Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 48, No 1, Spring 2017 (219-228)
DOI: 10.22059/ijhs.2017.131542.837

علوم باغبانی ایران
دورۀ ۴۸، شمارۀ ۱، بهار ۱۳۹۶ (ص ۲۲۸-۲۱۹)

بررسی برخی عامل‌های مؤثر در موفقیت ریزپیوندی در شرایط درون شیشه‌ای شماری از رقم‌های ایرانی پسته (*Pistacia vera* L.)

نرگس مجتهدی*
استادیار، پژوهشکدۀ بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، صندوق پستی ۱۸۹۷-۳۱۵۳۵
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/٦/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۱۱/۱۷)

چکیده

روش ریزپیوندی در گیاهان چوبی به‌منظور تولید گیاهان بدون بیماری، بازجوان‌سازی (Rejuvenation)، بررسی مؤثرتر سازگاری پایه و پیوندک و افزایش غیرجنسی همسانه (کلون)ها استفاده شده است. آزمایش‌هایی با هدف بررسی و انتخاب محیط کشت مناسب پس از انجام ریزپیوندی، تأثیر نوع پایه و پیوندک، مدت‌زمان پس از واکشت (پیوندک) در موفقیت ریزپیوندی و همچنین مقایسۀ روش ریزپیوندی پسته در شرایط درون شیشه (*in vitro*) و برون شیشه‌ای (*in vivo*) انجام شد. برای انجام آزمایش‌ها در شرایط درون شیشه ای، در آغاز نسبت به افزایش پایه‌ها و پیوندک‌ها (پایۀ بادامی زرند و رقم‌های اوحدی، اکبری و احمد آقایی) اقدام شد. برای انجام آزمایش‌های ریزپیوندی در شرایط آزاد (*in vivo*)، تنها از بذرهای بادامی زرند به‌عنوان پایه استفاده شد. درصد ریزشاخه‌های باززاشده (درصد گرفتن پیوند)، تولید پینه (کالوس) در محل پیوند و شمار برگ مهم‌ترین صفات بررسی شده بودند. نتایج نشان داد که نوع پایه و پیوندک بر میزان موفقیت ریزپیوندی مؤثر است. محیط کشت مناسب برای استقرار پایه‌ها، محیط کشت پایه MS همراه با ۲ میلی‌گرم نفتالن استیک اسید، بهترین محیط برای استقرار پایه‌ها پس از ریزپیوندی است و باعث کاهش میزان پینه در محل پیوند و کاهش رشد مریستم (مریستم) جوانه‌های جانبی پایه می‌شود. مدت‌زمان پس از واکشت (پیوندک‌ها) در میزان گیرایی پیوند اثر معنی‌داری نداشت. پیوندک‌های آزاد و کشت بافتی تفاوتی نداشتند و می‌توان از پیوندک‌های کشت بافتی برای پیوند روی پایه‌های بذری استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: پایه، پسته، پیوندک، درون شیشه‌ای، ریزپیوندی.

Investigation of several effective factors in the micrografting success rate of some Iranian pistachio varieties *Pistacia vera* L.

Narges Mojtahedi*
Assistant Professor, Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Seed and Plant Improvement Institutes Campus, Mahdasht Road, P. O. Box 31535-1897, Karaj, Iran
(Received: Sep. 16, 2015 - Accepted: Feb. 6, 2016)

ABSTRACT

Micrografting technique has been used on woody species to produce viruses-free plants, rejuvenation, reinvigoration, analysis of grafting compatibility and incompatibility and clone's propagation. Several experiments have been carried out in order to investigate the most suitable culture media after micrografting, effect of types of rootstocks and scions, effect of time after subculture of scions, and comparison of *in vitro* and *in vivo* micrografting techniques for some Iranian pistachio (*Pistacia vera* L.) varieties. For *in vitro* micrografting, rootstocks and scions (Badami-Zarand, Owhadi, Akbari, and Ahmadaghaii) were propagated using micropropagtion. For *in vivo* micrografting experiments, dry nuts of *Pistacia vera* L. var. Badami-Zarand were used. Percentages of regenerated micro-shoots (Micrografting success percentage), callus production on grafted area and leaf numbers were evaluated after one month. Results showed that types of rootstocks and scions had significant effect on micrografting success percentage. The best culture medium for rootstocks was MS supplemented with 2 $mg.L^{-1}$ after micrografting in which decreased callus production in grafted area and growth of nodal meristems of rootstocks. The time after subculture of scions had no significant effect on microgftaing success rate. *In vitro* and *in vivo* scions had no considerable differences; therefore it is possible to use the *in vitro* scions on the *in vivo* rootstocks.

Keywords: *In vitro*, micrografting, Pistachio, rootstock, scion.

* Corresponding author E-mail: n_mojtahd@abrii.ac.ir Tel: +98 937 5700413

مقدمه

پسته یکی از گونه‌های گیاهی دو پایه و خزان‌کننده از خانوادهٔ آناکاردیاسه بوده که در ایران و شمار دیگری از کشورهای جهان اهمیت اقتصادی ویژه‌ای دارد. بنا بر آخرین آمار ارائه‌شده توسط سازمان خواربار و کشاورزی (فائو)[1] در سال ۲۰۱۴، مهم‌ترین کشورهای تولیدکنندهٔ پسته شامل ایران، ایالات متحدهٔ آمریکا، ترکیه و چین هستند (FAO databank, 2014). میانگین تولید پستهٔ ایران از ۱ هکتار باغ پسته در مقایسه با کشورهای رقیب مانند آمریکا و ترکیه بسیار پایین‌تر است. افزایش پسته با روش سنتی در مقایسه با شمار زیادی از درختان میوه‌دار دیگر، بسیار مشکل، زمان‌بر و پرهزینه است. افزون بر این، استفاده از پایه‌های نامناسب و غیریکنواخت، استفاده از رقم‌های نامناسب و کم بارده، روش افزایش بذری، تنوع ژنتیکی و تغییرپذیری ژنتیکی زیاد، سال‌آوری، ریزش جوانه‌ها، سقط‌جنین و پوکی، ناخندانی و زودخندانی، نبود رقم‌های تلقیح‌کنندهٔ مناسب و رعایت نکردن نسبت درختان نر به ماده در باغ و ...، شماری از عامل‌های محدودکنندهٔ پسته‌کاری در کشور هستند. نتایج تحقیقات نشان داده است که در پستهٔ نوع پایهٔ مورد استفاده و تنوع آن می‌تواند بر رشد پیوندک، عملکرد، درجهٔ خندانی، پوکی، عادت سال‌آوری، تحمل به شوری و مقاومت به بیماری‌ها و حتی بر جذب عنصرهای غذایی و وضعیت تغذیه‌ای پیوندک تأثیر بگذارد (Crane & Forde, 1977; Parsa & Wallace, 1980; Crane & Iwakiri, 1986; Brown *et al*., 1992). بنابراین انتخاب و افزایش پایهٔ مناسب یکی از اقدام‌های اولیه و ضروری برای تولید موفق‌تر پسته است. به همین دلیل، افزایش با استفاده از پیوند همسانه (کلون)های برتر روی پایه‌های ناخالص (هتروزیگوت) یا با استفاده از رویش مستقیم بذری انجام می‌شود (Canon *et al*., 2006). پیوند سنتی برای دستیابی به همسانه‌های برتر به معنی داشتن محصول بیشتر و مقاوم شدن به بیماری‌ها است. اما، به علت مشکل در ریشه‌زایی قلمه‌های رقم‌های پسته، پیوند روی نهال‌های پایه‌های پسته، معمول‌ترین روش در حین افزایش غیرجنسی است (Al Barazi & Schwaba, 1982). مشاهدهٔ پیوندک‌های نر یا ماده که به دلیل دو پایه بودن پسته، بر یک پایه پیوند شده‌اند، امری عادی به شمار می‌آید (Canon *et al*., 2006). ریزپیوندی روشی برای تهیهٔ نهال‌های پیوندشده در زمانی کوتاه به دلیل نیاز نداشتن به بلوغ گیاهچه‌ها است. در شرایطی که ریزپیوندی در شرایط درون شیشه‌ای و در حین ریزازدیادی انجام شود، زمان کوتاه‌تر نیز خواهد شد (Canon *et al*., 2006).

روش ریزپیوندی شامل بریدن نوک شاخه به‌ویژه قسمت مریستمی (مریستمی) جوانهٔ انتهایی (۰/۱ تا ۰/۸ میلی‌متر) و پیوند آن روی پایه، که هم در شرایط درون شیشه و هم در شرایط آزاد امکان‌پذیر است. این روش نخستین بار در دههٔ ۸۰ استفاده شد (Burger, 1984; Jonard, 1986). درصورتی‌که پیوندک روی پایه های جوان و در گلخانه با در نظر گرفتن روش شایان پذیرش برای پیوند گیاه موردنظر انجام شود، ریزپیوندی در شرایط آزاد (*in vivo* Micrografting) انجام شده است. در شرایطی که پایه، گیاهچهٔ جوان رشد یافته در شرایط سترون (استریل) باشد یا پیوندک از افزایش درون شیشه‌ای گرفته شده باشد، ریزپیوندی از نوع درون شیشه‌ای است (*in vitro* Micrografting). به دلیل حفظ ویژگی‌های ژنتیکی و ایجاد نشدن تنوع همسانهٔ بدنی (سوماکلونی) در گیاهان، روش ریزپیوندی در شرایط درون شیشه‌ای، روشی مناسب برای تولید انبوه گیاهان در مقیاس گسترده به‌شمار می‌آید (Onay *et al*., 2007). نخستین گزارش درزمینهٔ جوان‌سازی نمونه‌های بالغ پسته با روش ریزپیوندی درون شیشه‌ای، با استفاده از پیوند راس شاخه‌های بالغ بر پایه‌های جوان پستهٔ اهلی *Pistacia vera* در سال ۱۹۸۶ ارائه شد (Barghchi, 1986). اگرچه رشد بسیار کند پیوندک و نداشتن رشد طولی در مراحل بعدی بازدارندهٔ اجرای ریزپیوندی شد. اهمیت و کاربرد روش ریزپیوندی بیشتر در سالم‌سازی و عاری کردن گیاهان از عامل‌های بیماریزا به‌ویژه ویروس، بازجوان‌سازی مواد گیاهی ناشی از درختان پیر و نیز در بررسی دقیق

1. Food & Agriculture Organization (F.A.O)

واکنش سازگاری و ترکیب‌پذیری بین پایه و پیوندک در مدت‌زمانی کوتاه است (Abousalim & Mantell, 1992; Bajaj, 1986; Jonard, 1986). همچنین استفاده از روش‌های ریزپیوندی برای دادن نیروی تازه (Reinvigoration) به درختان گونه‌های دیگر مانند زیتون (Revilla *et al*., 1996) و سکویا (Huang *et al*., 1992) و گونه‌های مختلفی از کاکتوس‌ها (Estrada-Luna, 2002) نیز استفاده شده است. با استفاده از این روش، گیاهان بدون ویروس مرکبات (Singh *et al*., 2008; Duran- Paiva *et al*., 1983; Vila *et al*., 1989)، موز (Hwang & Su, 1998)، بادام (Juárez *et al*., 1992)، سیب و گونه‌های مختلف به (Rafail & Mosleh, 2010) و هلو (Navarro *et al*., 1982) تهیه شده است. در ایران نیز تحقیقاتی درزمینهٔ ریز پیوندی در مرکبات (Shahsavar, 2004; Khoshkam, 2011) و زیتون‌تلخ (Nasiri *et al*., 2004) انجام شده است. روش ریزپیوندی راس شاخه در شرایط درون شیشه‌ای، می‌تواند به‌عنوان روشی جایگزین برای اندام‌زایی و جنین‌زایی رویشی در پسته و به‌ویژه برای مواد گیاهی که از درختان بالغ منتخب گردآوری شده است، استفاده شود (Onay *et al*., 2007). در این نوشتار، آزمایش‌هایی با هدف بررسی و انتخاب مناسب‌ترین محیط کشت پس از انجام ریزپیوندی، تأثیر نوع پایه و پیوندک و مدت‌زمان پس از واکشت (پیوندک) و همچنین مقایسهٔ روش ریزپیوندی پسته در شرایط درون شیشه (*in vitro*) و برون شیشه‌ای (*in vivo*) انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ مواد گیاهی

شاخساره‌های بذری پایهٔ پستهٔ بادامی زرند و رقم‌های اوحدی، اکبری و احمد آقایی که از مؤسسهٔ تحقیقات پستهٔ کشور دریافت شده بودند، در پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی ایران افزایش شدند. به این منظور، بذرها پس از جدا کردن درون فرابر میوه (پریکارپ)، با استفاده از الکل ۷۰درصد به مدت سی ثانیه و وایتکس تجارتی ۵۰درصد (هیپوکلریت سدیم ۲/۵درصد) به مدت پانزده دقیقه و سه بار شستشو با آب مقطر سترون، ضدعفونی سطحی شدند و سپس درون محیط کشت پایهٔ MS همراه با ۷درصد آگار، درون لوله‌های آزمایش، کشت شدند. گیاهچه‌های پنج الی شش برگی، به‌عنوان پایه استفاده شدند.

محیط کشت مورد استفاده برای ریزازدیادی رقم‌های بالا شامل محیط پایه DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) همراه با ویتامین‌های Gamborg's B5 (Gamborg *et al*., 1968) با غلظت Fe- NaEDTA به میزان دو برابر محیط پایه و ۲ میلی‌گرم در لیتر ینزیل‌آمینوپورین (BAP) و ساکارز ۳ درصد بود. pH محیط پیش از اتوکلاو روی ۵/۸ تنظیم شد. در همهٔ آزمایش‌ها، از پیوند شکافی استفاده شد. همهٔ پیوندک‌های درون شیشه‌ای از ریزنمونه‌های راس شاخه پس از ۳ الی ۸ هفته از واکشت و پیوندک‌های آزاد، از راس شاخهٔ نهال‌های ۴۵ روزه تهیه شدند. همچنین، پیوندک‌های درون شیشه‌ای و آراد، ۱ سانتی‌متر ارتفاع و دست‌کم دو برگ و دو جوانه داشتند. پس از جداسازی و برای مناسب کردن اندازهٔ پیوندک‌ها با شکاف ایجادشده در پایه، بخش بسیار کوچکی از ساقه در قاعدهٔ پیوندک در فاصلهٔ ۲ الی ۳ میلی‌متری انتهای منطقهٔ قاعده‌ای، با استفاده از تیغ اسکالپل به شکل V برش داد شد. آزمایش‌ها به شرح زیر انجام شد.

بررسی نوع محیط کشت مورد استفاده برای رشد پایه (MS و DKW) در میزان موفقیت ریزپیوندی در شرایط درون شیشه

برای کاهش یا از بین بردن تولید پینه (کالوس) در محل اتصال و جلوگیری از رویش مریستم جوانه‌های جانبی، آزمونی برای بررسی نوع محیط کشتی که ریزنمونه‌ها پس از پیوند در آن قرار می‌گیرند، انجام شد. دو نوع محیط کشت برای این منظور استفاده شد:

ترکیب شمارهٔ ۱: محیط کشت پایه DKW+ ویتامین‌های Gamborge's B5+ بنزیل‌آمینوپورین ۲ میلی‌گرم در لیتر.

ترکیب شمارهٔ ۲: محیط کشت پایه MS+ Fe-NaEDTA با ۵۰ درصد غلظت محیط پایه+ ویتامین‌های Gamborge's B5+ نفتالن استیک اسید ۲ میلی‌گرم در لیتر.

شاخساره‌های پایهٔ بادامی زرند که از راه ریزازدیادی افزایش شده بودند به‌عنوان منابع گیاهی (پایه و پیوندک) استفاده شدند. پیوندک‌ها دست‌کم دو برگ داشتند. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با دست‌کم سه تکرار و پنج ریزنمونه در هر تکرار انجام شد. از نتایج این آزمایش، برای نگهداری پایه‌ها پس از ریزپیوندی استفاده شد.

تأثیر نوع پایه و پیوندک در موفقیت ریزپیوندی در شرایط درون شیشه

در این آزمایش، تأثیر نوع پایه و پیوندک در میزان موفقیت ریزپیوندی بررسی شد. از شاخساره‌های رقم‌های اوحدی، اکبری و احمد آقایی که از راه ریزازدیادی افزایش شده بودند به‌عنوان منابع گیاهی (پایه و پیوندک) استفاده شد. تیمارها شامل موارد زیر است:

تیمار ۱: پایه: اوحدی، پیوندک: احمد آقایی

تیمار ۲: پایه: احمد آقایی، پیوندک: اوحدی

تیمار ۳: پایه: اوحدی، پیوندک: اکبری

تیمار ۴: پایه: اکبری، پیوندک: اوحدی

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با دست‌کم سه تکرار و هر تکرار شامل دست‌کم پنج ریزنمونه انجام شد.

بررسی تأثیر مدت‌زمان پس از واکشت (پیوندک) و نوع تنظیم‌کنندهٔ رشد در محل پیوند در میزان موفقیت ریزپیوندی در شرایط درون شیشه

در این آزمایش، تأثیر هفته‌های پس از واکشت (۶، ۷ و ۸ هفته پس از واکشت) درزمینهٔ پیوندک‌ها و تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بنزیل‌آمینوپورین، زآتین و 2iP با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر به همراه یک تیمار شاهد بدون تنظیم‌کنندهٔ رشد، در میزان موفقیت ریزپیوندی در شرایط درون شیشه بررسی شد. این آزمایش در قالب طرح فاکتوریل کامل تصادفی با دست‌کم سه تکرار و هر تکرار شامل دست‌کم پنج ریزنمونه انجام شد. ریزنمونه‌های بادامی زرند پس از ۶، ۷ و ۸ هفته از واکشت به‌عنوان پیوندک استفاده شدند. تنظیم‌کننده های رشد یادشده، پس از سترون شدن با استفاده از پالایشگر میلی‌پور (واتمن، ۰/۲ µm)، با استفاده از یک پیپت پاستور سترون، در محل پیوند استفاده شدند. از گیاهچه‌های ریشه‌دارشدهٔ پایهٔ بادامی زرند در شرایط درون شیشه‌ای، به‌عنوان پایه استفاده شد. محیط ریشه‌زایی شامل محیط کشت پایه DKW حاوی ۵۰ درصد غلظت عنصرهای اصلی (ماکرو)، ویتامین‌های Gamborge's B5 به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالن‌استیک‌اسید NAA، ساکارز ۳ درصد و آگار ۷درصد بود. پس از این مراحل، برای القای کامل سرآغازه (پریموردیا)های ریشه‌ای، نمونه‌ها در تاریکی به مدت ۶ تا ۷ روز در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس قرار گرفتند. ساقهٔ نمونه‌های ریشه‌دارشده در فاصلهٔ حدود ۱۵-۱۰ میلی‌متری بالای منطقهٔ ریشه‌دار برش داده شدند و با استفاده از تیغ اسکالپل و ایجاد شکاف کوچکی به اندازهٔ ۵ میلی‌متر، به‌عنوان پایه استفاده شدند. پس از انجام عملیات ریزپیوندی، ریزنمونه‌ها به محیط پایهٔ MS با ۵۰ درصد غلظت عنصرهای اصلی، ویتامین‌های Gamborge's B5، نفتالن استیک اسید با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر، ساکارز ۳ درصد و آگار ۷درصد منتقل شدند.

شرایط نگهداری

در آزمایش‌های اول تا سوم، نمونه‌ها پس از ریزپیوندی در شرایط درون‌شیشه‌ای در شرایط اتاق رشد (فیتوترون) با دمای ۱±۲۶ درجهٔ سلسیوس، دورهٔ نوری (فتوپریود) ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ ۱۰۰-۸۰ و رطوبت نسبی ۶۰-۵۰درصد نگهداری شدند.

مقایسهٔ بین پیوندک‌های کشت بافتی (*in vitro*) و آزاد (*in vivo*) در میزان موفقیت ریزپیوندی در شرایط برون شیشه‌ای

در این آزمایش، از شاخساره‌های پایهٔ بادامی زرند به‌عنوان منابع گیاهی (پایه و پیوندک) استفاده شد. در آغاز نسبت به افزایش پایه با استفاده از روش افزایش بذری اقدام شد. پیوندک‌ها با استفاده از هر دو روش ریزازدیادی در محیط کشت یادشده و روش بذری افزایش شدند. بذرهای بادامی زرند درون گلدان‌های حاوی رس و ماسه شسته شده به نسبت ۱:۱ در شرایط گلخانه‌ای با دمای ۳±۲۵

درجهٔ سلسیوس در اسفندماه کشت شدند. پس از ۴۵ روز از کشت و رویش بذرهای، نهال‌های یک اندازهٔ دارای ۵ الی ۶ برگی جدا و پس از سربرداری، پیوندک‌های کشت بافتی و آزاد ۱ سانتی‌متری دارای یک برگ از راه پیوند شکافی پیوند زده شدند و محل پیوند با استفاده از پارافیلم به‌کلی بسته و روی گلدان‌ها با لیوان‌های یک‌بارمصرف شفاف پلاستیکی پوشانده شد. بیست نهال بادامی زرند به‌عنوان پایه برای هریک از دو نوع پیوند کشت بافتی و آزاد (درمجموع ۴۰ نهال) استفاده شدند. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. رشد پیوندک‌ها و ایجاد برگ‌های جدید، پس از یک ماه از سازگاری پیوندک‌های درون شیشه‌ای (۴۵ روز پس از ریزپیوندی) و ۴۵ روز پس از ریزپیوندی در مورد پیوندک‌های آزاد، بررسی شد.

گردآوری نتایج و تجزیهٔ آماری

اطلاعات صفات مورد بررسی شامل گیرایی پیوند (برقراری اتصال بین پایه و پیوندک)، تولید پینه در محل پیوند و شمار برگ‌های سالم، گردآوری و با استفاده از رویهٔ GLM نرم‌افزار SAS تجزیه‌وتحلیل انجام شد. در صورت نیاز، داده‌ها پیش از تجزیه یا روش لگاریتمی نرمال شدند و مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۱درصد و ۵درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نوع محیط کشت مورد استفاده (MS و DKW) برای رشد پایه در میزان موفقیت ریزپیوندی در شرایط درون شیشه

نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها نشان داد، ۲/۶۶ برگ در هر ریزنمونه در محیط DKW (ترکیب شمارهٔ ۱) به ازای ۱/۷۳ برگ در هر ریزنمونه در محیط MS (ترکیب شمارهٔ ۲) تولید شده است. با استفاده از ترکیب شمارهٔ ۱ پینه‌زایی کاهش یافت، اما میزان گیرایی پیوند در مقایسه با ترکیب شمارهٔ ۲ تغییر معنی‌داری نداشت. به نظر می‌رسد، علت کاهش شمار برگ‌ها، کاهش غلظت عنصرهای اصلی و نصف شدن غلظت Fe-Na EDTA در مقایسه با محیط شاخه‌افزایی است. استفاده از بنزیل‌آمینوپورین در محیط DKW (ترکیب شمارهٔ ۱) باعث افزایش شمار برگ‌ها شده است. درحالی‌که استفاده از نفتالن استیک اسید در محیط MS (ترکیب شمارهٔ ۲)، به‌طورکامل رویش مریستم جوانه‌های جانبی را متوقف کرد.

تولید پینه در محل اتصال پایه و پیوندک، یکی از مهم‌ترین مشکلات برای انجام ریزپیوندی بود، به‌طوری‌که همهٔ ریزنمونه‌های پیوندشدهٔ مورد بررسی در این آزمون، در محل اتصال پایه و پیوندک در محیط DKW (ترکیب شمارهٔ ۱) پینه تولید کردند (شکل شمارهٔ a-۱). ایجاد پینه بازدارندهٔ جذب مواد غذایی به‌ویژه کلسیم توسط پیوندک می‌شود که در نهایت منجر به تغییر رنگ پیوندک پس از مدت کوتاهی خواهد شد. این مسئله باعث موفقیت نداشتن در ریزپیوندی می‌شود و ریزنمونه ها در نهایت از بین خواهند رفت (شکل شماره b-۱). به نظر می‌رسد علت این مسئله، قرار گرفتن پایه درون محیط کشت حاوی بنزیل‌آمینوپورین بود که باوجود تأثیر مثبت در گیرایی پیوند، باعث افزایش تقسیم یاخته‌ای در این ناحیه و ایجاد پینه شد. با ارزیابی نتایج این آزمایش و بررسی کیفی ریزنمونه‌ها، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از محیط MS (ترکیب شمارهٔ ۲) برای ریزپیوندی مناسب‌تر از محیط DKW (ترکیب شمارهٔ ۱) است. لذا در آزمایش‌های بعدی از این محیط به‌عنوان محیط کشت ویژهٔ ریزپیوندی استفاده شد. نتایج این تحقیق با نتایج محققان دیگر مبنی بر استفاده از محیط کشت پایهٔ MS و افزایش درصد موفقیت ریزپیوندی در پسته (Onay *et al*., 2004b)، گلابی (Rehman & Gill, 2014) و مرکبات (Grewal *et al*., 1994) همخوانی دارد. اما نوع تنظیم‌کنندهٔ رشد گیاهی استفاده‌شده بر پایهٔ نوع گیاه متفاوت است.

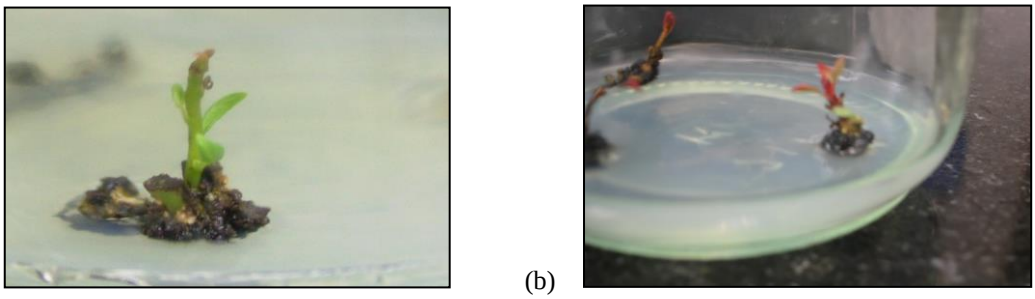
جدول ۱. تأثیر نوع محیط کشت در موفقیت ریزپیوندی در شرایط درون شیشه

Table 1. Effect of culture media on the *in vitro* micrografting success rate

Media	Micrografting success (%)	Leaf numbers	Callus initiation in the grafted area (%)
DKW	71 [a]	2.66 [a]	80 [a]
MS	83 [a]	1.73 [b]	75 [b]

حرف‌های همسان در هر ستون نشان‌دهندهٔ، نداشتن اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن است.

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



(a) (b)

شکل ۱. ایجاد پینه در محل ریزپیوندی یک ماه پس از پیوند A)، جلوگیری از رشد پیوندک و تغییر رنگ برگ‌ها به علت ایجاد پینه B)، پینه‌ها در محل پیوند به صورت توده‌های قهوه‌ای رنگ و با پیکان مشخص شده است.

Figure 1. Callus initiation in the grafted area one month after micrografting A) Callus prohibited of scion growth and induced changing color of leaves B) Brown callus in grafted area.

تأثیر نوع پایه و پیوندک در موفقیت ریزپیوندی در شرایط درون شیشه‌ای

با توجه به نتایج مندرج در جدول ۲، نوع پایه و پیوندک در گیرایی پیوند و شمار برگ‌های تولیدشده روی پیوندک به ترتیب در سطح ۵درصد و ۱درصد تأثیر معنی‌دار دارد. به‌عنوان نمونه، درصورتی‌که پایه، احمد آقایی و پیوندک اوحدی باشد (تیمار ۲)، میزان گیرایی پیوند و شمار برگ به ترتیب ۸۶درصد و ۵/۳۳ بود، درحالی‌که با جابجایی پایه و پیوندک (پایهٔ رقم اوحدی و پیوندک رقم احمد آقایی) (تیمار ۱)، شمار برگ کاهش یافت. در تیمار ۳، در شرایطی که پایهٔ اوحدی و پیوندک اکبری باشد، پایین‌ترین میزان گیرایی پیوند (۲۶) و کمترین شمار برگ‌ها تولید شد.

جدول ۲. اثر نوع پایه و پیوندک در موفقیت ریزپیوندی در شرایط درون شیشه‌ای

Table 2. Effect of rootstock and scion on the *in vitro* micrografting success rate

Treatment	Leaf number	Micrografting success (%)
Treatment 1: Rootstock: Owhadi; Scion: Ahmadahgaii	3.46 [b]	73 [a]
Treatment 2: Rootstock: Ahmadahgaii; Scion: Owhadi	5.33 [a]	86 [a]
Treatment 3: Rootstock: Owhadi; Scion: Akbarii	1.33 [c]	26 [b]
Treatment 4: Rootstock:Akbarii; Scion: Owhadi	2.23 [bc]	53 [ab]

میانگین‌های موجود در هر ستون با حرف‌های انگلیسی متفاوت برای صفت گیرایی پیوند و شمار برگ به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد و ۱درصد با همدیگر با استفاده از آزمون دانکن دارند.

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

به‌طورمعمول در پسته، ناسازگاری بین پایه و پیوندک اغلب در حین پیوند درون‌گونه‌ای رخ می‌دهد (Onay *et al*., 2003). اما نتایج این آزمایش نشان داد که تغییر پایه و پیوندک به‌صورت دو جانبه نیز، بر موفقیت ریزپیوندی مؤثر است. نتایج بررسی‌های دیگر محققان نیز نشان داده است، موفقیت ریزپیوندی در رقم‌های انگور، به‌طورکامل وابسته به رقم و متأثر از منبعی که رأس شاخه به‌عنوان پیوندک از آن تهیه می‌شود، قرار می‌گیرد. اگرچه هیچ تأثیر برجسته‌ای در رشد گیاهان پیوندشده در مراحل بعد مشاهده نشده است (Baydar & Celik, 1999). همچنین در گزارشی دیگر، ارتباط بین طول نوع پایه و طول پیوندک رقم‌های بادام، بر میزان موفقیت ریزپیوندی اثبات شده است (Yıldırım *et al*., 2012). در گیاهان پیوند شده، ترمیم و بازرایی آوندها، فرآیند پیچیده‌ای است که شامل بازرایی بافت پارانشیمی از هر دو جهت (پایه و پیوندک) و تشکیل بافت جدید آوندهای چوبی و آبکش است. با توجه به اینکه استقرار دوبارهٔ آوندها به‌ویژه آوند چوبی در محل پیوند، فرآیند بسیار مهم‌تر در جهت ادامهٔ حیات پیوندک به شمار می‌آید، سازگاری بین پایه و پیوندک برای تشکیل واحدهای جدید آوندی در محل پیوند، اهمیت زیادی برای اطمینان از جریان شیرهٔ خام دارد. این امر حتی در شرایطی که پیوندک و پایه جابه‌جا می‌شوند نیز مشاهده می‌شود (Yıldırım *et al*., 2012).

تأثیر مدت‌زمان پس از واکشت (پیوندک) و نوع تنظیم‌کنندهٔ رشد در محل پیوند در میزان موفقیت ریزپیوندی در شرایط درون شیشه

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد در محل پیوند بر صفات تشکیل پینه و گیرایی پیوند اثر معنی‌دار داشت، اما مدت‌زمان پس از واکشت پیوندک، اثر معنی‌داری در صفات مورد بررسی نداشت. میزان گیرایی پیوند با استفاده از زآتین با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر به‌طور معنی‌داری بیش از دیگر تنظیم‌کننده‌ها و تیمار شاهد بود (جدول ۳، شکل ۲). میزان پینهٔ تولیدشده در محل پیوند، با استفاده از زآتین کمتر از تیمارهای دیگر بود. به‌طور کل می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از تنظیم‌کنندهٔ رشد گیاهی زآتین در گیرایی پیوند و کاهش میزان پینه در محل پیوند مؤثر است. لذا در آزمایش‌های بعدی از این روش برای افزایش گیرایی پیوند استفاده شد.

نتایج تحقیقات دیگر محققان نشان داده است، سن نمونه‌های استفاده شده برای پیوندک در شرایط درون و برون شیشه‌ای، موفقیت ریزپیوندی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بالاترین میزان موفقیت در ریزپیوندی با استفاده از پیوندک‌های به‌دست‌آمده از درختان یک‌ساله به دست آمد (Onay *et al*., 2003; 2004a). در زیتون‌تلخ نیز، در شرایطی که ریزپیوندی بر پایه‌های جوان‌تر حاوی ۲ تا ۳ برگ انجام گیرد، در مقایسه با ریزپیوندی بر پایه‌های دارای ۴ تا ۵ برگ، افزایش موفقیت ریزپیوندی در شرایط درون شیشه‌ای را در پی داشته است (Nasiri *et al*., 2004).

جدول ۳. تأثیر مدت‌زمان پس از واکشت (پیوندک) در موفقیت ریزپیوندی در شرایط درون شیشه‌ای

Table 3. Effect of time after subculture of scions in the *in vitro* micrografting micrografting success rate

Kind of Plant Growth Regulator in the grafted area	Micrografting success (%)	Callus production on grafted area
No Plant Growth Regulator	12.1 [d]	87 [a]
BAP	59.1 [c]	47 [b]
2iP	80.3 [b]	57 [b]
Zeatin	90.3 [a]	40 [ab]

میانگین‌های موجود در هر ستون با حرف‌های انگلیسی متفاوت اختلاف معنی‌داری در سطح ۱درصد با همدیگر دارند.

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

شکل ۲. استفاده از زآتین با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و کاهش تولید پینه در محل پیوند پس از یک ماه از ریزپیوندی

Figure 2. Application of one mg.L^{-1} of zeatin that decreased callus initiation in the grafted area one month after micrografting

استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در فرآیند رشد پیوندک، یکی از روش‌های معمول برای افزایش موفقیت ریزپیوندی است (Rehman & Gill, 2015). با وجود تنوع در گیاهان مختلف استفاده شده به‌عنوان منابع پایه و پیوندک که به‌طور عمده شامل مرکبات (Edriss & Burger, 1984; Parthasarathy e*t al*., 1997)، گلابی (Wu *et al*., 2007)، زیتون‌تلخ (Okpani & Ezeukwa, 1981; Nasiri *et al*., 2004)، بادام (Işıkalan *et al*., 2011) و بادام‌هندی (Ramanayake & Kovoor, 1997) و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی متفاوت در هر گیاه و مراحل مختلف ریزپیوندی، نتیجهٔ همسانی مبنی بر افزایش معنی‌دار درصد موفقیت ریزپیوندی در همهٔ تحقیقات به‌دست‌آمده است (Rehman & Gill, 2015).

مقایسهٔ بین پیوندک‌های آزاد و معمولی در میزان موفقیت ریزپیوندی در شرایط برون شیشه‌ای

نتایج نشان داد، درصد گیرایی پیوند برای پیوندک‌های کشت بافتی و آزاد تا حدودی مساوی و به ترتیب (۵۲درصد و ۶۰درصد) بود. در شماری از نمونه‌ها که پیوند موفقیت‌آمیز نبود، به دلیل قطع کامل برگ‌ها و جوانه‌های جانبی پایه، نهال‌ها به‌طورکامل از بین رفتند. با وجود پایین بودن درصد گیرایی پیوند، پیوندک‌های آزاد و کشت بافتی تفاوتی نداشتند و با بهینه کردن شرایط، می‌توان از پیوندک‌های کشت بافتی برای پیوند روی پایه‌های بذری استفاده کرد. نتایج موفقیت‌آمیزی با استفاده از ریزپیوندی در

شرایط درون شیشه‌ای پیوندک‌های سه رقم بادام "Ferratar"، "Texas" و "Nonpareil" بر پایه‌های بذری "Ferragnes" و "Ferraduel" به دست آمده است. موفقیت ریزپیوندی بین ۸۳ تا ۱۰۰ درصد بر پایهٔ نوع رقم و شمار جوانه‌های پیوندک متغیر بود (Yildrim *et al*., 2013).

نتیجه‌گیری کلی

موفقیت ریزپیوندی تحت تأثیر عامل‌های چندی مانند نوع پایه، شرایط فیزیولوژیک پایه، نوع پیوند، منشأ پیوندک، سن و طول پیوندک و سازگاری پایه و پیوندک بستگی دارد. در آزمایش‌های انجام شده، محیط کشت مناسب برای استقرار پایه‌ها پس از ریزپیوندی به دلیل کاهش میزان پینهٔ تولیدشده در محل پیوند و کاهش رشد مریستم جوانه‌های جانبی پایه، محیط کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم نفتالن استیک اسید است. با وجود اثر نوع پایه و پیوندک بر میزان موفقیت ریزپیوندی، زمان پس از واکشت برای برداشت پیوندک‌ها در میزان گیرایی پیوند مؤثر نبود. برای انجام ریزپیوندی، انتخاب پایه و پیوندک و سازگاری آن‌ها اثر معنی‌داری بر موفقیت ریزپیوندی دارد، لذا نوع پایه و پیوندک باید بررسی شود. همچنین، پیوندک‌های آزاد و کشت بافتی نیز تفاوتی نداشتند.

سپاسگزاری

از مسئولان ومحققان مؤسسهٔ تحقیقات پستهٔ کشور برای در اختیار قرار دادن نمونه‌ها و آقای دکتر علی وطن‌پور ازغندی به جهت مشاوره‌های ارزندهٔ ایشان، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Abousalim, A. & Mantell, S. H. (1992). Micrografting of pistachio (*Pistacia vera* L. cv. Mateur). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 29, 231-234.
2. Al Barazi, Z. & Schwaba, W. W. (1982). Rooting softwood cutting of adult *Pistacia vera*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 57, 247-252.
3. Bajaj, Y. P. S. (1986). Biotechnology of tree improvement for rapid propagation and biomass energy production. In: Bajaj, Y.P.S (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry (Trees I)*, Springer-Verlag, Berlin, Germany. 1-23.
4. Barghchi, M. (1986). *In vitro* culture of mature commercial varieties of *Pistacia vera* L. Proceeding of International *Plant Propagation Society*, 35, 331-333.
5. Baydar, N. G. & Celik, H. (1999). The effects of shoot tip source on the success of *in vitro* micrografting in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Turkish Journal of Agricultural Forestry*, 23, 741-748.
6. Brown, P. H., Zhang, Q. & Ferguson, L. (1992). *Nutrient uptake of various pistachio rootstocks*. California Pistachio Association Annual Report-Crop Year 1991-92. California Pistachio Commission. Fresno, CA, U.S.A. 158-162.
7. Burger, D. W. (1984). Micrografting: a tool for the plant propagator. *Proceedings of International Plant Propagator's Society*, 34, 244-253.
8. Canon, C., Mehmet, O., Hakan, T., Kamil, S. & Elman, I. (2006). *In vitro* micrografting of pistachio (*Pistacia vera* L.) var. Siirt on wild pistachio rootstocks. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 5, 25-31.
9. Crane, J. C. & Forde, H. I. (1977). *Yield and quality of pistachio nuts as affected by rootstock*. California Pistachio Association Annual Report-Crop Year 1976-77. California Pistachio Commission. Fresno, CA, U.S.A. 23-25.
10. Crane, J. C. & Iwakiri, B. T. (1986). Pistachio yield and quality as affected by rootstock. *HortScience*, 21, 1139-1140.
11. FAO. (2014). databank is available on Internet online URL: http://faostat3.fao.org/
12. Driver, J. A. & Kuniyuki, A. H. (1984). *In vitro* propagation of paradox walnut rootstocks. *HortScience*, 19, 507.
13. Duran-Vila, N., Ortega, V. & Navarro, L. (1989). Morphogenesis and tissue cultures of three citrus species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 16, 123-133.
14. Edriss, M. H. & Burger, D. W. (1984). Micrografting shoot tip culture of citrus on three trifoliate rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 23, 255-59.
15. Estrada-Luna, A. A., Lopez-Peralta, C. & Cardenas-Soriano, E. (2002). *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia spp*.). *Scientia Horticultura*, 92, 317-327.

16. Gamborg, O. L., Miller, R. A. & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50, 151-158.
17. Grewal, H. S., Dhatt, A. S. & Gosal, S. S. (1994). *In vitro* shoot tip grafting in *citrus*. *Annals of Biology* 10, 1-6.
18. Işıkalan, Ç., Namli, S., Akbas, F. & Erol Ak, B. (2011). Micrografting of almond (*Amygdalus communis*) cultivar 'Nonpareil'. *Australian journal of Crop Science*, 5, 61-65.
19. Khoshkam, S. (2011). Effect of several factors on *in vitro* micrografting of Washington Novel orange on the Raflemon (*Citrus jambhiri* Lush) and Orange (*Citrus aurantium* L.) as rootstock. In: Proceeding of *7th National congress of horticultural science*. September 2011. Isfahan, Iran. www.Civilica.com COI code: BAGHBANI107-199 (in Farsi)
20. Hwang, S. C. & Su, H. J. (1998). Production and cultivation of virus-free Banana tissue-cultured plantlets in Taiwan. In: Proceedings of *Regional workshop on disease management of banana and citrus trough the use of disease-free planting materials*. 14-16 Oct., Davao City, Philippines, pp. 24- 31.
21. Huang, L. C., Liuse, S., Huange, B. L., Murashige, T., Madhi, E. F. M. & van Gundy, R. V. (1992). Rejuvenation of Sequoia sempervirens by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks *in vitro*. *Plant Physiology*, 98, 166-173.
22. Jonard, R. (1986). Micrografting and it's applications to tree improvement. In: Bajaj, Y. P.S. (Ed.), *Biothechnology in agriculture and foresty*; trees I. (pp. 31-48) Springer-Verlag, Berlin. Germany.
23. Jonard, R., Soedharma, I. & Villemur, P. (1987). Analysis of the influence of various factors on the improvement of successful micrografts in *citrus*. *Comptes-Rendus-de-l'Academie-des-Sciences, III Sciences-de-la-Vie*, 305, 45-49.
24. Juárez, J., Camarasa, E., Ortega, C., Ortega, V., Arregui, J. M., Cambra, M., Llácer, G. & Navarro, L. (1992). Recovery of virus-free almond plants by shoot-tip grafting *in vitro*. *Acta-Horticulturae*, 309, 393-400.
25. Navarro, G., Llacer, M., Cambra, M., Arregui, J. M. & Juarez, J. (1982). Shoot tip grafting *in vitro* for elimination of viruses in peach plants. (*Prunus persica* Batsch). *Acta Horticulturae*, 130, 185-192.
26. Nasiri, Sh., Bernard, F., Shaker, H. & Khavari Nejad, R. (2004). Navarro L. Roistacher C.N. and Murashige T. (1975). Improvement of shoot tip grafting in *vitro* for virus-free Citrus. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 100, 471-479.
27. Okpani, S. N. & Ezeukwa, G. C. (1981). Inflammatory and antipyretic action of *Azadirachta indica*. *Planta Medica*, 41, 34-39.
28. Onay, A., Pirinç, V., Işikalan, C., Adiyaman, F., Tilkat, E. & Başaran, D. (2003). *In vivo* and *in vitro* micrografting of pistachio, *Pistacia vera* L. Cv. "Siirt". *Turkish Journal of Biology*, 27, 95-100.
29. Onay, A. Pirinç, V. Yildirim, H. & Basaran, D. (2004a). *In vitro* micrografting of pistachio *(Pistacia vera* L. Var. Siirt). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 77, 215-219.
30. Onay, A., Pirinc, V., Adiyaman, F., Isikalen, C., Tilkat, E. & Basaren, D. (2004b). *In vivo* and *in vitro* micrografting of pistachio (*Pistacia vera* L. cv. 'Siirt'). *Turkish Journal of Biology*, 27, 95-100.
31. Onay, A., Tilkat, E., Isikalan, C. & Namli, S. (2007). Micrografting of pistachio (*Pistacia vera* L. cv. Siirt). In Mohan Jane, S. & Häggman, H. (Ed.). *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. (pp. 289-298) Springer, Nrtherland.
32. Paiva, L. V., Decarvalho, S. A. & Desouza, M. (1983). Obtaining a virus-free Seleta Folha Murcha through micrografting *in-vitro*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 28(11), 1341-1344.
33. Parthasarathy, V. A., Nagaraju, V. & Rahman, A. A. S. (1997). *In vitro* grafting of *Citrus reticulata* Blanco. *Folia Horticulturae*, 9, 87-90.
34. Parsa, A. A. & Wallace, A. (1980). Differential partitioning of boron and calcium in shoots of seedlings of two pistachio cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, 2, 263-266.
35. Rafail, S. & Mosleh, M. S. (2010). Factors involved in micropropagation and shoot tip grafting of apple (*Malus domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus sp*. L.) World Food System A contribution from Europe, pp: 1-4.
36. Rehman, H. U. & Gill, M. I. S. (2014). In *vitro* shoot tip grafting of Patharnakh (*Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai) pear on Kainth rootstock. *Vegetos*, 27, 363-369.
37. Rehman, H. U. & Gill, M. I. S. (2015). Micrografting of Fruit Crops-A Review. *Journal of Horticulture*, 2, 1-7.
38. Ramanayake, S. M. S. D. & Kovoor, A. (1997). *In vitro* grafting of cashew (*Anacardium occidenta*-leL.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 74, 265-268.
39. Revilla, M. A. Jose, P., Abelardo, C. & Roberto, R. (1996). *In vitro* reinvigoration of mature oil tree (*Olea europaea* L.) Canan Can *et al*. through micrografting. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 32, 257-261.
40. Singh, B., Sharma, S., Rani, G., Hallan, V., Zaidi, A. A., Virk, G. S. & Nagpal, A. (2008). *In vitro* micrografting for production of Indian citrus ring spot virus (ICRSV)-free plants of kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour × *C. deliciosa* Tenora) *Plant Biotechnology Reports*, 2, 137-143.

41. Shahsavar, A. (2004). Comparison of different citrus rootstocks for micrografting. *Journal of the Horticulture Science and Technology*, 5(2), 109-116. (in Farsi)
42. Yıldırım, H., Akdemir, H., Süzerer, V., Ozden, Y. & Ahmet Onay, A. (2013). *In vitro* micrografting of the almond cultivars "TEXAS", "FERRASTAR" and "NONPAREIL". *Agriculture and Envionmental Biotechnology*, 27(1), 3493-3501.
43. Wu, H. C., Toit, E. S. D. & Reinhardt, C. F. (2007). Micrografting of Proteacynaroides. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 89, 23-28.