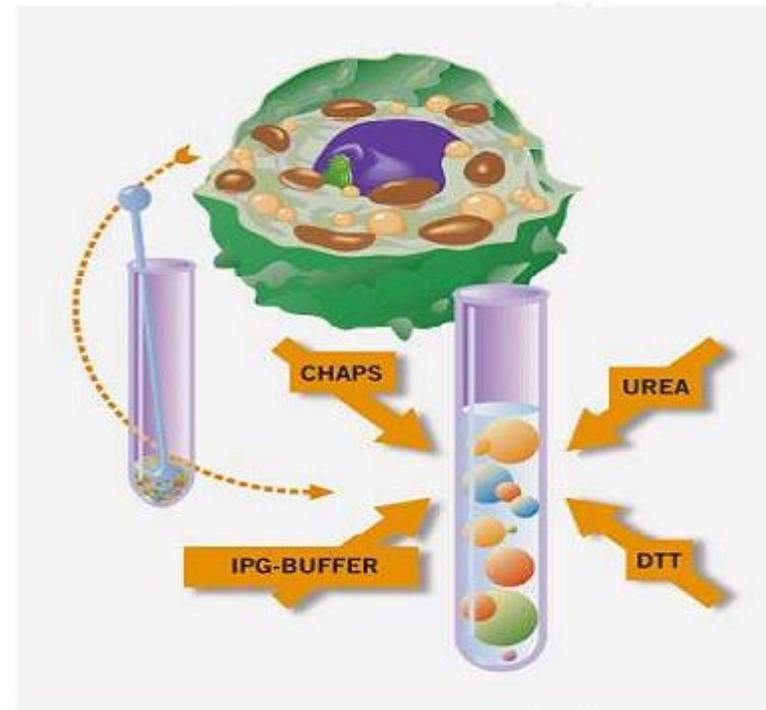
- This separates proteins based on isoelectric point
- The isoelectric point is the pH at which the protein has no net charge.
- pH gradients may be large 2-10 or small 6-7
- Typically this is done with an immobilized pH gradient gel strip or with a tube gel containing a low concentration of polyacrylamide.
- Ampholytes are added to create a pH gradient in an electric field and the proteins are loaded.
- The IEF gel is placed in an electrophoresis system for up to 24 hours and the proteins form tight bands at their isoelectric point.

Sample preparation

↓  
Protein extraction

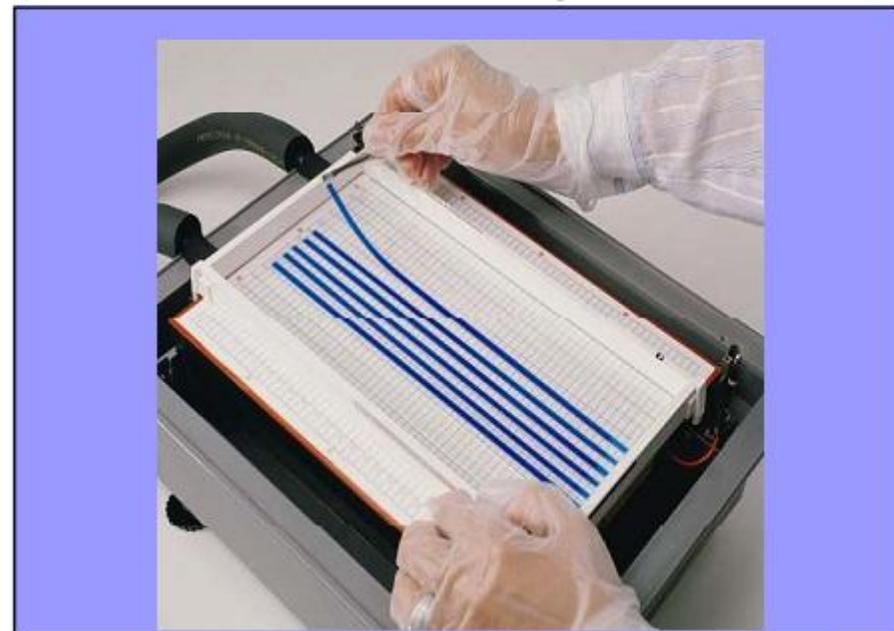
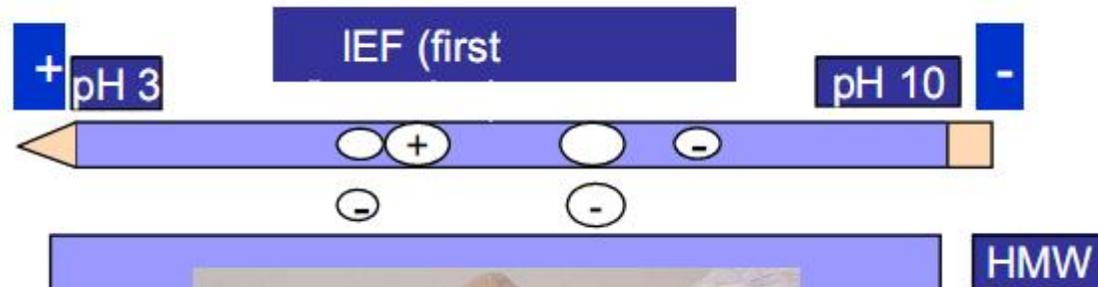
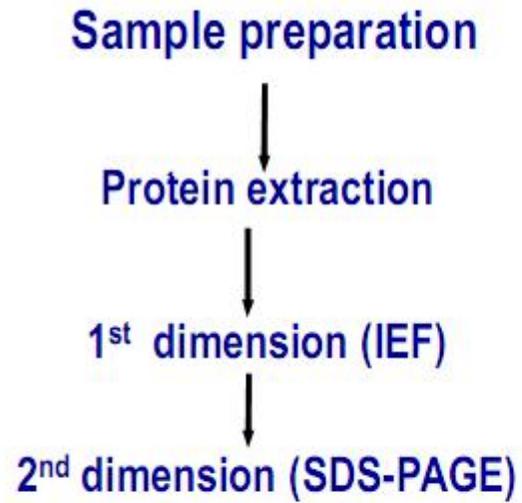
↓  
1<sup>st</sup> dimension (IEF)

## Proteomics in ABRII



**TCA Acetone**

# Proteomics in ABRIL



SDS-PAGE (second)



Extract

SDS-PAGE

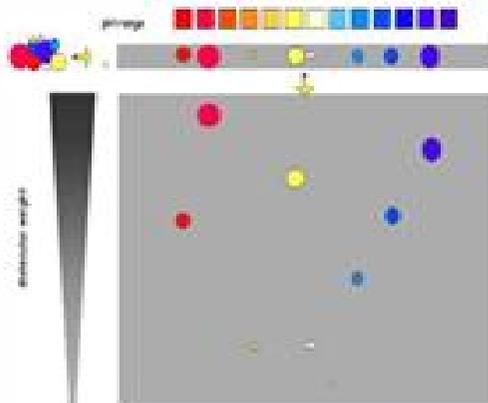
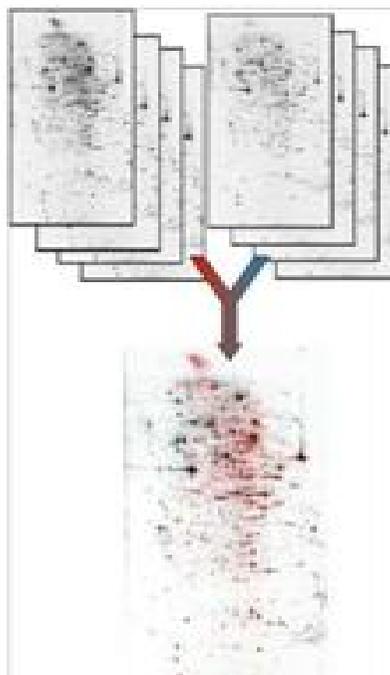
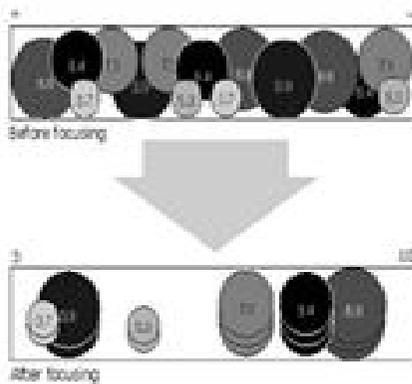


Image capture



Isoelectric focusing



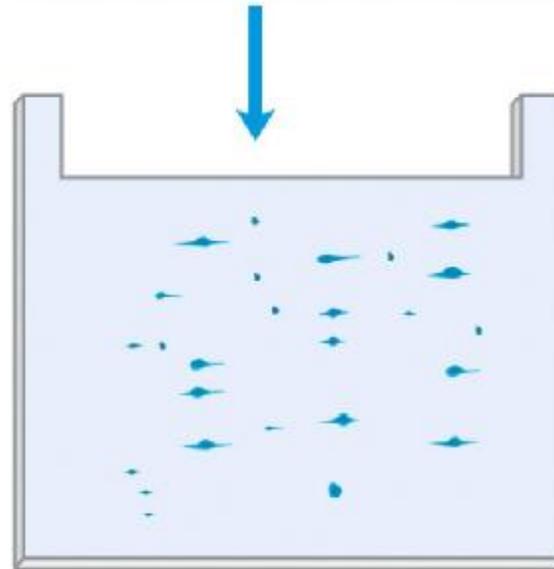
# SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis

- The second dimension separates the proteins based on size.
- There are two parts, the stacking gel which concentrates the sample and the running gel that is used to separate the proteins.
- The IEF gel is soaked in a solution containing chemical to denature the proteins including sodium dodecyl sulfate a detergent which gives the proteins a net negative charge. This means that all proteins will move in one direction.
- The IEF gel is then put in the one long well in the stacking gel, sealed in place with agarose, and the proteins subjected to an electric field to separate.
- The larger proteins are found at the top and the smaller ones are found at the bottom of the gel.

Isoelectric focusing gel is placed on SDS polyacrylamide gel.



**Second dimension**  
SDS polyacrylamide gel electrophoresis



Decreasing  $M_r$

Decreasing  $pI$  →

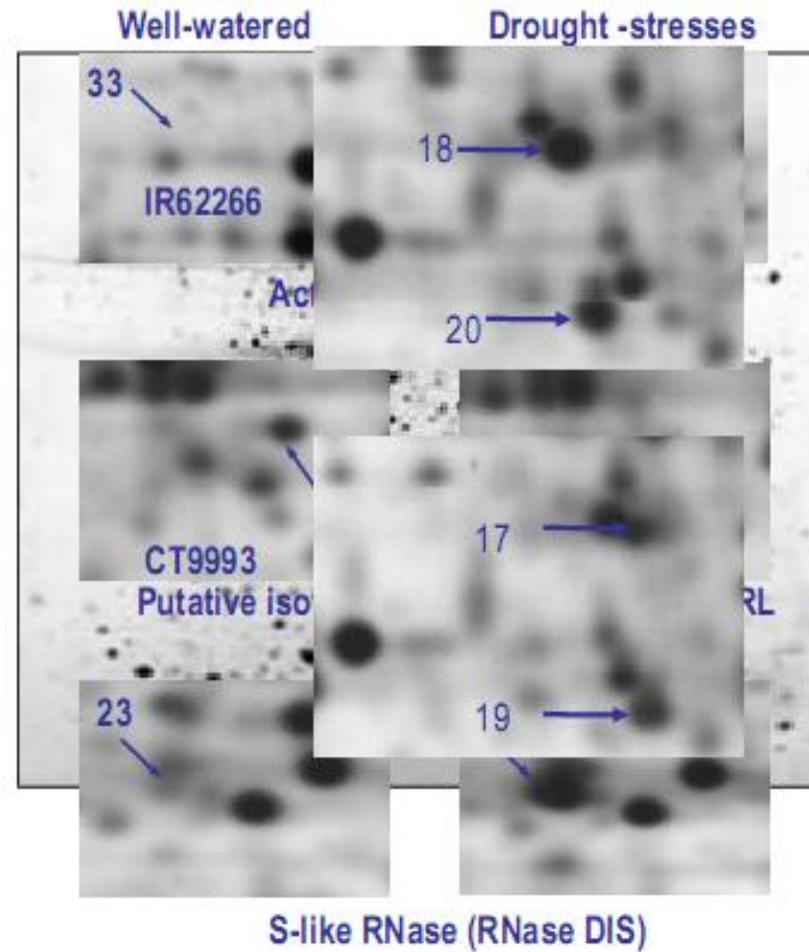
Sample preparation

↓  
Protein extraction

↓  
1<sup>st</sup> dimension (IEF)

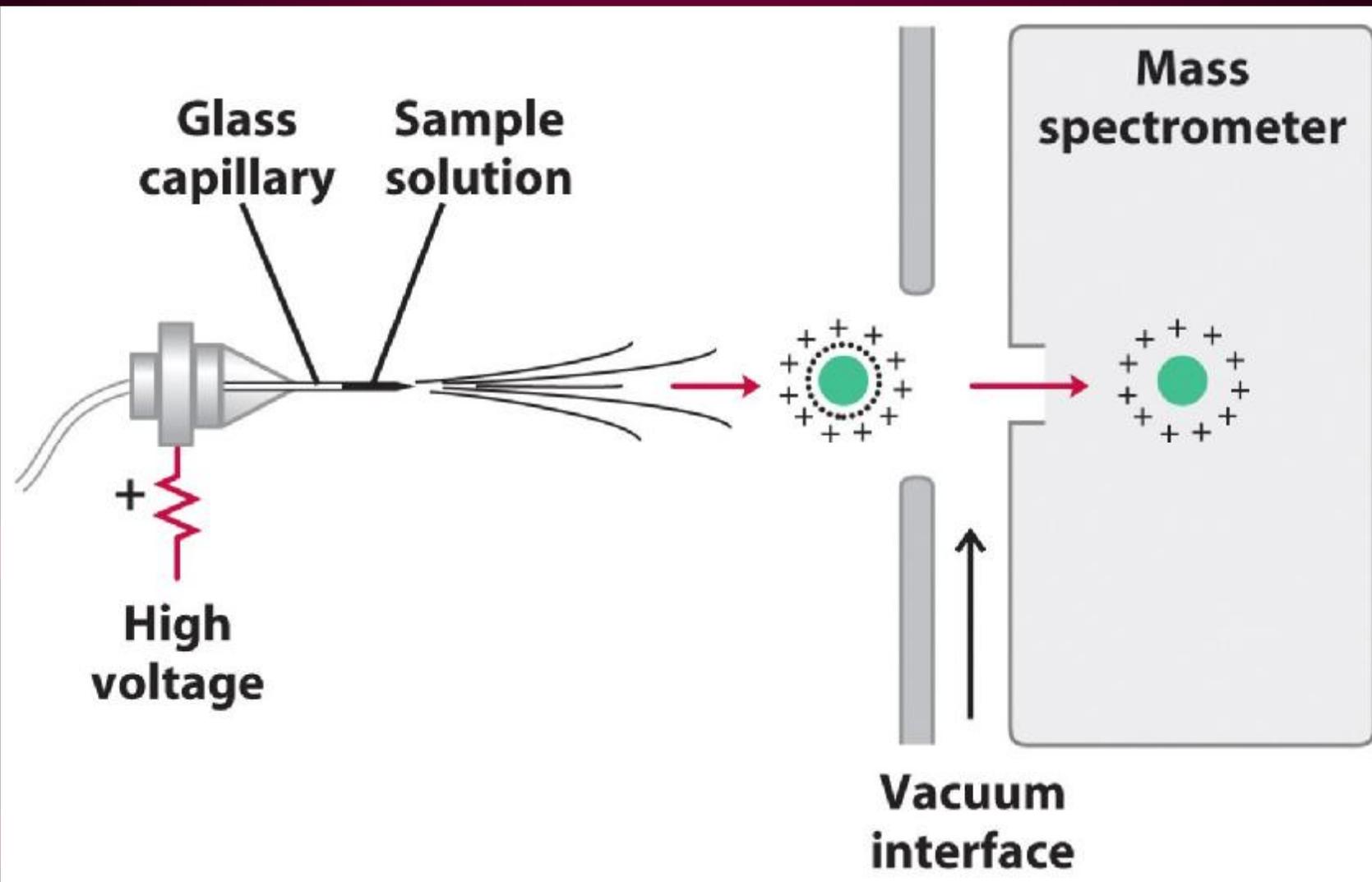
↓  
2<sup>nd</sup> dimension (SDS-PAGE)

## Proteomics in ABRII

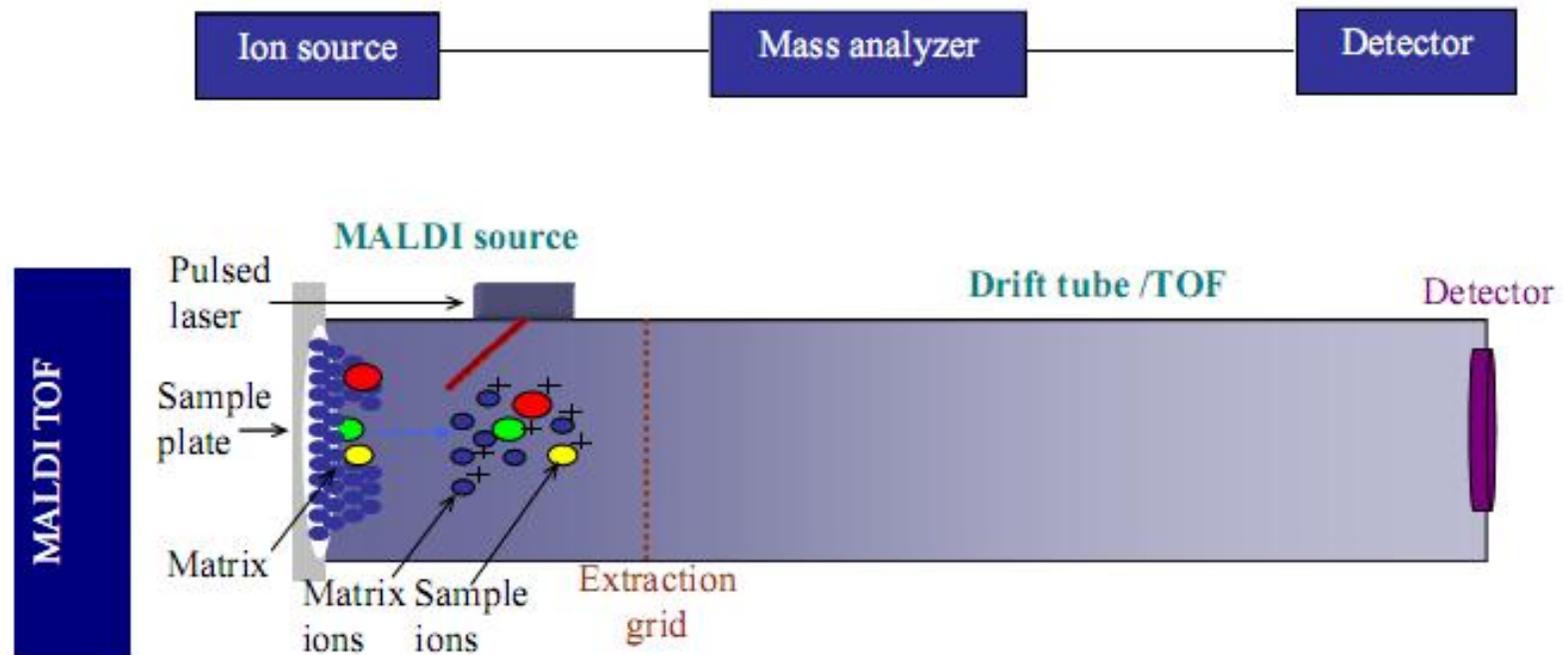


# Mass Spectrometry

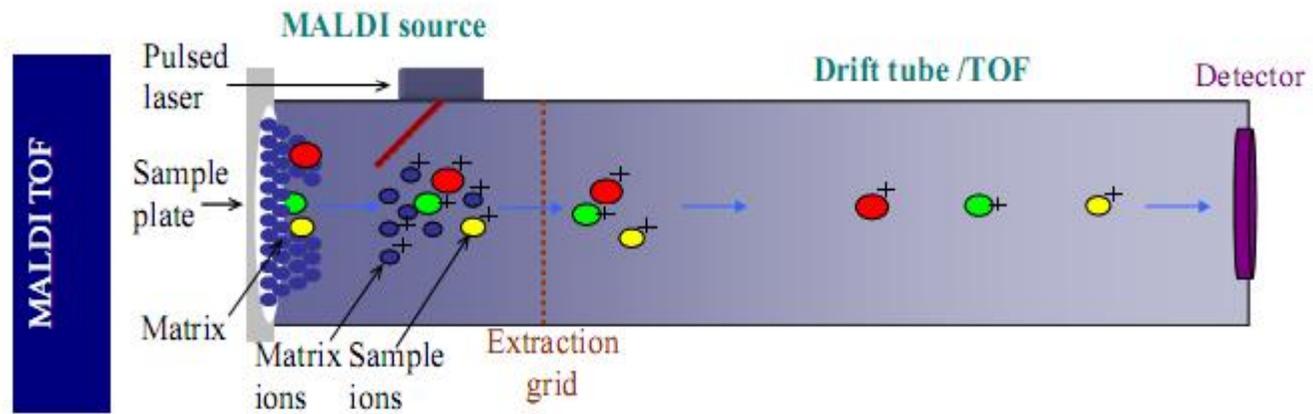
- Separates ions based on mass to charge ratio.
  - Charges are placed on the protein or the peptide by ionization.
- Two most common types of ionization are:
- Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization.
  - MALDI causes fragmentation of the protein during ionization. Can be used to get more information about the fragments. Easier to do than ESI.
- Electrospray ionization (ESI)
  - ESI can give whole protein masses as well as complex masses. If the proteins is first separated by reverse phase HPLC before injection only the subunits masses will be known.



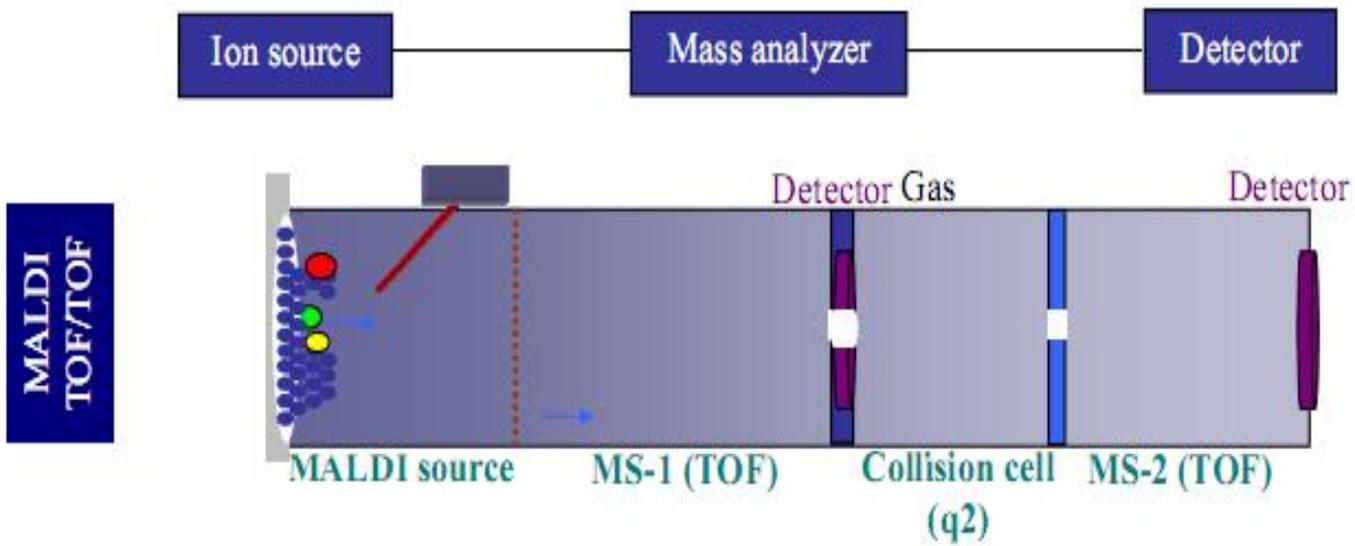
# Protein Identification Using Mass Spectrometry



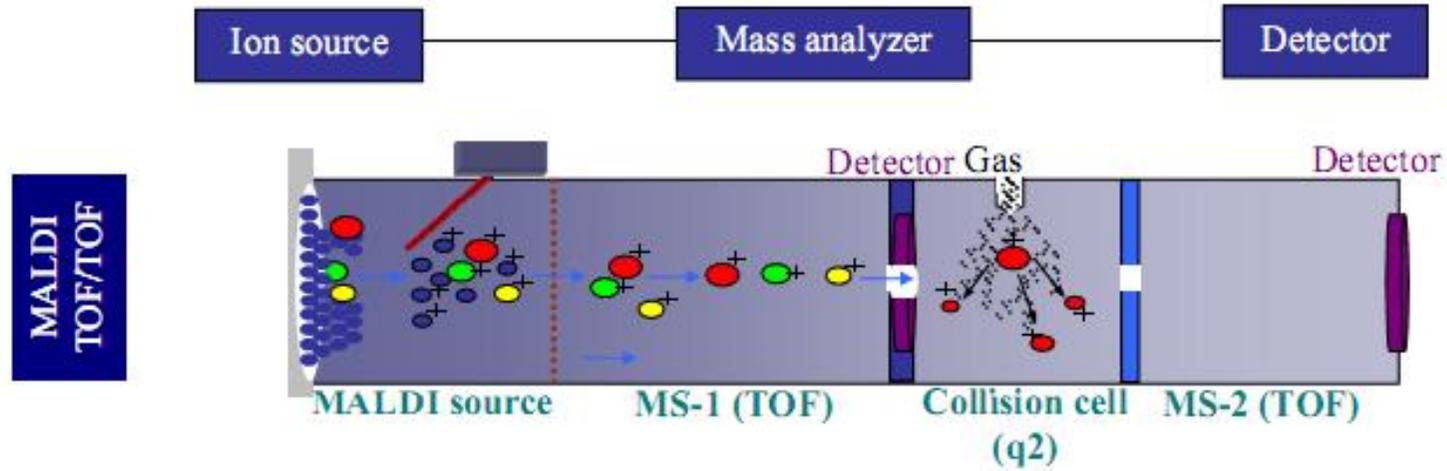
## Protein Identification Using Mass Spectrometry



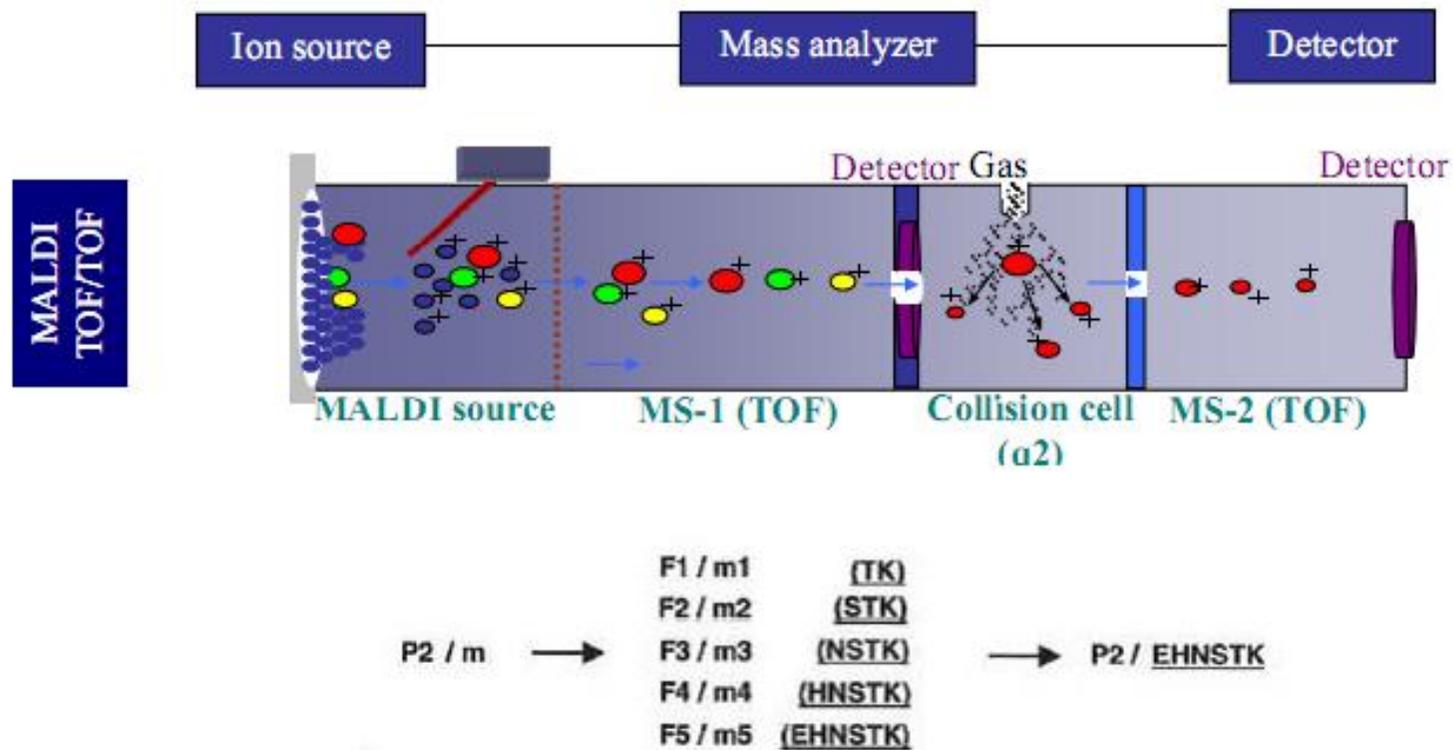
## Protein Identification Using Mass Spectrometry



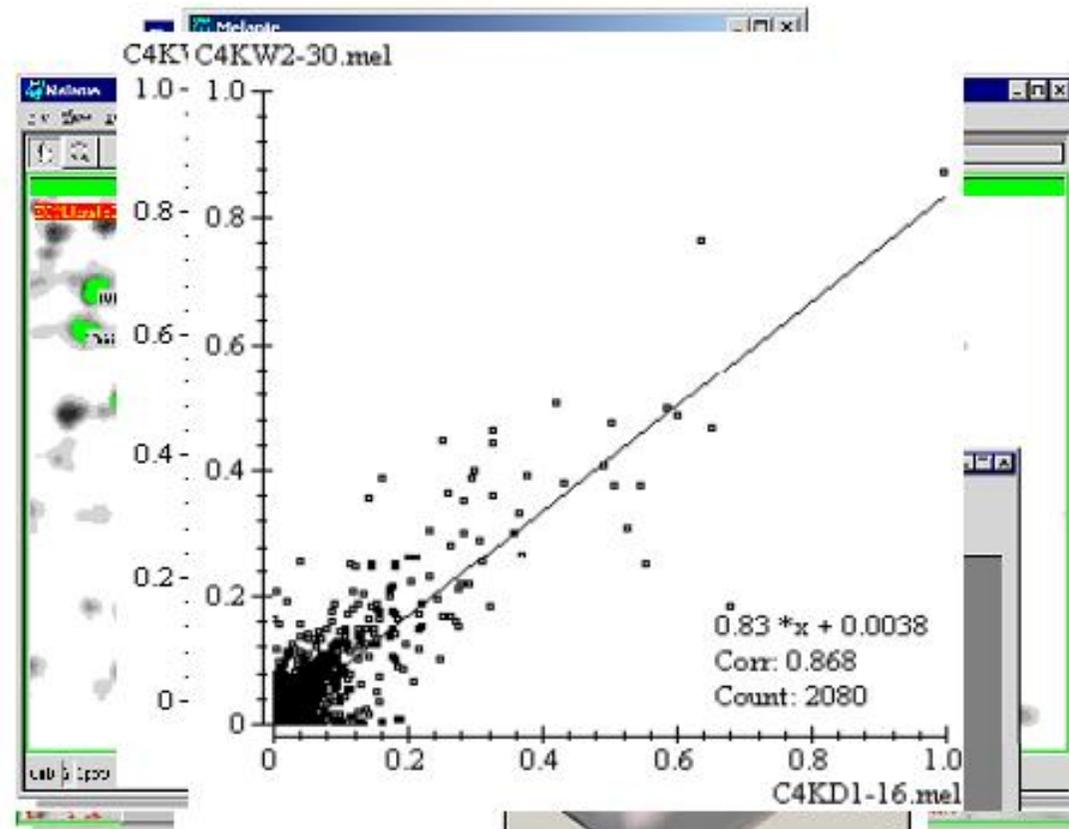
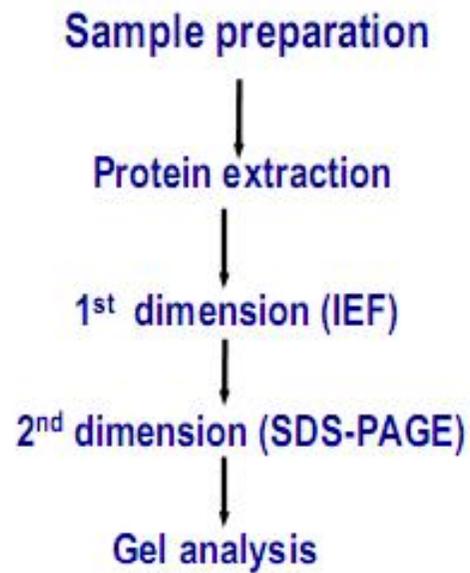
## Protein Identification Using Mass Spectrometry



# Protein Identification Using Mass Spectrometry

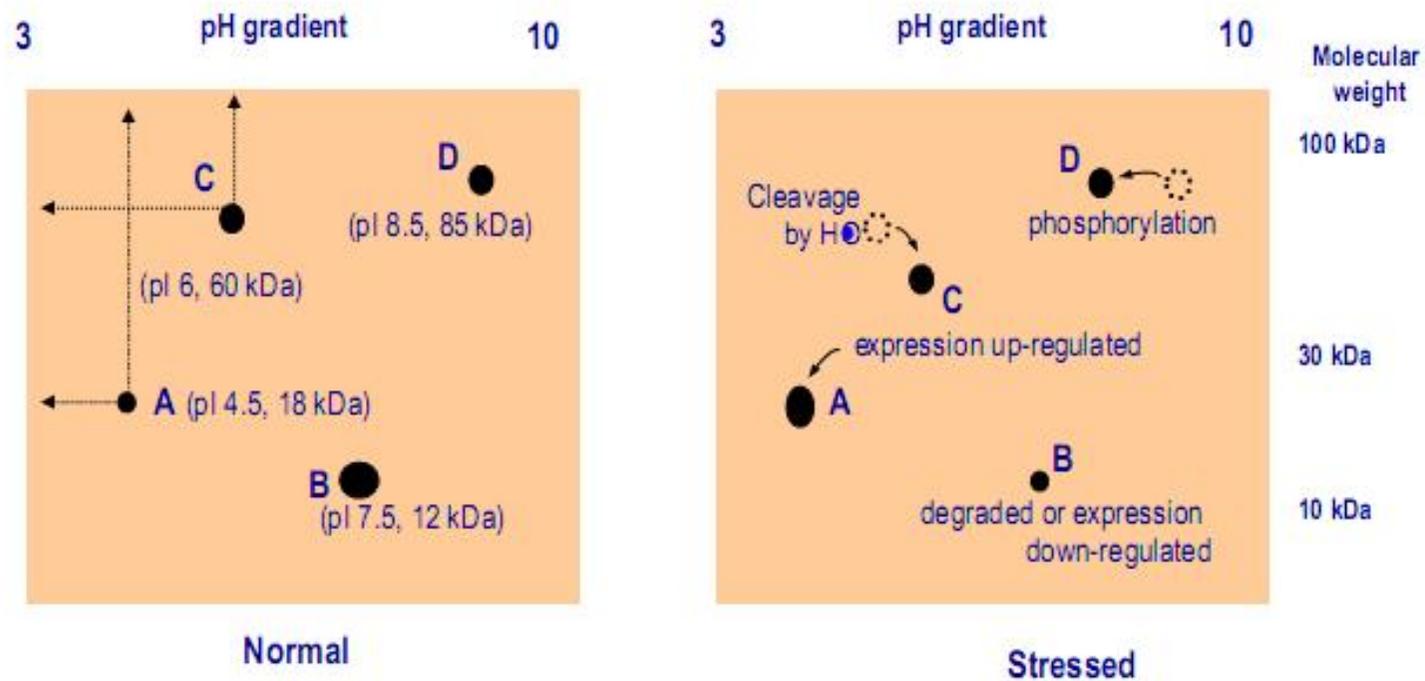


## Proteomics in ABRIL

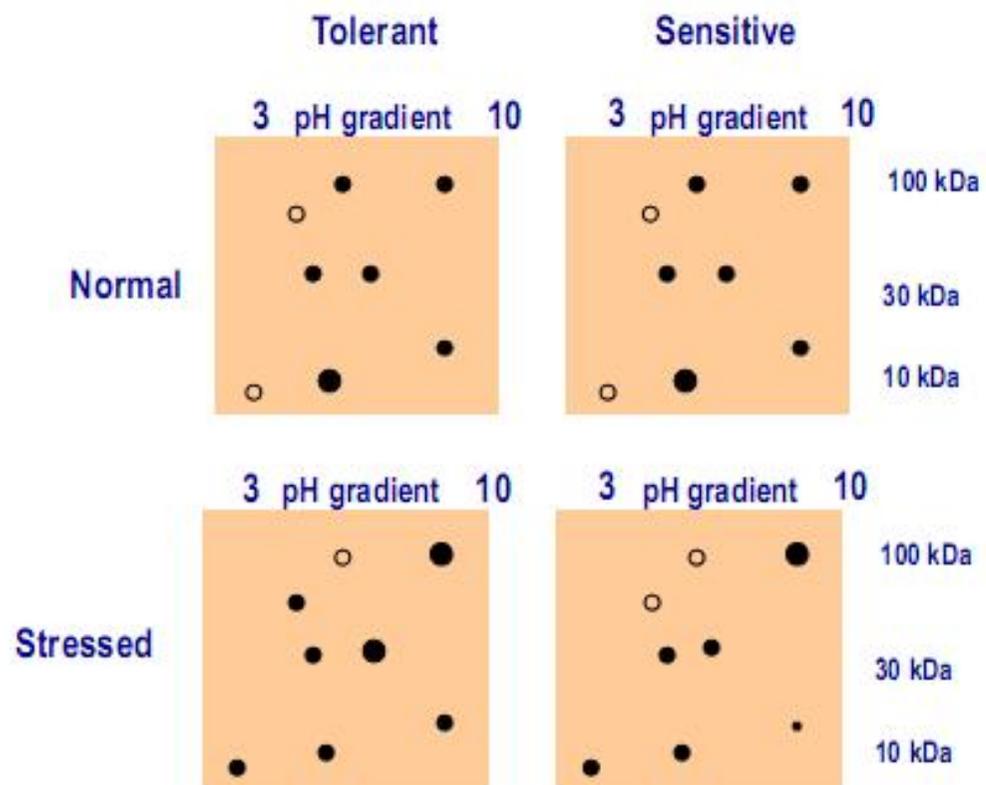


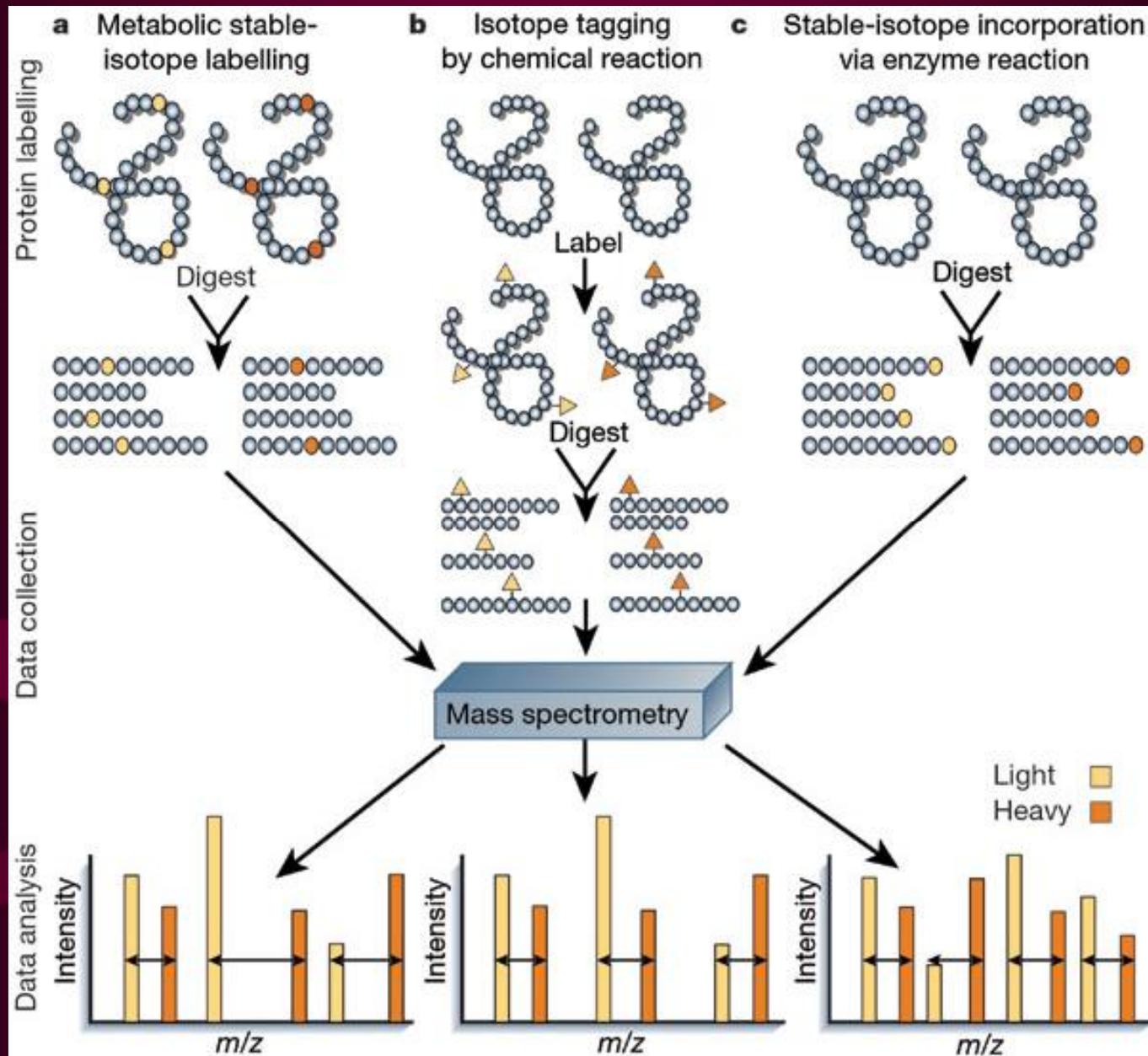
a well-watered plant and a drought-stressed plant

## Expression pattern



## Expression pattern

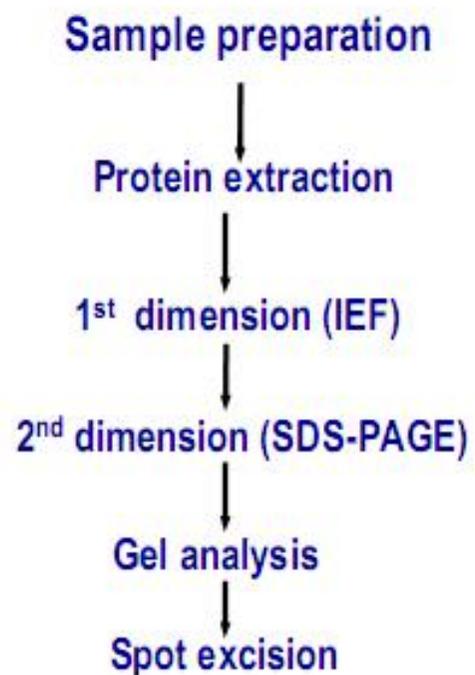




# Amino Acid Masses

Amino acid	Mass(avg)	Amino acid	Mass(avg)
G	57.0520	D	115.0886
A	71.0788	Q	128.1308
S	87.0782	K	128.1742
P	97.1167	E	129.1155
V	99.1326	M	131.1986
T	101.1051	H	137.1412
C	103.1448	F	147.1766
I	113.1595	R	156.1876
L	113.1595	Y	163.1760
N	114.1039	W	186.2133

## Proteomics in ABRIL



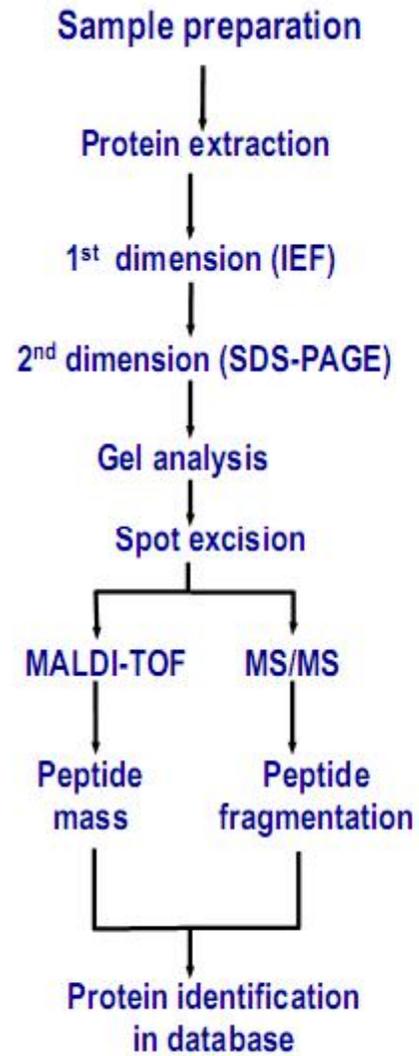
Denature

MITGIQITKAANDLLNDSFRLLD SKGEACIVAAGYAEVVSREYPQLTIVSGQORFNSLTPSL

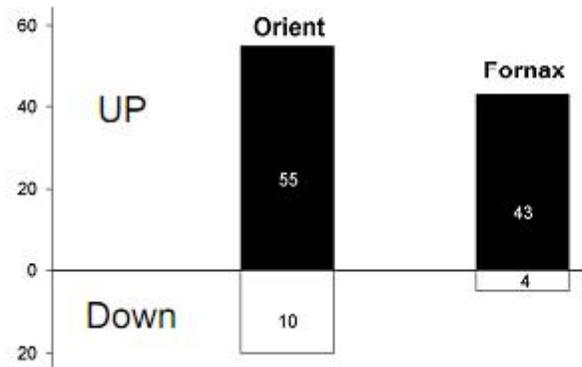
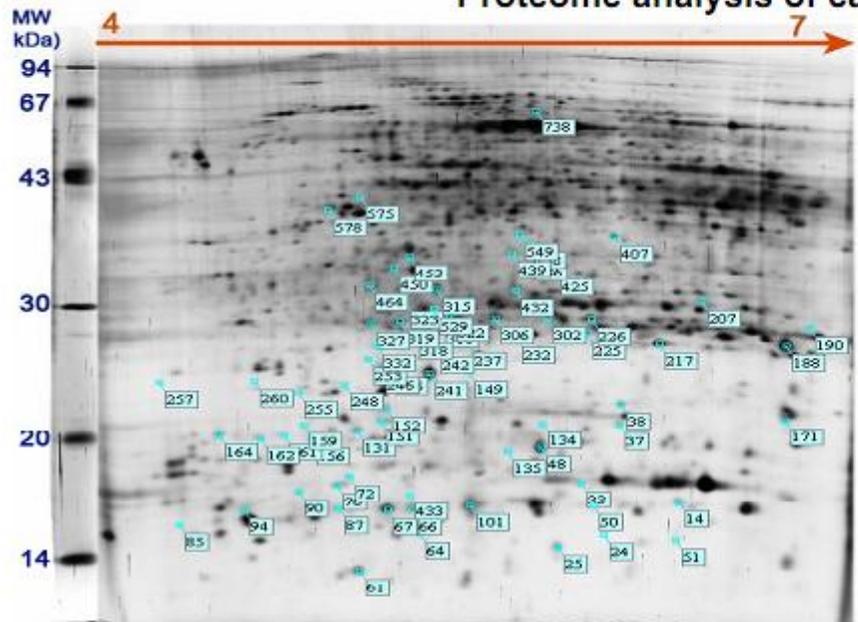
Digest

MITGIQITK	AANDLLNDSFR	LLDSK	GEACIVAAGYAEVVS	EYPQLTIVSGQOR	FNSLTPSL
p1	p2	p3	p4	p5	p6

## Proteomics in ABRIL



## Proteome analysis of canola root





تیمار کنترل

تیمار شوری

