Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 49, No 2, Summer 2018 (505-514)
DOI: 10.22059/ijhs.2017.224416.1162

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۴۹، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۷ (ص ۵۱۴-۵۰۵)

عامل‌های مؤثر بر موفقیت ریزپیوند *ex vitro* در گیاه لیموترش (*Citrus aurantifolia*) به‌منظور نجات شاخساره‌های بدون ریشه

سعید سهیلی‌وند[۱]، امیر موسوی[۲*]، محمدرضا صفرنژاد[۳]، ناصر فرخی[٤]، مسعود توحیدفر[٥]، محسن مردی[٦] و سید مهدی علوی[۷]

۱، ۲ و ۷. دانشجوی سابق دکتری، دانشیار و استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران

۳. استادیار، مؤسسهٔ تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

٤ و ٥. استادیار و دانشیار، دانشکدهٔ فناوری‌های نوین دانشگاه شهید بهشتی، تهران

٦. دانشیار پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱٦ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/٦/۱)

چکیده

در این تحقیق، پیوند *ex vitro* برای نجات شاخساره‌های بدون ریشهٔ ناشی از کشت بافت و انتقال ژن لیموترش (*Citrus aurantifolia* L.)، انجام و تأثیر عامل‌های مختلفی مانند نوع و اندازهٔ پیوندک، نوع پیوند، شرایط نگهداری گیاهچه‌های پیوندی و استفاده از محیط کشت غذایی در اطراف محل پیوند، بررسی شد. نتایج نشان داد، بهترین بازدهی با استفاده از روش متداول پارافیلم پیچی، در شرایط محیطی کنترل‌شده و با اندازه‌های پیوندک بزرگ‌تر و چوبی‌تر به دست می‌آید. تزریق محلول غذایی در محل پیوندک، در میزان موفقیت پیوند، تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان نداد. ولی کاربرد محیط غذایی MS آگاردار در محل پیوند، در مقایسه با پارافیلم پیچی، موفقیت ریزپیوندی *ex vitro* را بالا برد و نشان داد، می‌تواند به‌عنوان نگه‌دارندهٔ پیوندک روی پایه، محافظ رطوبت پیوندک و تأمین‌کنندهٔ مواد غذایی آن، در روزهای اولیه عمل کرده و در سازگاری تدریجی پیوندک به محیط *in vivo* کمک کند.

واژه‌های کلیدی: پایه، پیوند انتهایی و جانبی، پیوندک، شاخساره، کشت بافت.

Factors affecting successful *ex vitro* micrografting of sour lime (*Citrus aurantifolia*) in order to rescue rootless shoots

Saeed Soheilivand[1], Amir Mousavi[2]*, Mohammadreza Safarnegad[3], Naser Farrokhi[4], Masoud Tohidfar[5], Mohsen Mardi[6] and Seyed Mehdi Alavi[7]

1, 2, 7. Former Ph. D. Student, Associate Professor and Assistant Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

3. Assistant Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

4, 5. Assistant Professor and Associate Professor, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

6. Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

(Received: Jan. 5, 2017 - Accepted: Aug. 23, 2017)

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate factors affecting *ex vitro* micrografting of sour lime (*Citrus aurantifolia* L.) such as size and type of scions, grafting type, micrografted plantlets conditions and usage of nutrient medium, in order to rescue rootless shoots developed form tissue culture or genetically transformed shoots. Our results showed that the optimum efficiency was achieved when bigger and woodier scions were used in conventional grafting method under controlled environmental conditions. Furthermore, soluble nutrients injected into the micrograft did not show significant difference compared with the control. However, the number of successfully *ex vitro* micrografted explants treated with MS medium containing agar was higher than the parafilm covered micrografted explants. MS medium supplemented with agar can act as an additional nutritional source to the micrografted explants during the early days of micrografting. Moreover, it gives better anchorage and humidity support for scions and helps with the gradual acclimatization of them in *in vivo* conditions.

Keywords: Cleft and side grafting, scion, shoot, stock, tissue culture.

* Corresponding author E-mail: m-amir@nigeb.ac.ir

مقدمه

یکی از فن‌های مطرح در کشت بافت گیاهی، ریزپیوندی[1] است. در این فن، پیوندک[2] کوچکی روی پایهٔ[3] بذری و یا گیاهچهٔ ریشه‌دار پیوند می‌شود. از این روش برای تولید گیاهان بدون بیماری‌ها (Jonard *et al*., 1983; Navarro, 1987)، تشخیص بیماری‌های ویروسی و شبه‌ویروسی (Tanne *et al*., 1993)، بررسی ناسازگاری بین پایه و پیوندک و تأثیر فیزیولوژیکی و بافت‌شناختی (هیستولوژیکی) پیوند (Cantos *et al*., 1993; Jonard *et al*., 1990)، جوان‌سازی شاخساره‌های تولیدی درختان بالغ (Huang & Millikan, 1980; Mneney & Mantell, 2001; Onay *et al*., 2004; Pliego-Alfaro & Murashige, 1987)، تولید گیاهان تتراپلوئید (Aleza *et al*., 2009) و به‌عنوان روشی با خطرپذیری پایین برای انتقال و تبادل مواد ذخایر توارثی (ژرم‌پلاسم) گیاهی استفاده می‌شود (Mneney & Mantell, 2001). ریزپیوندی در اصل فنی سودمند و کارآمد برای تکمیل ریزازدیادی برخی گیاهان است. شاید بتوان گفت اهمیت اصلی این روش در نجات جنین‌های ناقص (Raharjo & Litz, 2005)، جوانه‌ها یا شاخساره‌هایی است که با کشت بافت یا انتقال ژن تولید شده اما ریشه‌دار نمی‌شوند (De Pasquale *et al*., 1999; Prakash *et al*., 1999).

در برخی از گونه‌های مرکبات شاخساره‌های باززاشده در کشت بافت و انتقال ژن، به‌ویژه محیط‌های انتخاب‌گر در شرایط تنش (استرس) علف‌کش، پادزیست (آنتی‌بیوتیک)ها و غیره با چالش بقا روبه‌رو می‌شوند. به این صورت که بیشتر این شاخساره‌ها قادر به تولید ریشه نیستند (Dutt & Grosser, 2010). در بین آن‌ها، لیموترش یکی از گیاهان سخت‌ریشه‌زا است (Dutt & Grosser, 2009). بنابراین برای نجات چنین گیاهچه‌هایی بایستی بناچار از فن ریزپیوندی استفاده کرد (Dutt *et al*., 2011). لیموترش از مهم‌ترین درختان میوهٔ نیمه گرمسیری به شمار می‌آید و اهمیت تجاری و جایگاه اقتصادی دارد.

استفاده از فناوری که بتواند درزمینهٔ برطرف شدن این مشکل مؤثر باشد، ضروری به نظر می‌رسد. کاربردی شدن این هدف با استفاده از ریز پیوندی در شرایط کشت درون شیشه‌ای و برون شیشه‌ای امکان‌پذیر است.

پیوندهای متداول در باغبانی به‌طورمعمول در محیط درون زنده‌ای (*in vivo*) انجام می‌شود، ولی ریزپیوندی به‌طورمعمول در محیط درون شیشه‌ای (*in vitro*) و در شرایط خاص صورت می‌گیرد. انجام پیوند در محیط *in vitro* نسبت به *in vivo* به مهارت و دقت بیشتری نیاز دارد. زیرا که اندازهٔ پیوندک کوچک بوده و پیوندک و پایه هر دو باید در شرایط بسیار سترون باشند و تا مرحلهٔ انتقال به خاک این شرایط حفظ شود. بااین‌حال، هرکدام از این پیوندها، باوجود برتری‌های مختلف، نیازها و شرایط خود را می‌طلبد. حفظ رطوبت، کنترل دقیق دما، نور و اجزاء محیط کشت از عامل‌های اصلی موفقیت ریزپیوندی در محیط *in vitro* است. باوجوداین، احتمال آلودگی محیط کشت در هنگام پیوندزنی و هدررفت گیاهچه‌های پیوندی در مرحلهٔ انتقال به خاک و شرایط گلخانه وجود دارد. درحالی‌که در پیوند *in vivo*، هر دو جزء پیوند، یعنی پیوندک و پایه، در شرایط ناسترون و از محیط طبیعی تهیه می‌شود. ایراد اصلی پیوند *in vivo*، نبود اطمینان لازم از پیوندک‌های بدون بیماری است. زیرا منبعی که پیوندک از آن تهیه می‌شود، در فضای آزاد و طبیعی بوده و وابسته به شرایط فصلی و فیزیولوژیکی گیاه‌دهنده است. در مقابل، افزونش از طریق کشت بافت و تولید پیوندک‌های سالم و بدون بیماری و حفظ آن‌ها در محیط *in vitro* به‌صرفه‌تر، مطمئن‌تر و همیشه قابل‌دسترس است. نوع دیگری از پیوند وجود دارد که *ex vitro* نامیده می‌شود. در این روش پیوندک‌های تولیدشده در شرایط *in vitro* به پایه‌هایی که در شرایط *in vivo* رشد کرده‌اند پیوند می‌شود (Raharjo & Litz, 2005). این روش برتری‌های هر دو روش پیش را داشته و بسیاری از ایرادهای آن‌ها را ندارد. بااین‌حال بهینه کردن پیوند *ex vitro* دشوار است. ولی با بهینه شدن این روش می‌توان بدون نیاز به ریزپیوندی در محیط *in vitro* و درگیر شدن با دشواری‌های آن، شاخساره‌های تولیدشده در محیط *in vitro* را به شرایط طبیعی و محیط *in vivo* منتقل و سازگار کرد.

1. Micrografting
2. Scion
3. Stock

طویل‌سازی و ریشه‌زایی شاخساره‌های باززاشدهٔ مرکبات در محیط انتخابی دو دشواری بنیادین در انتقال ژن به مرکبات است که باعث می‌شود بناچار از فن ریزپیوندی استفاده شود. هدف از این تحقیق بهینه‌سازی پیوند *ex vitro* برای لیموترش بود. برای این منظور از دو نوع ریزنمونهٔ میانگرهٔ تولیدی از ریزازدیادی و شاخساره‌های تولیدی از باززایی محور بالایی لپه (اپی کوتیل)[1]، با اندازه‌های مختلف به‌عنوان پیوندک استفاده شد. همچنین برای کوتاه کردن فرایند، افزون بر محیط کنترل‌شدهٔ اتاقک رشد، گلخانه نیز به‌کار رفت. در برخی از منبع‌ها به اهمیت تیمارهای غذایی در میزان موفقیت ریزپیوندی اشاره شده است (Pathirana & McKenzie, 2005; Rafail & Mosleh, 2010). در این تحقیق، کاربرد محیط غذایی MS مایع و آگاردار، به‌عنوان عاملی برای بالا بردن موفقیت ریزپیوندی *ex vitro* بررسی شد که تابه‌حال استفاده از محیط غذایی MS آگاردار، در شرایط برون شیشه‌ای (*ex vitro*) گزارش نشده است. محیط غذایی آگاردار، به‌عنوان نگه‌دارندهٔ پیوندک روی پایه، محافظ رطوبت پیوندک، تأمین‌کنندهٔ مواد غذایی آن در روزهای اولیه و کمک به سازگاری تدریجی پیوندک، به محیط *in vivo*، در انواع پیوندهای *ex vitro* انتهایی[2] و جانبی[3] بررسی شد.

مواد و روش‌ها

سترون کردن بذر لیموترش و تهیهٔ ریزنمونه

ضدعفونی مناسب بذرها، برای تهیهٔ ریزنمونه از دانهال‌ها در محیط *in vitro*، اهمیت ویژه‌ای دارد. بذرهای لیموترش از منطقهٔ جهرم گردآوری شد. ضدعفونی آن‌ها، بدین‌صورت بود که حدود ده دقیقه در وایتکس تجاری (حاوی محلول هیپوکلریت سدیم ۵/۵ درصد)، به‌اضافه چند قطره Tween-20 قرارگرفته و به‌آرامی تکان داده شدند. سپس پس از یک‌بار شستشو با آب مقطر سترون، توسط اتانول ۷۰درصد، دوباره به مدت یک دقیقه ضدعفونی شدند. درنهایت با آب مقطر سترون سه بار شستشو شده و روی کاغذ واتمن، خشک شدند. بذرهای ضدعفونی‌شده به شمار ۸-۵ عدد در هر پتری دیش کشت شدند تا پس از ظهور گیاهچه‌های بذری، ریزنمونه‌های محور بالای لپه و میانگره از آن‌ها به‌دست آیند (Mukhtar *et al.*, 2005). بذرها در محیط پایهٔ ½MS به همراه ۸ گرم در لیتر آگار و ۲ درصد ساکروز قرار داده شدند.

القای شاخه‌زایی از ریزنمونه‌های میانگره برای افزونش و ریزازدیادی

ریزنمونهٔ میانگره برای ریزازدیادی به‌کار رفت و افزونش شاخساره‌ها در محیط کشت پایهٔ MS با ۸ گرم در لیتر آگار و ۳ درصد ساکروز، به همراه هورمون BAP[4] در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر انجام شد. استفاده از BAP تنها به‌طورمعمول برای افزونش و ریزازدیادی مرکبات معمول است (Mojtahedi *et al.*, 2008). برای طویل سازی شاخساره‌ها، پس از گذشت دو هفته، نمونه‌ها در محیط MS، دارای ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر GA_3[5]، واکشت شدند. از شاخساره‌های جدید دوباره میانگره تهیه و شاخساره‌های جدیدتر با همین روش تولید شدند. این روش باعث تولید مداوم شاخساره‌ها شده و تداوم ریزازدیادی لیموترش را تضمین کرد.

برای القاء شاخه‌زایی و تولید جوانه از محور بالای لپه، ترکیب هورمونی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌کار برده شد. ترکیب BAP با NAA در انتقال ژن به مرکبات به‌کاررفته است (Marques *et al.*, 2011; Tallón *et al.*, 2013).

تهیهٔ پیوندک از شاخساره‌ها

در این تحقیق دو نوع ریزپیوندک از دو نوع شاخساره برای *ex vitro* بررسی شد. شاخساره‌های تولیدی از میانگره‌ها که تنومندتر و چوبی‌تر بودند و از ریزازدیادی به‌دست‌آمده بودند (شکل a-۱) و در مقابل شاخساره‌های باززاشده از محور بالای لپه که آبدارتر و لطیف‌تر بودند (شکل b-۱). این نوع شاخساره‌ها، به‌طورمعمول در فرایند انتقال ژن استفاده می‌شوند.

1. Epicotyl
2. Cleft grafting
3. Side grafting
4. Benzylaminopurine
5. Gibberellic acid

آماده‌سازی دانهال به‌عنوان پایه

بذرهای لیموترش در مخلوطی از خاک، پرلیت و گیاخاک (۱:۱:۱) سترون، در عمق ۱-۲ سانتی‌متری در گلدان کشت شدند. گلدان‌ها برحسب نوع آزمایش در گلخانه یا اتاقک رشد قرار داده شدند و هر سه روز یک‌بار آبیاری شدند. پس از ظهور دانهال‌ها و در مرحلهٔ ۳-۵ برگی به‌عنوان پایه برای پیوند *ex vitro* استفاده شدند.

چون پیوندک‌ها از محیط *in vitro* به محیط *in vivo* منتقل می‌شدند، افزون بر تنش ناشی از پیوند، تحت‌فشارهای محیطی *in vivo* نیز قرار می‌گرفتند. بنابراین افزون بربستن با پارافیلم، در همهٔ آزمایش‌ها پوشش شفافی روی گیاه پیوندشده بود و این درپوش شفاف هر روز با پاشش (اسپری) آب، مرطوب نگه‌داشته شد.

روش‌ها و تیمارهای پیوند *ex vitro*

چندین آزمایش برای بالا بردن میزان موفقیت در پیوند *ex vitro* لیموترش انجام شد، که به ترتیب آورده شده است.

بررسی تأثیر اندازهٔ پیوندک بر میزان موفقیت پیوند *ex vitro* در شرایط گلخانه

پیوندک‌های این آزمایش از شاخساره‌های باززاشده از محور بالای لپه تهیه شدند. طول آن‌ها در دو گروه، بین ۱۰-۵ میلی‌متر و بین ۱۵-۱۱ میلی‌متر، در نظر گرفته شد. همهٔ برگ‌ها برای جلوگیری از تبخیر، حذف شدند و قسمت زیرین آن‌ها به شکل V برش داده شد. نمونه‌ها تا زمان پیوند درون محلول غذایی MS قرار داده شدند، تا از تبخیر و آسیب رسیدن به آن‌ها جلوگیری شود. دانهال‌های ۵-۳ برگی که قطر حدود ۲-۱/۵ میلی‌متر داشتند، برای پیوند *ex vitro* انتخاب شدند. جوانهٔ انتهایی به همراه ۲-۳ برگ همراه آن به‌صورت افقی با تیغ حذف و یک شکاف متناسب با طول V شکل پیوندک، به‌طور عمودی روی پایه‌ها ایجاد شد. ارتفاع پایه‌ها از سطح خاک حدود ۴-۳ سانتی‌متر بود. پیوندک به‌آرامی درون شکاف قرارگرفته و با نوار پارافیلم همهٔ طول محل پیوند بسته شد (شکل c-۱). گیاهان پیوندی در شرایط گلخانه در سایه و با رطوبت بالا قرار داده شدند، به‌طوری‌که نور مستقیم خورشید بر آن‌ها نتابد.

بررسی تأثیر تزریق محلول غذایی MS در محل پیوند

در این آزمایش سعی شد، تا تأثیر محلول غذایی در محل پیوند بررسی شود. چون پیوندک تولیدی از ریزازدیادی میانگره از محیط *in vitro* تهیه می‌شد، فرض بر این گذاشته شد، تا هنگامی‌که ارتباط بین پایه و پیوندک برقرار شود، ارائهٔ محلول غذایی در محل پیوندک باعث کم کردن تنش و حفظ آب و مواد غذایی پیوندک خواهد شد. به همین خاطر از پیوندک‌های قوی تولیدی از ریزازدیادی با اندازهٔ بین ۱۵-۱۱ میلی‌متر استفاده شد. همانند آزمایش پیش، پیوند از نوع انتهایی بوده و توسط نوار پارافیلم بسته شد. نمونه‌های گیاهی به دو قسمت تقسیم‌شده و شماری به‌عنوان شاهد و برای دیگر محلول غذایی MS، توسط سرنگ انسولین تزریق شد. به‌غیراز تیمار تزریق محلول غذایی، شرایط محیطی و نگهداری برای هر دو گروه برابر بود. محلول غذایی هر دو روز یک‌بار به مدت دو هفته در محل پیوند تزریق می‌شد. مواد تشکیل‌دهندهٔ محلول غذایی به‌دقت مانند مواد غذایی MS استفاده‌شده در *in vitro* بود با این تفاوت که بدون آگار و هورمون بود.

بررسی اثر نوع پیوندک و محل نگه‌داری گیاهان پیوندی

در این آزمایش تأثیر دو عامل "شرایط نگهداری گیاهان پیوندی" و "نوع پیوندک" با هم به‌صورت فاکتوریل ۲×۲ بررسی شد. از لحاظ شرایط نگهداری، مقایسه‌ای بین گلخانه و اتاقک رشد انجام شد. تا بتوان تصمیم بهتری در انتخاب محل نگهداری گیاهان پیوندی با توجه به نتایج آزمایش گرفت. گیاهان مستقر در اتاقک رشد در شرایط دمای ۲±۲۲ درجه، و رطوبت نسبی ۵±۹۰ و با شدت نور ۴۰ $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ و در شرایط رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. برای عامل دوم دو نوع پیوندک تولیدی از "ریزازدیادی میانگره" و "شاخساره‌های باززاشده از محور بالای لپه" با اندازهٔ بین ۱۵-۱۱ میلی‌متر در نظر گرفته شد. نوع پیوند انتهایی بود و محل پیوند توسط پارافیلم بسته شد.

شکل ۱. مرحله‌های مختلف ریزپیوندی *ex vitro*: a) شاخساره‌های تولیدی از ریزنمونهٔ میانگره (ریزازدیادی)، b) شاخساره‌های باززاشده از ریزنمونهٔ محور بالای لپه، c) بستن محل پیوند توسط پارافیلم، d) پوشاندن محل پیوند با محیط کشت MS آگاردار، e) پیوند انتهایی با استفاده از محیط کشت MS آگاردار پس از گذشت دو هفته، f) پیوند مجاورتی با استفاده از محیط کشت MS آگاردار پس از گذشت دو هفته، g) پیوند موفق با تشکیل پینه بین پیوندک و پایه، h) برش عرضی مقطع پیوند، i) تشکیل ناقص پینه در پیوند جانبی که با فلش مشخص‌شده است. قسمت بدون پینه با دو فلش مشخص است.

Figure 1. Different stages of *ex vitro* micrografting: a) shoot from internodes explant (micropropagation), b) shoot regeneration from epicotyl explant, c) graft wrapping with parafilm, d) graft covering with agar MS medium, e) cleft grafting by using agar MS medium after 2 weeks, f) side grafting by using agar MS medium after 2 weeks, g) successful graft by callus formation between scion and rootstock, h) cross-section of the graft union, i) partial callus (single arrow) and no callus (double arrow) formation on the side grafting.

بررسی تأثیر محیط غذایی آگاردار بر میزان موفقیت ریزپیوندی

در حین اجرای آزمایش‌های پیشین مشخص شد که چون پیوندک‌های تولیدی از باززایی محور بالای لپه ضعیف‌تر و آبدار بودند. اغلب در هنگام پارافیلم پیچی دچار آسیب شده و از بین می‌رفتند. به همین خاطر آزمایشی طراحی شد که از محیط غذایی MS آگاردار به‌عنوان نگه‌دارندهٔ محل پیوند و همچنین تأمین‌کنندهٔ آب و مواد غذایی برای پیوندک استفاده شود و مقایسه‌ای با روش پارافیلم پیچی انجام شود (شکل d-۱). این آزمایش در اتاقک رشد انجام شد و شرایط نگهداری همانند آزمایش پیش بود. برای جلوگیری از خشک شدن محیط غذایی آگاردار، هرروز چند قطره محلول MS در محل پیوند و روی محیط کشت، اضافه می‌شد. پیوندک‌ها از قطعه‌های شاخساره‌ای تولیدی از باززایی محور بالای لپه و با اندازهٔ بین ۱۵-۱۱ میلی‌متر به دست آمد. مقدار آگار در سه سطح ۶، ۷ و ۸ گرم در لیتر استفاده شد.

در ادامه، با استفاده از روش محیط غذایی آگاردار، آزمایشی برای مقایسهٔ دو نوع پیوند مجاورتی و انتهایی، با اندازه‌های مختلف پیوندک (بین ۱۰-۵ میلی‌متر و بین ۱۵-۱۱ میلی‌متر) در قالب فاکتوریل ۲×۲ انجام شد.

محاسبات آماری

نتایج پس از گذشت سه هفته و پس از رشد اولیهٔ جوانه‌ها یادداشت‌برداری شد. هر آزمایش در سه تکرار انجام شد و هر تکرار ۱۲ پیوند *ex vitro* داشت. نتایج برحسب شمار پیوندهای موفق برحسب درصد محاسبه و توسط نرم‌افزار آماری SAS تجزیه شد. مقایسهٔ میانگین‌ها توسط روش دانکن و در سطح معنی‌دار ۵ و ۱ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

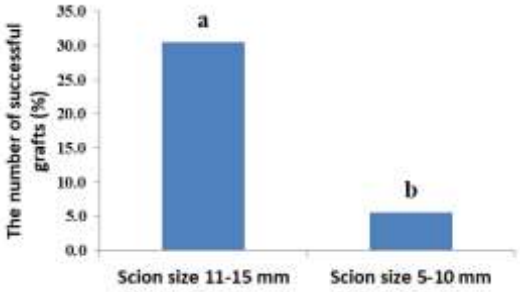
بررسی تأثیر اندازهٔ پیوندک بر میزان موفقیت پیوند *ex vitro* در شرایط گلخانه

نتایج نشان داد، اندازهٔ پیوندک بر میزان موفقیت پیوند در سطح ۵ درصد تأثیر مثبت و معنی‌داری دارد (شکل۲). موفقیت پیوندک‌های با اندازهٔ ۱۵-۱۱ میلی‌متر ۳۰/۶ درصد بود. درحالی‌که پیوندهایی با پیوندک‌های با اندازهٔ ۱۰-۵ میلی‌متر تنها در حدود ۵/۶ درصد زنده مانده و رشد کردند. اندازهٔ پیوندک، عامل مهمی است که اهمیت ویژه‌ای دارد (Suarez *et al.*, 2005). اندازهٔ پیوندک، رابطهٔ مستقیمی با میزان موفقیت داشت و پیوندک‌های بزرگ‌تر احتمال موفقیت بیشتری داشتند. به‌طوری‌که پیوندک‌های بین ۱۰-۵ میلی‌متر به‌سختی با پارافیلم بسته می‌شد و بیشتر، پس از گذشت یک روز سیاه می‌شد. شاید علت آن در ضعیف بودن پیوندک‌ها بود که با فشار کمی له‌شده و از بین می‌رفت. لازم به یادآوری است که پیوندک‌ها از شاخساره‌های تولیدی از محور بالای لپه بوده و ازلحاظ ساختار لطیف و آبدارتر بودند. نمونه‌های بزرگ‌تر، توسعهٔ بافت‌های چوبی بیشتری داشته و این امر، باعث استحکام آن‌ها می‌شد. دلیل دیگر شاید این باشد که پیوندک‌های بزرگ‌تر، قابلیت تحمل بیشتری نسبت به تغییر محیط و تنش‌های ناشی از آن داشتند. در گیاه پسته *Pistacia vera* با افزایش اندازهٔ پیوندک احتمال موفقیت به‌طور معنی‌داری بالا رفته است (Onay *et al.*, 2004). احتمال دارد، دلیل اصلی آن این باشد که یاخته‌های لایهٔ زایندهٔ (کامبیومی) پیوندک و پایه بهتر می‌توانند باهم در تماس باشند (Singh *et al.*, 2008). در نتایج بررسی دیگری، پیوندک‌های گلابی دارای طول زیر ۰/۵ سانتی‌متر موفقیت کمتری (۳۷ درصد) نسبت به پیوندک‌های با اندازهٔ ۳/۵ (۸۳ درصد) و ۴ سانتی‌متر (۸۰درصد) داشته‌اند (Hassanen, 2013).

بررسی تأثیر تزریق محلول غذایی MS در محل پیوند

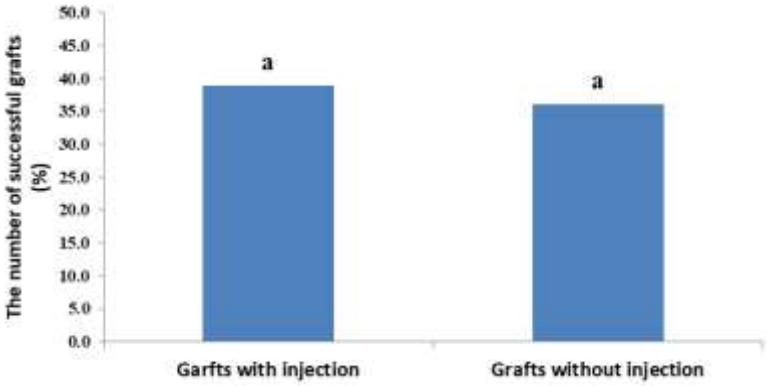
در این تحقیق تفاوت معنی‌داری بین تزریق محلول غذایی MS در اطراف پیوند با نمونه‌های شاهد بدون تزریق مشاهده نشد (شکل ۳). درصد موفقیت در هر دو گروه نزدیک هم بوده و به ترتیب ۳۸/۹ و ۳۶/۱ درصد برای نمونه‌های تزریق‌شده و شاهد بود. میزان رشد و شادابی گیاهچه‌ها با پیوند موفق در هر دو گروه باهم برابر بودند.

تزریق محلول مغذی در ریزپیوندهایی که با پارافیلم بسته‌شده بودند قدری دشوار بود و هدررفت زیادی داشت. در برخی از منبع‌ها در اختیار قرار دادن محیط کشت، تأثیر مثبتی بر میزان موفقیت آن داشته است. به‌طور مثال ورمیکولیت اشباع‌شده با محلول غذایی که انگورهای پیوندی در آن قرار داده شده بودند، در میزان موفقیت تأثیر مثبتی داشته است (Pathirana & McKenzie, 2005).



شکل ۲. تأثیر اندازهٔ پیوندک بر میزان موفقیت پیوند *ex vitro* در شرایط گلخانه (α=0.05)

Figure 2. Effect of scion size on the success rate of *ex vitro* micrograft in greenhouse (α=0.05)



شکل ۳. تأثیر تزریق محلول غذایی MS در محل پیوند
Figure 3. Effect of nutrient solution injection in graft zone

بررسی تأثیر نوع پیوندک و محل نگه‌داری گیاهان پیوندی

برای بررسی وجود اثر متقابل بین نوع پیوندک و محل نگه‌داری گیاهان پیوندی این آزمایش طراحی شده بود. تجزیهٔ داده‌ها نشان داد، تفاوت معنی‌داری بین اثر متقابل وجود ندارد. درحالی‌که در بین ریزنمونه‌ها فارغ از مکان پیوندزنی آن‌ها، اختلاف بسیار معنی‌داری در سطح ۱ درصد مشاهده شد (جدول ۱). به‌طوری‌که پیوندک‌های تولیدی از ریزازدیادی (۴۴/۴ درصد) در مقابل پیوندک‌های تولیدی از باززایی از محور بالای لپه (۱۹/۴ درصد)، موفقیت بیشتری داشتند. همچنین تفاوت بسیار معنی‌داری در سطح ۱ درصد بین محل نگهداری در اتاقک رشد (۴۳/۱ درصد) و گلخانه (۲۰/۸ درصد) وجود داشت.

شرایط نگه‌داری گیاهان پیوندی تأثیر معنی‌داری بر میزان موفقیت پیوندها داشت. شرایط قابل‌کنترل اتاقک رشد ازلحاظ دما، رطوبت نسبی، مدت روشنایی و تاریکی و حتی مدیریت و مهار آفات و بیماری‌ها، اثر مستقیم و مثبتی بر پیوندها داشت. این عامل مهم، نشان‌دهندهٔ حساسیت بالای پیوند *ex vitro* به شرایط محیطی است که باید نوسان‌های دمایی و رطوبتی کم و قابل‌کنترل داشته باشد (Dutt *et al.*, 2009). با توجه به نتیجهٔ تحقیق، توصیه می‌شود پیوند *ex vitro* در اتاقک رشد انجام شود. هرچند که پیوند در گلخانه باعث کوتاه‌تر شدن مسیر سازگاری گیاه می‌شود. همچنین اختلاف بسیار معنی‌داری بین دو نوع پیوندک وجود داشت. پیوندک‌های تولیدی از شاخساره‌های باززاشده از اپی کوتیل، به دلیل داشتن آب بیشتر و تردتر بودن، در مقابل شرایط گلخانه، بسیار حساس بوده و سریع‌تر آب خود را از دست داده و از بین می‌رفتند. در مقابل پیوندک‌های تولیدی از ریزازدیادی میانگرهٔ قوی‌تر، چوبی‌تر و مقاوم‌تر بوده و در شرایط گلخانه‌ای و اتاقک رشد موفقیت بیشتری داشتند. این نتیجه نشان‌دهندهٔ این است که اگر بتوان شاخساره‌ها را با طویل‌سازی و ترکیب هورمونی مناسب، قوی‌تر و چوبی‌تر کرد، میزان موفقیت به‌طور چشمگیری بالا خواهد رفت.

جدول ۱. تأثیر نوع پیوندک و محل نگه‌داری گیاهان پیوندی در پیوند *ex vitro*
Table 1. Effects of scion types and incubation places of micrografted plants on the success rate of *ex vitro* micrografting

Treatments	Successful grafts (%)
Scion derived from micropropagation	44.4 a**
Scion derived from regeneration	19.4 b
Grafting in growth room	43.1 a**
Grafting in greenhouse	20.8 b
Scion (micropropagation) / in greenhouse	27.8 ns
Scion (regeneration) / in growth room	61.1 ns
Scion (micropropagation) / in greenhouse	13.9 ns
Scion (regeneration) / in growth room	25.0 ns

**: Significant at 0.01probability level, ns: non-significant

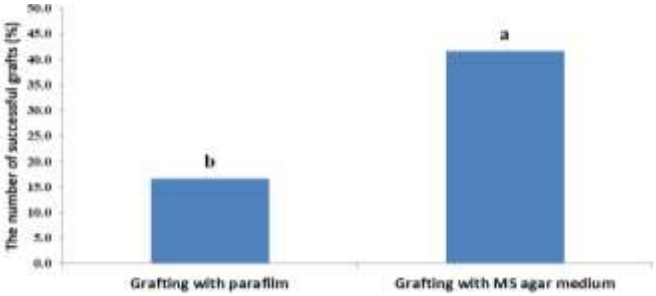
**: اختلاف در سطح (α=0.01)، ns: بدون اختلاف معنی‌دار.

مقایسهٔ تأثیر محیط غذایی آگاردار بر میزان موفقیت ریزپیوندی

در این بررسی، از محیط غذایی MS با غلظت‌های مختلف آگار، در محل پیوند، استفاده شد. نتایج اولیه نشان داد، محیط کشت حاوی ۶ گرم در لیتر آگار، بهترین حالت برای قرار دادن آسان محیط کشت، در اطراف محل پیوند است. زیرا هم انسجام کافی و هم انعطاف لازم برای پوشش محل پیوند داشت. محیط کشت‌های با غلظت بالای آگار، به دلیل سفتی و شکنندگی، قادر به قرارگیری در محل پیوند نبودند. (داده‌ها بیان نشده است). بنابراین محیط کشت MS با ۶ گرم در لیتر آگار برای همهٔ تیمارها استفاده شد. میزان موفقیت این تیمار (۴۱/۷ درصد) در مقایسه با بستن پارافیلم دور محل پیوند (۱۶/۷ درصد)، در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل ۴).

این بررسی در شرایط کنترل‌شدهٔ اتاقک رشد، که نزدیک به شرایط *in vitro* است، صورت گرفته بود. می‌توان علت اصلی را، در حفظ رطوبت پیوندک و سازگاری تدریجی آن، به شرایط محیط *in vivo*، به کمک محیط کشت آگاردار دانست. وجود آگار، باعث انسجام محیط غذایی و در دسترس قرار دادن تدریجی مواد و کم کردن شدت تنش محیطی می‌شود. افزون بر این، پس از خشک شدن آن، ایجاد لایه‌ای نازک در اطراف محل پیوند شده و باعث نگهداری و محافظت آن می‌شود (شکل e-۱). نکتهٔ دیگر در این آزمایش این بود که باوجود اعمال شرایط سترون، آلودگی محیط کشت رخ می‌دهد. این آلودگی‌ها از نوع پوده رست (ساپروفیت) بوده و برای گیاه بیماری ایجاد نمی‌کرد.

برای تشکیل پینهٔ (کالوس) قوی در محل پیوند بایستی رطوبت آن تا هنگام ترمیم کامل از دست نرود (Hussain *et al*., 2014). از مواد گوناگونی برای حفظ رطوبت محل پیوند استفاده می‌شود. به‌طور مثال از محلول غذایی آگاردار، در پیوند سیب و گلابی در *in vitro* استفاده شده است. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد، اضافه کردن محیط کشت آگاردار در محل پیوند تأثیر بسیار معنی‌داری در میزان موفقیت دارند. این میزان در سیب ۷۰ درصد و در گلابی ۶۰ درصد، در مقابل شاهد بدون پوشش غذایی ۱۰ درصد بوده است (Rafail & Mosleh, 2010). ولی در تحقیق دیگری روی گیاه *Protea cynaroides* استفاده از این روش تأثیر معنی‌داری بر میزان موفقیت نداشته است (Wu *et al*., 2007).



شکل ۴. تأثیر محیط غذایی MS آگاردار در مقابل پارافیلم پیچی بر میزان موفقیت پیوند *ex vitro* (α=0.05)

Figure 4. Effect of MS medium supplamented with agar compared with wrapping with parafilm on the success rate of *ex vitro* micrografting

جدول ۲. تأثیر اندازهٔ پیوندک و نوع پیوند در موفقیت پیوند *ex vitro* (با استفاده از محیط غذایی MS آگاردار در محل پیوند)

Table 2. Effect of scion size and grafting type on the success of *ex vitro* micrgrafting (Graft zone was treated with MS medium supplemented with agar)

Treatments	Successful grafts (%)
Scion size 11-15 mm	31.9 ns
Scion size 5-10 mm	26.4 ns
Cleft grafting	51.4 a**
Side grafting	6.9 b
Scion size 11-15 mm / side grafting	11.1 ns
Scion size 11-15 mm / cleft grafting	52.8 ns
Scion size 5-10 mm / side grafting	2.8 ns
Scion size 5-10 mm / cleft grafting	50 ns

**: Significant at 0.01probability level, ns: non-significant.

**: اختلاف در سطح (α=0.01)، ns: بدون اختلاف معنی‌دار.

تیمار محل پیوند با محیط غذایی MS حاوی آگار، به‌جای بستن با پارافیلم، چنین امیدی را داد که بتوان پیوندک‌های کوچک و نرم را که با پارافیلم آسیب می‌بینند، در محیط *in vivo*ی تحت کنترل، بر پایه‌های بذری پیوند زد. در این آزمایش هر دو اندازهٔ پیوندک بین ۱۰-۵ میلی‌متر و بین ۱۵-۱۱ میلی‌متر، در ترکیب با دو نوع پیوند انتهایی و جانبی با روش محیط غذایی آگاردار بررسی شد (جدول ۲). نتایج نشان داد، در بین اندازه‌های مختلف با استفاده از روش محیط کشت آگاردار تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. پیوندک‌هایی با اندازهٔ ۱۰-۵ میلی‌متر حدود ۳۱/۹ درصد و پیوندک‌هایی با اندازهٔ ۱۵-۱۱ میلی‌متر حدود ۲۶/۴ درصد، پیوند موفق داشتند. نتایج این روش نشان می‌دهد، می‌توان پیوندک‌های به‌نسبت کوچک را نیز همانند پیوندک‌های بزرگ با استفاده از محیط کشت آگاردار روی پایه‌های بذری در شرایط کنترل‌شده *in vivo* پیوند کرد. در مقایسهٔ بین دو نوع پیوند انتهایی با ۵۱/۴ درصد و پیوند جانبی با ۶/۹ درصد موفقیت، اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد مشاهده شد. تجزیهٔ اثر متقابل، اختلاف معنی‌داری نشان نداد.

نتایج نشان داد، می‌توان از محیط غذایی حاوی آگار، برای پیوندک‌های کوچک نیز استفاده کرد. در مقایسهٔ نوع پیوند جانبی و انتهایی، مشخص شد که تنها پیوند انتهایی موفقیت شایان پذیرشی دارد. در این بررسی مشاهده‌ها نشان داد، در پیوند جانبی، تا هنگامی‌که محیط کشت اطراف پیوند مرطوب بود، پیوندک زنده می‌ماند. حتی در برخی موارد جوانه‌های برگی، فعال‌شده و تولید برگ می‌کرد (شکل f-۱). ولی با خشک شدن محیط کشت اطراف محل پیوند، پیوندک نیز خشک می‌شد. در پیوند انتهایی پینهٔ تشکیل‌شده، به‌کلی باعث پیوند بین پیوندک و پایه می‌شد (شکل h-۱ و g-۱) ولی این لایه در پیوند مجاورتی در برخی نواحی ایجاد شده و ضعیف بود (شکل i-۱). بنابراین به نظر می‌رسد، پیوند جانبی با این روش برای *ex vitro* مناسب نبوده و می‌توان از پیوند انتهایی به‌جای آن استفاده کرد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج این تحقیق، استفاده از محیط کشت MS حاوی آگار در اطراف محل پیوند، افزون بر حفظ و تأمین رطوبت، شرایطی را برای پیوندک فراهم می‌کند که در روزهای نخست، از مواد مغذی محیط تغذیه کند. همچنین کمک می‌کند تا در برابر تنش شرایط *in vivo* مقاومت بیشتری داشته باشد. این عامل‌ها در کل، باعث بالا رفتن میزان موفقیت در پیوند *ex vitro* می‌شود.

REFERENCES

1. Aleza, P., Juárez, J., Ollitrault, P. & Navarro, L. (2009). Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes. *Plant cell reports*, 28(12), 1837-1846.
2. Cantos, M., Ales, G. & Troncoso, A. (1993). Morphological and anatomical aspects of a cleft micrografting of grape explants *in vitro*. *ISHS Acta Horticulturae*, 388, 135-140.
3. De Pasquale, F., Giuffrida, S. & Carimi, F. (1999). Minigrafting of shoots, roots, inverted roots, and somatic embryos for rescue of *in vitro* Citrus regenerants. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(2), 152-157.
4. Dutt, M. & Grosser, J. W. (2009). Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 98(3), 331-340.
5. Dutt, M. & Grosser, J. W. (2010). An embryogenic suspension cell culture system for *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. *Plant Cell Reports*, 29(11), 1251-126.
6. Dutt, M., Orbovic, V. & Grosser, J. W. (2009). Cultivar dependent gene transfer into citrus using *Agrobacterium*. In: Proceedings of *the Florida State Horticultural Society*, 122, 85-89.
7. Dutt, M., Vasconcellos, M. and Grosser, J. (2011). Effects of antioxidants on *Agrobacterium*-mediated transformation and accelerated production of transgenic plants of Mexican lime (*Citrus aurantifolia* L. Swingle). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107(1), 79-8.
8. Hassanen, S. A. (2013). *In vitro* grafting of pear (*Pyrus* spp.). *World Applied Sciences Journal*, 21(5), 705-709.
9. Huang, S. C. & Millikan, D. (1980). *In vitro* micrografting of apple shoot tips, *HortScience*, 15(6), 741-743.
10. Hussain, G. M., Wani, M., Rather, M. Z. & Bhat, K. (2014). Micrografting for fruit crop improvement. *African Journal of Biotechnology*, 13(25), 2474-2483.

11. Jonard, R., Hugard, J., Macheix, J., Martinez, J., Mosella-Chancel, L., Poessel, J. L. & Villemur, P. (1983). *In vitro* micrografting and its applications to fruit science. *Scientia Horticulturae*, 20(2), 147-159.
12. Jonard, R., Lukman, D., Schall, F. & Villemur, P. (1990). Early testing of graft incompatibilities in apricot and lemon trees using *in vitro* techniques. *Scientia horticulturae*, 43(1), 117-128.
13. Marques, N. T., Nolasco, G. B. & Leitão, J. P. (2011). Factors affecting *in vitro* adventitious shoot formation on internode explants of *Citrus aurantium* L. cv. Brazilian. *Scientia Horticulturae*, 129(2), 176-182.
14. Mneney, E. E. & Mantell, SH. (2001). *In vitro* micrografting of cashew. *Plant cell, tissue and organ culture*, 66(1), 49-58.
15. Mojtahedi, N., Fathi Gharebaba, M. & Zohrabi, M. (2008). *Developing a practical protocol for Mexican (Citrus aurantifolia) and Persian lime (Citrus latifolia)*. Final report of project. Ministry of Jahad-e-Agriculture Research and Education Organization, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, 41p. (in Farsi)
16. Mukhtar, R., Khan, M. M., Rafiq, R., Shahid, A. & Khan, F. (2005). *In vitro* regeneration and somatic embryogenesis in (*Citrus aurantifolia* and *Citrus sinensis*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 7(3), 518-520.
17. Navarro, L. (1987). Application of shoot-tip grafting *in vitro* to woody species. *ISHS Acta Horticulturae*, 227, 43-56.
18. Onay, A., Pirinç, V., Yildirim, H. & Basaran, D. (2004). *In vitro* micrografting of mature pistachio (*Pistacia vera* var. Siirt). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77(2), 215-219.
19. Pathirana, R. & McKenzie, M. J. (2005). A modified green-grafting technique for large-scale virus indexing of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Scientia horticulturae*, 107(1), 97-102.
20. Pliego-Alfaro, F. & Murashige, T. (1987). Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*. *HortScience*, 22(6), 1321-1324.
21. Prakash, O., Sood, A., Sharma, M. & Ahuja, P. (1999). Grafting micropropagated tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze) shoots on tea seedlings-a new approach to tea propagation. *Plant Cell Reports*, 18(10), 883-888.
22. Rafail, S. & Mosleh, M. (2010). Factors involved in micropropagation and shoot tip grafting of apple (*Malus domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus* sp. L.). *Tropentag, World Food System–A Contribution from Europe*, September: 14-16.
23. Raharjo, S. H. & Litz, R. E. (2005). Micrografting and *ex vitro* grafting for somatic embryo rescue and plant recovery in avocado (*Persea americana*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(1), 1-9.
24. Singh, B., Sharma, S., Rani, G., Hallan, V., Zaidi, A., Virk, G. & Nagpal, A. (2008). *In vitro* micrografting for production of Indian citrus ringspot virus (ICRSV)-free plants of kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour × *C. deliciosa* Tenora). *Plant Biotechnology Reports*, 2(2), 137-143.
25. Suarez, I. E., Schnell, R. A., Kuhn, D. N. & Litz, R. E. (2005). Micrografting of ASBVd-infected Avocado (*Persea americana*) plants. *Plant cell, tissue and organ culture*, 80(2), 179-185.
26. Tallón, C. I., Porras, I. & Pérez-Tornero, O. (2013). High efficiency *in vitro* organogenesis from mature tissue explants of *Citrus macrophylla* and *C. aurantium*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 49(2), 145-155.
27. Tanne, E., Shlamovitz, N. & Spiegel-Roy, P. (1993). Rapidly diagnosing grapevine corky-bark by *in vitro* micrografting. *HortScience*, 28(6), 667-668.
28. Wu, H., Du Toit, E. S. & Reinhardt, C. (2007). Micrografting of *Protea cynaroides*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 89(1), 23-28.