

اثر ژنوتیپ در موفقیت پیوند خزانه‌ای در سه کلون چای

Effect of Genotype on Success of Nursery Grafting in Three Tea Clones

فاضل پورحقوقی^۱، کورش مجدسلیمی^۲ و مهران غلامی^۳

۱ و ۲- به ترتیب محقق و مربی، پژوهشکده چای، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران.

۳- مربی، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱/۲۶

چکیده

پورحقوقی، ف.، مجدسلیمی، ک. و غلامی، م. ۱۳۹۸. اثر ژنوتیپ در موفقیت پیوند خزانه‌ای در سه کلون چای. نشریه علمی یافته‌های تحقیقاتی در گیاهان زراعی و باغی ۸ (۱): ۹۱-۱۰۵.

به منظور دستیابی به فن پیوند خزانه‌ای و تولید نهال‌های پیوندی چای، پژوهشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با نه تیمار و سه تکرار طی دو سال در ایستگاه تحقیقات چای شهید اسلامی لاهیجان اجرا شد. در این آزمایش از سه کلون امیدبخش ۱۰۰، ژنوتیپ انتخابی ۲۰۲۱ و رقم DN (سریلانکایی) به عنوان پایه و پیوندک استفاده شد. پس از پیوند، برخی از صفات کیفی برگ سبز چای مانند پلی فنل کل، میزان فعالیت آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز و درصد پروتئین در نزدیک‌ترین برگ‌ها به محل پیوند در گیاهان پیوندی و غیر پیوندی (شاهد) اندازه‌گیری شد. همچنین اندازه‌گیری صفات کمی مانند ماده خشک، ارتفاع گیاه، تعداد برگ، قطر ساقه و درصد زنده‌مانی پیوند و نهال‌های شاهد پس از پیوند انجام گردید. نتایج نشان داد که بین گیاهان پیوندی و غیر پیوندی از نظر درصد زنده‌مانی برای تولید نهال، درصد پلی فنل کل و آنزیم پلی فنل اکسیداز اختلاف معنی‌داری وجود داشت به طوری که درصد زنده‌مانی نهال‌های قلمه‌ای در همه موارد بیشتر از نهال‌های پیوندی بود. در بین ترکیبات پیوندی، پیوند 100/DN (پایه DN و پیوندک ۱۰۰) با ۵۶٪ بیشترین درصد زنده‌مانی را داشت. از نظر درصد ماده خشک، ارتفاع گیاه، تعداد برگ و قطر ساقه بین گیاهان پیوندی و غیر پیوندی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین مقدار پلی فنل کل مربوط به گیاهان پیوندی 100/2021 (پایه ۲۰۲۱ و پیوندک ۱۰۰) به میزان ۱۳/۷٪ و کمترین مقدار نیز مربوط به قلمه‌های ریشه‌دار کلون ۱۰۰ به میزان ۱۰/۴٪ بود. بیشترین مقدار پروتئین مربوط به گیاهان پیوندی DN/2021 (پایه ۲۰۲۱ و پیوندک DN) به میزان ۱۳/۵٪ و کمترین مقدار آن نیز مربوط به گیاهان غیر پیوندی DN به میزان ۹٪ بود.

واژه‌های کلیدی: چای، پیوند خزانه‌ای، اثر متقابل پایه و پیوندک، ترکیبات بیوشیمیایی.

مقدمه

چای (*Camellia sinensis* L.) درختچه‌ای دائمی و دگرگشن است که ازدیاد آن به صورت جنسی و غیرجنسی انجام می‌شود. تفاوت‌های زیادی در جمعیت‌های بذری چای دیده می‌شود و عکس‌العمل ژنوتیپ‌ها نسبت به شرایط متفاوت محیطی، یکسان نیست به طوری که مقاومت ژنوتیپ‌های چای در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده متفاوت است (۲۵). به طور معمول، ازدیاد ژنوتیپ‌های ایده‌آل چای (کلون‌ها) با استفاده از قلمه‌زدن انجام می‌شود اما استفاده از فن پیوندزدن (Grafting) برای تولید گیاهان پیوندی (Composite Plant) روشی رایج در دانش باغبانی است و اغلب برای کاهش دوره‌ی نونهالی، کوتاه کردن برنامه‌ی اصلاحی، بهبود کیفیت، افزایش عملکرد و افزایش تحمل به تنش‌های محیطی و مقاومت به انتقال عوامل بیماری‌زا انجام می‌شود (۲۵). پیوندزدن همچنین به علت کاهش آلودگی به پاتوژن، کاهش حساسیت به بیماری‌های ریشه و افزایش عملکرد به دلیل توان بیشتر گیاه پیوندی به طور گسترده‌ای به کار می‌رود (۱۴ و ۲۱). با توجه به ساختار ژنتیکی چای که بسیار هتروزیگوت است، تولید گیاهان پیوندی به کمک پیوندک تک‌گره، امکان ترکیب صفات مطلوب مانند مقاومت به خشکی، مقاومت به بیماری و مقاومت به نماتد ریشه را فراهم می‌نماید. با این حال، یکی از مشکلات در توسعه‌ی گیاهان پیوندی، ناسازگاری بین

کلون‌های مطلوب است. لذا مطالعات ابتدایی برای غربال کردن طیف گسترده‌ای از پایه‌ها از نظر سازگاری با پیوندک‌های مطلوب و سپس ترکیب نمودن کلون‌های پرمحصول با کلون‌های متحمل یا مقاوم به تنش‌ها توصیه می‌شود (۱۲).

اکثر برنامه‌های اصلاحی چای مبتنی بر گزینش، به طور عمده در ارتباط با شناسایی بوته‌های پرمحصول انجام شده است. در میان کلون‌های شناسایی شده برخی از کلون‌هایی که دارای محصول متوسط هستند، با توجه به سیستم ریشه‌های عمیق‌تر خود می‌توانند در برابر شرایط نامساعد آب و هوایی مقاومت نموده و به عنوان پایه‌های ایده‌آل برای پیوند کلون‌های پرمحصول روی آنها مورد استفاده قرار گیرند. بر این اساس، فقط کلون‌هایی که به عنوان پایه‌های قوی دارای صفات مطلوبی مانند مقاومت به خشکی باشند، می‌توانند تولید مستمر شاخساره‌های رویشی را حتی در طول دوره تنش رطوبتی، تضمین نمایند (۱۷).

با توجه به اهمیت شناخت اساس بیوشیمیایی پیوند و ارتباط آن با نمود ظاهری سازگاری پایه و پیوندک، برقراری ارتباط بین اجزای فوق می‌تواند کاربران را در انتخاب صحیح ژنوتیپ‌ها و نیز پیش‌بینی موفقیت پیوند راهنمایی کرده و مانع از اتلاف وقت و هزینه گردد. از آنجا که پیوندزدن باعث استرس متابولیک و پاسخ بافت‌ها از طریق القای متابولیسم آنتی‌اکسیدانتی می‌شود، لذا ارزیابی تغییرات فعالیت آنزیم‌های

به دست آمد که به طور معنی داری بالاتر از بقیه ترکیبات بود. هم چنین زیست توده تولیدی این پیوندها در مقایسه با TRF-1 پیوند نشده، ۴۰ درصد بیشتر بود. موفقیت پیوند خزانه‌ای TRF-2 نیز روی پایه‌های ATK-1 و UPASI-9 به ترتیب ۸۶ و ۸۶/۶۷ درصد گزارش شد که به طور معنی داری بالاتر از بقیه ترکیبات بود. زیست توده تولیدی این پیوندها هم در مقایسه با TRF-2 پیوند نشده، ۲/۵ برابر بیشتر بود. کل زیست توده، رشد شاخساره و رشد ریشه در پیوند UPASI-28 روی پایه UPASI-9 در مقایسه با UPASI-28 پیوند نشده، بیشتر بود (۲۱).

تحقیق حاضر با هدف شناسایی و معرفی پایه و پیوندک‌های سازگار و هم چنین دستیابی به شناخت و درک مناسبی از روابط بیوشیمیایی بین پایه و پیوندک و ارتباط برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی با درصد زنده ماندن نهال‌های پیوندی به منظور معرفی شاخص‌های غیرمستقیم پیش‌گویی درصد موفقیت در روش پیوند زدن کلون‌های چای انجام شده است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با نه تیمار و سه تکرار طی دو سال در خزانه‌های تکثیر ایستگاه تحقیقات چای شهید اسلامی لاهیجان انجام شد. مواد گیاهی این تحقیق عبارت بودند از: ۱- رقم کلونی DN: وارداتی از کشور سریلانکا، با عملکرد متوسط،

آنتی اکسیدانت پلی فنل اکسیداز (PPO) و پراکسیداز (POD) و اندازه‌گیری میزان کل فنل‌ها و پروتئین و ارتباط آن با درصد زنده‌مانی گیاهچه‌های چای، می‌تواند در انتخاب صحیح پایه و پیوندک موثر باشد. تحقیقات نشان داده است که آسیب به بافت‌ها ناشی از پیوند زدن و بازسازی بخش پیوند شده، ممکن است به تغییرات فعالیت آنزیم‌ها یا مولکول‌های دیگری که با پتانسیل آنتی اکسیدانتی مرتبط هستند، وابسته باشد (۶).

نتایج تحقیقات در کنیا نشان داد که عملکرد کلون‌های چای می‌تواند به طور قابل ملاحظه‌ای با پیوند روی پایه‌های مناسب افزایش یابد و بهترین ترکیبات پایه و پیوندک باعث افزایش معنی دار عملکرد نسبت به گیاهان قلمه‌ای شود. در این آزمایش اثر متقابل پایه و پیوندک معنی دار بود، اما همه کلون‌ها پاسخ مثبتی به پیوند (حتی روی بهترین پایه‌ها) نشان ندادند. اثر پیوند سبب افزایش تعداد شاخساره‌های قابل برداشت شد اما تغییر کمی در وزن متوسط شاخساره‌ها مشاهده شد. هم چنین پیوند اثر کمی روی کیفیت چای تولیدی داشت (۲۶).

مطالعه‌ای در زمینه اثر پیوند خزانه‌ای ۳ کلون (TRF-2, TRF-1, UPASI-28) به عنوان پیوندک روی چهار کلون دیگر (ATK-1, UPASI-9, UPASI-2, TRI-2025) به عنوان پایه نشان داد که درصد زنده‌مانی و موفقیت پیوند خزانه‌ای TRF-1 روی پایه‌های ATK-1 و UPASI-9 به ترتیب ۸۶ و ۸۲ درصد

در نظر گرفته شد. پس از انجام پیوند، محل اتصال پیوندها توسط نوار پلی اتیلنی به دقت پوشانده و به طور کامل محافظت شد. سپس پایه‌های پیوند شده مانند قلمه‌های معمولی با فاصله‌ی ۱۵ × ۱۵ سانتی‌متر در خزانه‌ها کشت شدند.

به منظور ایجاد شرایط مناسب رشد در خزانه‌ها از پوشش چتایی در تابستان (سایه‌بان) و برای جلوگیری از سرمازدگی در پاییز و زمستان از پوشش پلاستیکی استفاده شد. میزان رطوبت و دمای محیط خزانه به کمک دماسنج و رطوبت‌سنج کنترل گردید. برای تامین رطوبت مورد نیاز در خاک و محیط از سامانه‌ی آبیاری مه‌پاش استفاده شد. آبیاری بر اساس تخلیه‌ی رطوبت به میزان ۱۸ درصد کل آب قابل دسترس در بستر کشت انجام شد. بافت خاک در بستر کشت خزانه از نوع لوم مخلوط با خاک برگ و به ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر بود. تغذیه‌ی گیاهان بر اساس آزمون خاک و پس از چهار برگی شدن به صورت محلول‌پاشی با کودهای اوره و ریز مغذی‌ها انجام گرفت.

در این آزمایش صفات کمی نظیر درصد زنده‌مانی، تعداد برگ، ارتفاع گیاه، قطر ساقه و ماده‌ی خشک نزدیک‌ترین برگ به محل پیوند اندازه‌گیری شد. سنجش صفات کیفی مانند مقدار کل پلی‌فنل‌ها به روش طیف‌سنجی با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر به روش ISO 14502-1 (۱۶)، مقدار پروتئین کل به روش برادفورد (۴) و سنجش

قدرت ریشه‌دهی بالا، مقاومت زیاد به خشکی و نماتد مولد زخم ریشه، میانگین مقدار تانن حدود ۱۶ درصد و ماده‌ی خشک حدود ۲۳ درصد. ۲- کلون انتخابی ۲۰۲۱: میانگین طول میانگره حدود پنج سانتی‌متر، میانگین ۲۸ عدد شاخساره در هر مترمربع، میانگین وزن ۵۲ گرم برای ۱۰۰ عدد شاخساره، میانگین مقدار تانن حدود ۱۵/۵ درصد و ماده‌ی خشک حدود ۲۱ درصد. ۳- کلون امید بخش ۱۰۰: عملکرد برگ سبز استاندارد (دو برگ و یک جوانه) در حدود ۵/۵ تن در هکتار، میانگین امتیاز کیفیت ۱۴ از ۲۰ در آزمون حسی چای، میانگین طول میانگره چهار سانتی‌متر، میانگین ۴۱ عدد شاخساره در هر مترمربع، تعداد ۵ تا ۷ دور برداشت در سال، میانگین مقدار تانن حدود ۱۵/۵ درصد و ماده‌ی خشک حدود ۲۲ درصد. تیمارهای پیوندی (پایه و پیوندک) در جدول ۱ آورده شده است.

از هر تیمار ۵۰ نمونه تهیه و به صورت تصادفی در بستر خزانه‌ها در جهت شرقی- غربی در تیر ماه کشت شد. برای پیوند به روش اسکنه‌ای سبز با استفاده از پیوندک گوه‌ای شکل به طول ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر (که از دو طرف برش داده شد) روی ساقه‌ی ۲/۵ سانتی‌متری پایه استفاده شد (شکل ۱). برش‌ها طوری صورت گرفت که برگ‌های پایه و پیوندک به موازات هم قرار گیرند. با توجه به اهمیت برقراری تماس کامل بین لایه‌ی زاینده پایه و پیوندک، قطر پایه و پیوندک هم اندازه

جدول ۱- تیمارهای پیوندی

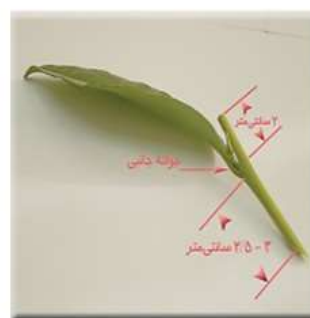
تیمار	پایه	پیوندک
۱	2021	100
۲	100	2021
۳	DN	100
۴	100	DN
۵	DN	2021
۶	2021	DN
۷	قلمه کلون امیدبخش ۱۰۰	
۸	قلمه کلونی DN سریلانکایی	
۹	قلمه کلون انتخابی ۲۰۲۱	



۳- عمل پیوند



۲- پایه و پیوندک آماده



۱- پایه آماده



۶- نهال‌های پیوندی



۵- پیوندک جوانه زده



۴- بستن محل پیوند

شکل ۱- نمایش مراحل انجام پیوند اسکنه سبز در کلون‌های چای

روی نمونه‌های تهیه شده از نزدیک‌ترین برگ به محل پیوند در تیمارهای تحت آزمایش در سال دوم و به شرح زیر انجام شد:
تهیه‌ی عصاره: به منظور آماده‌سازی عصاره

فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز به روش آدام و همکاران (۲) و پلی‌فنل اکسیداز به روش هوآنگگ و همکاران (۱۰) به روش اسپکتروفتومتری انجام شد. آزمایش‌های کیفی

برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها و پروتئین کل از بافر استخراج پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار استفاده شد سپس مقدار ۰/۵ گرم برگ از هر نمونه تهیه و به آن ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج افزوده شد و عملیات استخراج روی یخ انجام گردید. نمونه‌ها در داخل دستگاه سانتریفوژ به مدت ۲۰ دقیقه با چرخش ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. اندازه‌گیری پروتئین کل: اندازه‌گیری پروتئین کل با استفاده از عصاره تهیه شده و معرف رنگی کوماسی برلیانت بلو G-250 در اتانول ۹۵ درصد و ارتوفسفریک اسید ۸۵ درصد انجام شد (۴). از پروتئین آلبومین گاوی به‌عنوان پروتئین استاندارد برای رسم منحنی استاندارد استفاده گردید و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد و غلظت پروتئین کل بر اساس مقایسه با منحنی استاندارد، محاسبه و بر حسب میلی‌گرم در گرم بافت تازه در تجزیه داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت (۱۶).

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD): برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش آدام و همکاران (۲) با کمی تغییرات استفاده شد. از ضریب خاموشی $26/6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ برای محاسبه فعالیت آنزیمی استفاده شد و میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز بر حسب واحد آنزیمی در گرم بافت تازه (هر واحد آنزیمی عبارت است از مقداری از آنزیم که سبب افزایش یک صدم درصد جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر در

هر دقیقه می‌شود) محاسبه شد (۱۹). سنجش پلی‌فنل اکسیداز (PPO): برای سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز از روش هوانگ و همکاران (۱۰) با کمی تغییرات استفاده شد. در این روش میزان فعالیت آنزیم با در نظر گرفتن ضریب خاموشی $0/001 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ بر حسب واحد آنزیمی در گرم بافت تازه محاسبه شد (۱۹).

اندازه‌گیری‌های خزانه‌ای نیز شامل اندازه‌گیری‌های ارتفاع گیاه، قطر ساقه و تعداد برگ‌ها در پایان فصل رشد در سال دوم انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها، مقایسه میانگین‌ها به روش LSD در سطح احتمال ۵٪ و مقایسات گروهی تیمارها به کمک نرم افزار آماری SAS انجام گرفت.

نتایج و بحث

صفات کمی

نتایج تجزیه واریانس صفات کمی (جدول ۲) نشان داد که بین گیاهان پیوندی و غیرپیوندی (قلمه به عنوان شاهد) از نظر درصد زنده‌مانی اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد. از نظر تعداد برگ، قطر ساقه، ارتفاع گیاه و درصد ماده‌ی خشک، اختلاف معنی‌داری بین گیاهان پیوندی و غیرپیوندی وجود نداشت (جدول ۲). بیشترین تعداد برگ (۱۱/۵ برگ) در نهال‌های غیرپیوندی کلون امیدبخش ۱۰۰ و کمترین تعداد برگ (۴/۸ برگ) مربوط به گیاهان

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات کمی نهال‌های پیوندی و غیر پیوندی مورد آزمایش

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		زنده‌مانی (%)	قطر ساقه (mm)	تعداد برگ	ارتفاع نهال (cm)
بلوک	۲	۵۶۸/۴۴ ^{ns}	۲/۱۵۱ ^{ns}	۳۸/۰۲۱ ^{ns}	۵۸۹/۵۶ ^{ns}
تیمار	۸	۱۶۱۹/۳۳ ^{**}	۱/۴۳۰ ^{ns}	۱۰/۱۳۶ ^{ns}	۱۴۴/۰۶ ^{ns}
خطا	۱۶	۱۵۱/۲۷۹	۱۱/۴۶۴	۱۰/۱۰۴	۱۲۵/۸۹۹
درصد ضریب تغییرات		۲۰/۹۷	۲۰/۴۱	۴۱/۳۴	۴۹/۲۸

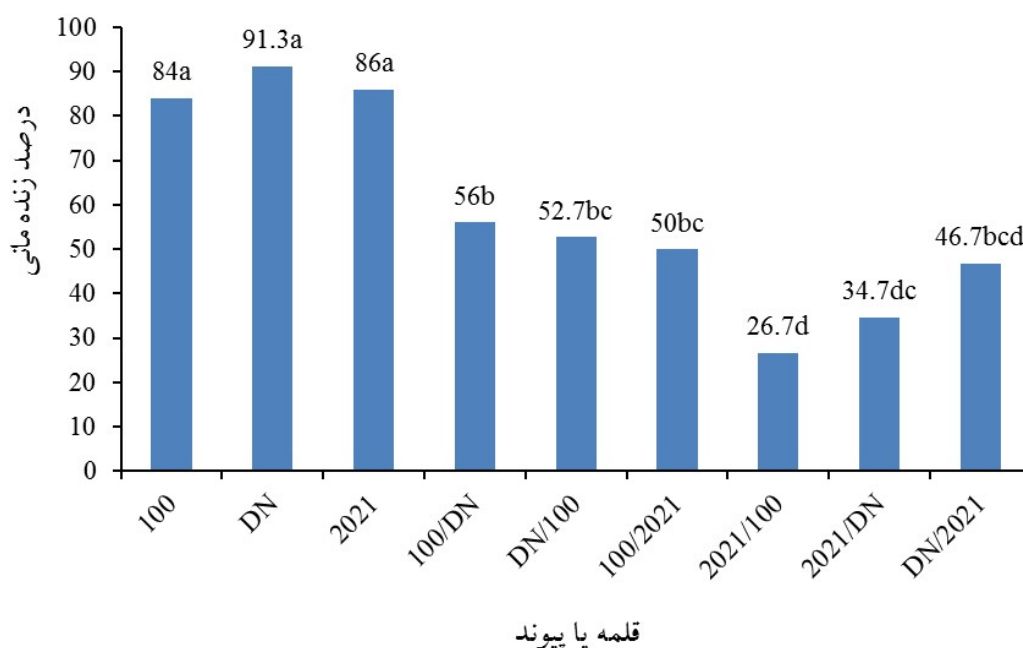
* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.
ns: غیر معنی‌دار.

معنی‌داری وجود نداشت، در صورتی که درصد زنده‌مانی پیوندها با هم تفاوت معنی‌داری داشتند. مقایسه میانگین درصد زنده‌مانی پیوندهای مختلف (شکل ۲) نشان داد که پیوندهای 100/DN و DN/100 به ترتیب با ۵۶/۰ و ۵۲/۷ درصد بیشترین درصد زنده‌مانی را نسبت به سایر ترکیبات پیوندی داشتند.

در یک پژوهش انجام شده، درصد زنده‌مانی پیوند اسکنه چای در خزانه برابر ۹۰٪ گزارش شده است (۳)، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که کلون‌های چای امیدبخش ۱۰۰ و DN، پایه و پیوندک مناسبی برای یکدیگر بوده و سازگاری خوبی برای پیوند موفقیت‌آمیز نشان می‌دهند. نتایج این تحقیق مشخص نمود که درصد زنده‌مانی (درصد موفقیت) پیوند در چای، کمتر از درصد زنده‌مانی قلمه‌های معمولی یا شاهد بوده است. عدم ایجاد ارتباط منظم بین آوندها به دلیل تشکیل پریدرم در پارانشیم و قرار گرفتن لایه‌ی زاینده در جایگاهی غیرطبیعی، مانع از جوش خوردن کامل پایه و پیوندک

پیوندی 2021/DN (پایه DN و پیوندک 2021) بود، هر چند این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود. معنی‌دار نشدن اختلاف ارتفاع بین گیاهان پیوندی و غیر پیوندی نشان داد که تفاوت ژنتیکی گیاهان پایه و پیوندک و اثر متقابل آن‌ها روی ارتفاع گیاهان پیوندی در سال‌های ابتدایی رشد تاثیرگذار نبوده است. تحقیقات نشان داده است که گیاهان پیوندی چای حاصل از پیوند TRI-2023 روی CY9 و TRI-2026 روی DN به ترتیب در مقایسه با گیاهان غیر پیوندی TRI-2023 و TRI-2026 ارتفاع کمتری داشتند، اما اختلافی از نظر تعداد برگ نداشتند (۱۲).

بر اساس نتایج مقایسه میانگین تیمارها (شکل ۲) درصد زنده‌مانی (گیرایی) قلمه‌ها در همه موارد بیشتر از پیوندها بوده است اما درصد زنده‌مانی قلمه‌های کلون‌ها نسبت به هم تفاوت معنی‌داری نداشتند. کلون DN با ۹۱/۳٪ دارای زنده‌مانی بیشتری نسبت به سایر کلون‌ها بود اما در بین کلون‌ها از نظر درصد زنده‌مانی تفاوت



شکل ۲- مقایسه میانگین درصد زنده‌مانی نهال‌های پیوندی و غیر پیوندی چای

نزدیک‌تر کرد.

هم‌چنین مقایسه گروهی بین پایه‌ها و پیوندک‌ها (جدول ۳) نشان داد که در نظر گرفتن کلون امید بخش ۱۰۰ به عنوان پایه باعث کاهش درصد زنده‌مانی نهال‌های پیوندی و انتخاب ژنوتیپ ۲۰۲۱ باعث افزایش درصد زنده‌مانی نهال‌های پیوندی شد. مقایسه ارتوگونال بین تیمارهای مختلف (جدول ۳) نشان داد که پیوندک کلون DN نسبت به پیوندک دو کلون دیگر تاثیر بیشتری روی تولید نهال‌های پیوندی داشت. در نظر گرفتن این کلون به عنوان پیوندک برای دو کلون دیگر باعث افزایش درصد زنده‌مانی نهال‌های تولیدی شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که دو کلون ۱۰۰ و DN سازگاری بیشتری برای تولید

می‌شود (۲۰، ۲۲ و ۲۳).

علاوه بر سازگاری ژنتیکی پایه و پیوندک، عواملی مانند خشبی بودن شاخه‌ها، نوع برگ از نظر بلوغ، نحوه‌ی برش پایه و شکاف در پیوندک، اندازه‌ی قطر پایه و پیوندک، نحوه‌ی بستن محل پیوند با نوار پلی‌اتیلنی و مهارت فرد در پیوندزدن در ایجاد این تفاوت‌ها، تاثیر چشمگیری دارند، به طوری که هرچه عملیات پیوند با دقت بیشتری انجام شود و ساقه‌ی پایه و پیوندک به حالت نیمه خشبی نزدیک‌تر و برگ‌ها نیز بالغ‌تر (غیرلطیف و غیرخشبی) باشند، درصد زنده‌مانی بیشتر خواهد بود. بنابراین با دقت در انتخاب نوع شاخه و عملیات پیوند و شرایط نگهداری می‌توان درصد زنده‌مانی پیوند را به درصد زنده‌مانی قلمه‌ها

جدول ۳- مقایسه ارتوگونال صفات کمی بین تیمارهای مختلف

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		ماده خشک	زنده ماننی	قطر ساقه	تعداد برگ
تیمار	۸				
قلمه‌ها VS پیوندها	۱	۱۰/۵۳۴ ^{ns}	۱۰۹۹۲/۷ ^{**}	۵/۳۵۲ ^{**}	۲۴/۸۱ ^{ns}
پایه ۱۰۰ VS سایر پایه‌ها	۱	۵/۰۲۵ ^{ns}	۶۵۸/۸ [*]	۰/۳۶۰ ^{ns}	۱۰/۳۵ ^{ns}
DN پایه VS سایر پایه‌ها	۱	۱/۴۱۲ ^{ns}	۲۴۵/۴۴ ^{ns}	۰/۶۴۰ ^{ns}	۱/۰۳۴ ^{ns}
پایه ۲۰۲۱ VS سایر پایه‌ها	۱	۱/۱۱۰ ^{ns}	۱۷۰۸/۴۴ ^{**}	۱/۹۶۰ ^{ns}	۱۷/۹۲۱ ^{ns}
پیوندک ۱۰۰ VS سایر پیوندک‌ها	۱	۵/۷۲۰ ^{ns}	۲۰۵/۴۴ ^{ns}	۰/۴۲۳ ^{ns}	۰/۰۰۷ ^{**}
DN پیوندک VS سایر پیوندک‌ها	۱	۸/۷۳۱ ^{ns}	۷/۱۱۱ [*]	۰/۰۹۰ ^{ns}	۹/۶۱۸ ^{ns}
پیوندک ۲۰۲۱ VS سایر پیوندک‌ها	۱	۰/۲۵۲ ^{ns}	۱۳۶/۱۱ ^{ns}	۰/۱۲۲ ^{ns}	۱۰/۳۴۷ ^{ns}
خطا	۱۷	۳/۸۴۹	۱۵۱/۲۷۹	۱۱/۴۶۴	۱۰/۱۰۴

* و **: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.
ns: غیر معنی دار.

نهال‌های پیوندی داشتند.

مقایسه ارتوگونال ($\alpha=1\%$) نشان داد (جدول ۳) که در نظر گرفتن کلون ۱۰۰ به عنوان پیوندک، تعداد برگ نهال‌های پیوندی را افزایش می‌دهد. نتایج این پژوهش از نظر تعداد برگ با نتایج تحقیقات انجام شده در سریلانکا (۱۲) مطابقت داشت اما نتایج این دو پژوهش از نظر ارتفاع گیاه با هم متفاوت بودند. لذا می‌توان نتیجه گرفت که یک تنوع متمایز و مشخص در سازگاری کلونی برای برخی صفات در پیوند خزانهای وجود دارد. با وجود اختلاف غیرمعنی دار قطر ساقه بین گیاهان پیوندی و غیرپیوندی، این اختلاف در سطح احتمال ۱۰ درصد معنی دار بود و گیاهان غیرپیوندی شاهد از نظر قطر ساقه تفاوت‌هایی با یکدیگر و هم‌چنین با گیاهان پیوندی داشتند. محققان چای در سریلانکا با پیوند کلون

چای Cr-6017 روی UPASI-9 گزارش کردند که از نظر قطر ساقه بین گیاهان پیوندی و غیرپیوندی Cr-6017 تفاوت معنی داری وجود داشت؛ به طوری که قطر ساقه گیاهان پیوندی نسبت به غیرپیوندی افزایش یافته بود اما بین گیاهان پیوندی Cr-6017 و غیرپیوندی UPASI-9 تفاوت معنی دار وجود نداشت (۳). در پژوهش حاضر، بین گیاهان پیوندی و غیرپیوندی از نظر درصد ماده خشک تفاوت معنی داری وجود نداشت (جدول ۲) که این نتیجه با یافته‌های گزارش شده از تحقیقات مشابه در سریلانکا (۳) متفاوت بود. در سریلانکا، پیوند کلون چای Cr-6017 روی UPASI-9 منجر به افزایش درصد ماده خشک (سه برگ و یک جوانه) در گیاهان پیوندی نسبت به گیاهان غیر پیوندی گردید (۳). در این پژوهش مقدار ماده خشک در نزدیک‌ترین برگ به محل پیوند

اندازه‌گیری شد، این مسئله را می‌توان دلیل اصلی اختلاف نتایج دو تحقیق دانست.

صفات کیفی

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴) نشان داد که در بین صفات کیفی اندازه‌گیری شده فقط از نظر فعالیت آنزیم پراکسیداز تفاوت معنی‌داری بین نهال‌های پیوندی و غیر پیوندی وجود نداشت. به عبارت دیگر اثر متقابل پایه روی پیوندک بر فعالیت آنزیم پراکسیداز موثر نبود (جدول ۴). پراکسیدازها از جمله آنزیم‌هایی است که وظیفه اکسیداسیون پراکسید هیدروژن را برعهده دارند و ممکن است فعالیت بیشتری

برای حذف رادیکال‌های آزاد تشکیل شده پس از پیوند و نیز فرآیند تشکیل چوب داشته باشند (۸)، اما از نظر مقدار پروتئین تفاوت معنی‌داری با احتمال ۵٪ بین گیاهان پیوندی و غیر پیوندی وجود داشت (جدول ۴). مشاهده شد که بیشترین درصد پروتئین به میزان ۱۳/۵٪ در نهال‌های پیوندی DN/2021 و کمترین مقدار پروتئین به میزان ۹٪ در نهال‌های غیر پیوندی DN وجود داشت (جدول ۵). بین ژنوتیپ‌های پیوندی و غیر پیوندی نیز اختلاف معنی‌دار از نظر فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز (احتمال ۱٪) و درصد پلی‌فنل کل و پروتئین (احتمال ۵٪) مشاهده شد (جدول ۴).

جدول ۴- تجزیه واریانس صفات کیفی نهال‌های پیوندی و غیر پیوندی مورد آزمایش

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		پلی‌فنل اکسیداز	پلی‌فنل کل	پروتئین
بلوک	۲	۰/۱۴۵ ^{NS}	۲/۶۹۹ ^{NS}	۰/۰۰۱ ^{NS}
تیمار	۸	۰/۰۳۲ ^{NS}	۳/۷۵۰*	۰/۰۰۱*
خطا	۱۶	۰/۰۳۳	۱/۳۵۲	۰/۰۰۰۱
درصد ضریب تغییرات		۴۸/۴۳	۹/۸۵	۱۶/۹۹

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.
NS: غیر معنی‌دار.

بیشترین مقدار فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در نهال‌های پیوندی DN/100 (پایه ۱۰۰ و پیوندک DN) وجود داشت (جدول ۵). فعالیت این آنزیم در نهال‌های پیوندی DN/2021 و تفاوتی با فعالیت آنزیم در نهال‌های پیوندی DN/100 نداشت و در یک گروه آماری قرار داشتند. کمترین مقدار این آنزیم در

نهال‌های کلون ۱۰۰ مشاهده شد. از نظر پلی‌فنل کل، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ در بین ژنوتیپ‌های چای مشاهده شد. مقایسه میانگین‌ها (جدول ۵) نشان داد که بیشترین و کمترین درصد پلی‌فنل کل با پیوندی ۱۳/۸ و ۱۰/۳ درصد به ترتیب مربوط به نهال‌های ۲۰۲۱/۱۰۰ و ۲۰۲۱/۱۰۰ بود؛ بنابراین با

جدول ۵- مقایسه میانگین برخی صفات کیفی نهال‌های پیوندی و غیرپیوندی

تیما	پلی فنل اکسیداز (واحد آنزیمی در گرم)	پلی فنل کل (درصد ^a)	پروتئین (میلی گرم در گرم)	
100	۰/۰۹۶۳d	۱۰/۴۲c	۹/۳c	قلمه
DN	۰/۱۶۵c	۱۲/۲۶abc	۹/۰c	
2021	۰/۱۴۲cd	۱۱/۰۰bc	۱۰/۸abc	
100/DN	۰/۱۵۵c	۱۲/۱۱abc	۱۰/۱bc	پیوند
DN/100	۰/۲۵۷a	۱۱/۴۴bc	۱۲/۱abc	
100/2021	۰/۱۸۷bc	۱۳/۷۵a	۱۱/۷abc	
2021/100	۰/۱۸۲bc	۱۰/۲۸c	۱۳/۴ab	
2021/DN	۰/۲۳۳ab	۱۲/۴۸b	۱۳/۱ab	
DN/2021	۰/۲۳۴ab	۱۲/۴۶b	۱۳/۵a	
LSD _{5%}	۰/۰۵۸۲	۲/۰۱۳	۳/۳۵	

^a: مقدار کل پلی فنل بر اساس استاندارد ملی موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به شماره ۱-۸۹۸۶ بر حسب درصد جرمی ماده خشک نمونه پایه محاسبه می‌شود.

محیطی مانند شرایط آب و هوایی، نوع خاک و سن برگ بستگی دارد (۱۵). گزارش شده است که تفاوت معنی‌داری بین مقدار پلی فنل کل گیاهان پیوندی و غیرپیوندی کلون Cr-6017 وجود نداشت، اما مقدار پلی فنل کل در این کلون در مقایسه با گیاهان غیر پیوندی UPASI- 9 بیشتر و تفاوت آنها معنی‌دار بود (۳). مقایسات ارتوگونال (جدول ۶) نشان داد که بین گروه‌های قلمه و پیوند از نظر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. بدین معنی که میزان فعالیت این آنزیم در پایه‌ی ۱۰۰ در مقابل دو پایه‌ی دیگر یا پایه‌ی DN در مقابل دو پایه‌ی دیگر یا پایه‌ی ۲۰۲۱ در برابر دو پایه‌ی دیگر متفاوت می‌باشد اما میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در پیوندک‌ها نشان داد که فقط

پیوند کلون ۱۰۰ روی ۲۰۲۱ میزان پلی فنل کل افزایش می‌یابد. همان‌طوری که در جدول ۵ مشاهده می‌شود با پیوند کلون ۱۰۰ روی پایه ۲۰۲۱ میزان پلی فنل کل افزایش می‌یابد، اما تعویض پایه و پیوندک باعث کاهش میزان پلی فنل کل می‌شود. بر اساس نتایج مقایسات ارتوگونال (جدول ۶)، بین گروه‌های پیوند و قلمه از نظر درصد پلی فنل کل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (در بین گروه‌ها، تیمارهایی با درصد پلی فنل کل مشابه وجود داشت). میزان پلی فنل کل در پایه‌ی کلون ۱۰۰ نسبت به سایر پایه‌ی کلون‌ها و در پیوندک کلون ۱۰۰ نسبت به پیوندک سایر کلون‌ها متفاوت بود. پلی فنل‌ها مهم‌ترین گروه از ترکیبات شیمیایی چای هستند و مقدار آنها در بوته‌ی چای به ژنتیک گیاه چای و به عوامل

جدول ۶- مقایسه ارتوگونال صفات کیفی بین تیمارهای مختلف

میانگین مربعات صفات کیفی				درجه آزادی	منابع تغییرات
پروتئین	پلی فنل کل	پراکسیداز	پلی فنل اکسیداز		
				۸	تیمار
۰/۰۰۴**	۴/۴۴۳ ^{NS}	۰/۰۰۳ ^{NS}	۰/۰۳۲**	۱	قلمه‌ها VS پیوندها
۰/۰۰۲*	۶/۳۹۲*	۰/۰۷۴ ^{NS}	۰/۰۱۲**	۱	پایه ۱۰۰ VS سایر پایه‌ها
۰/۰۰۰۱ ^{NS}	۰/۱۶۹ ^{NS}	۰/۰۹۸ ^{NS}	۰/۰۱۳**	۱	DN پایه VS سایر پایه‌ها
۰/۰۰۱ ^{NS}	۴/۴۸۰ ^{NS}	۰/۰۰۲*	۰/۰۰۱**	۱	پایه ۲۰۲۱ VS سایر پایه‌ها
۰/۰۰۰۱ ^{NS}	۳/۵۱۸**	۰/۰۲۴ ^{NS}	۰/۰۰۱ ^{NS}	۱	پیوندک ۱۰۰ VS سایر پیوندک‌ها
۰/۰۰۰۱ ^{NS}	۰/۳۹۵ ^{NS}	۰/۰۱۰ ^{NS}	۰/۰۰۲ ^{NS}	۱	DN پیوندک VS سایر پیوندک‌ها
۰/۰۰۰۱ ^{NS}	۹/۲۹۲**	۰/۰۰۳ ^{NS}	۰/۰۰۰۱*	۱	پیوندک ۲۰۲۱ VS سایر پیوندک‌ها
۰/۰۰۰۱	۱/۳۵۲	۰/۰۳۳	۰/۰۰۱	۱۷	خطا

* و **: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.
NS: غیر معنی دار.

نهال‌های پیوندی نسبت به پیوندک سایر کلون‌ها داشت. مطالعات محققان ترکیبات پایه و پیوندک انگور، افزایش بطنی محتوای پروتئین در سومین روز پس از پیوند را نشان داده است و پس از آن، کاهش شدید تا ششمین روز ادامه داشت. محتوای پروتئین، شش روز پس از پیوند به‌طور قابل ملاحظه‌ای تغییر نکرد (۱۱). هم‌چنین تغییرات در فعالیت آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز ممکن است به تاثیر پایه‌ها از طریق جذب و انتقال آب، مواد مغذی و هورمون‌های گیاهی ارتباط داشته باشد. ترکیبات فنولیک، فعال‌کننده‌های کاتالاز، POD و PPO هستند که به‌عنوان بازدارنده‌ها و تحریک‌کننده نیز شناخته می‌شوند (۱۱).

اگر چه بین گروه‌های قلمه و پیوند از نظر فعالیت آنزیم پراکسیداز تفاوت معنی‌داری وجود نداشت، اما فعالیت این آنزیم در پایه کلون ۲۰۲۱ نسبت به سایر کلون‌ها متفاوت بود

پیوندک کلون ۲۰۲۱ نسبت به سایر پیوندک‌ها متفاوت بود. گزارش شده است که میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در کلون‌ها و در اندام‌های مختلف گیاه جای متفاوت است و مقدار این آنزیم در برگ‌های مسن و خشبی حدود ۷٪ بوده و کمتر از مقدار آن در برگ‌های جوان با حدود ۱۶/۵٪ می‌باشد (۱).

مقایسات ارتوگونال بین گروه‌های پیوند و قلمه از نظر درصد پروتئین نیز تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نشان داد. میزان پروتئین در تمامی نهال‌های پیوندی بیشتر از نهال‌های غیر پیوندی بود و به‌نظر می‌رسد که واکنش متقابل پایه و پیوندک باعث افزایش میزان پروتئین در نهال‌های پیوندی شده است (جدول ۶).

نتایج مربوط به مقایسه میانگین صفات کمی (جدول ۵) هم‌چنین نشان داد که پیوندک کلون ۱۰۰ تاثیر کمتری در افزایش مقدار پروتئین

سپس کاهش یافته است و دامنه این تغییرات در گیاهان پیوند شده زیاد بود. هم‌چنین فعالیت این سه آنزیم در گیاهان پیوند شده، بالاتر از گیاهان غیر پیوندی گزارش شد و تفاوت آنزیم‌ها در میان گیاهان با سه روش پیوند، کمتر بود (۲۴). گزارش شده است که تیره‌شدن ناحیه پیوندشده (تشکیل ترکیبات ملانیک) پس از پیوند به علت اکسیداسیون ترکیبات فنلی به کوئینون‌ها و سمی کوئینون‌ها، ناشی از فعالیت آنزیم‌هایی نظیر پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز است (۵ و ۲۸).

توصیه ترویجی

در برخی از مواقع که امکان تولید نهال برتر چای با استفاده از روش‌های اصلاحی امکان‌پذیر نمی‌باشد می‌توان از طریق پیوند خزانه‌ای برای رسیدن به نهال مطلوب (مانند متحمل به خشکی، آفات و بیماری‌ها و دارای عملکرد کمی و کیفی بالا) اقدام نمود. برای این کار لازم است قبل از عمل پیوند صفات مورد نظر مورد تایید و گواهی باشند. در ضمن به منظور کاهش تلفات در تولید نهال‌های پیوندی یا افزایش درصد گیرایی پیوند لازم است برخی از آزمایش‌های بیوشیمیایی که در انجام پیوند موفقیت آمیز و تولید گیاهچه‌های چای نقش دارند، انجام شود تا با پیش‌بینی میزان موفقیت پیوند از اتلاف وقت و هزینه‌ها جلوگیری گردد.

روش پیوند خزانه‌ای یکی از روش‌های تولید نهال‌های چای مرغوب از نظر کمی و

(جدول ۶). مطالعات نشان می‌دهند که تغییرات کم فعالیت پراکسیداز ممکن است نشان دهنده سازگاری پایه و پیوندک و بقای گیاهان پیوندی باشد (۲۶). در تحقیق دیگری روی انواع روش‌های پیوند در گیاه گوجه‌فرنگی، بالاترین فعالیت پلی‌فنل اکسیداز، ۱۲ روز بعد از پیوند به وجود، هرچند که تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد (۶).

نتایج متفاوتی از تغییرات میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در ارتباط با سازگاری پیوند در گیاهان مختلف گزارش شده است. مطالعات نشان دادند که پیوندک نخود روی پایه نخود و آکاسیا باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه پیوندی شده است (۱۳). اگرچه افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در پیوندهای ناسازگار در مقایسه با پیوندهای سازگار گزارش شده است (۷)، اما محققان افزایش معنی‌داری را در فعالیت این آنزیم در مطالعه پیوند نهال به و گلابی مشاهده نکرده‌اند (۹). نتایج این پژوهش با یافته‌های تحقیق بر روی پیوند به و گلابی (۹) مطابقت و با نتایج پیوند نخود (۱۳) و پیوند فلفل و گوجه‌فرنگی (۷) مغایرت داشت. به نظر می‌رسد یک دلیل مهم برای توجیه نتایج غیرمشابه تحقیقات می‌تواند به علت تفاوت در مقدار فعالیت آنزیم پراکسیداز در کلون‌ها و اندام‌های متفاوت نهال‌های گیاهان متفاوت باشد.

نتایج مطالعه پیوند در گیاه کدو نشان داد که فعالیت POD، PPO و PAL در ابتدا افزایش

هم‌چنین کلون DN نیز می‌تواند پایه و پیوندک خوبی برای کلون ۱۰۰ باشد. با توجه به اینکه کلون DN از کلون‌های مقاوم به خشکی است، توصیه می‌شود از کلون DN به‌عنوان پایه این ترکیب استفاده شود زیرا کلون ۱۰۰ از نظر عملکرد کمی و صفات کیفی کلون مناسبی است ولی از نظر مقاومت به تنش خشکی ضعیف است.

کیفی می‌باشد که در این آزمایش برای اولین بار در شرایط آب و هوایی مناطق چای کاری شمال کشور انجام شده است. بر اساس نتایج این تحقیق کلون‌های امیدبخش ۱۰۰ و DN پایه و پیوندک مناسبی برای یکدیگر بوده و سازگاری خوبی برای پیوند موفقیت‌آمیز نشان دادند. بر این اساس کلون ۱۰۰ می‌تواند به‌عنوان پایه و پیوندک مناسبی برای کلون DN استفاده شود.

منابع

- ۱- معزی، غ. ۱۳۸۸. چای در گذر زمان: بیوشیمی و تکنولوژی فراوری چای از آغاز تاکنون. تهران. نشر علمی آبیان. ۳۵۰ صفحه.
2. Adam, J. W., Nellson, C. I. and Sharp, R. E. 1992. Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall activity in genotypes differing in length of the elongation zone. *Plant Physiol.* 99: 872-878.
 3. Balasubramanian, L., Natto, A. and Parathira, j. S. 2010. Unique graft combination of tea, Cr-6017/UPASI-9. *Curr. Sci.* 98(11): 1508-1517.
 4. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
 5. Constabel, C. P. and Barbehenn, R. 2008. Defensive roles of polyphenol oxidase in plants, induced plant resistance to herbivory. pp: 253-270. In: Schaller A (ed) *Induced plant resistance to herbivory.* Dordrecht, Springer Netherlands.
 6. Da Silva, E. S., de Menezes, D. V. and da Silva, E. G. 2016. Different methods of grafting and activity of antioxidant enzymes in tomato. *Agrária - Revista Brasileira de Ciências Agrárias.* 11(4): 267-271.
 7. Deloire, A. and Hebant, C. 1982. Peroxidase activity and lignification at the interfase between stock and scion of compatible and incompatible grafts of *Capsicum* on *Lycopersicum*. *Ann. Bot.* 49: 887-891.
 8. Fernández-García, N., Carvajal, M. and Olmos, E. 2004. Graft union formation in tomato plants: peroxidase and catalase involvement. *Ann. Bot.* 93(1): 53-60.
 9. Gulen, H., Polat, M., Celik, M. and Eris, A. 2005. Cambial isoperoxidases related to graft compatibility in pear-quince graft combinations. *Turk. J. Agric. For.* 29: 83-89.
 10. Huang, Y., Sheng, J., Yang, F. and Hu, Q. 2007. Effect of enzyme inactivation by microwave and oven heating on preservation quality of green tea. *J. Food Eng.* 78(2): 687-692.
 11. Jogaiah, S., Maske, S. R. and Upadhyay, A. 2014. Rootstock induced changes in enzymes activity and biochemical constituents during break in 'Thompson Seedless' grapevine. *Vitis.* 53 (2): 57-64.
 12. Kathiravetpillai, A. 1988. Stock-Scion relationships in clonal tea. Pp: 165-172. In: *Proceedings of the Regional Tea (Scientific) Conference: 19-21 Jan. BMICH, Colombo, Sri Lanka.*

13. **Kawaguchi, M. and Taji, A. 2005.** Anatomy and physiology of graft incompatibility in sturt, pea (*Swaainsona Formosa*), an Australian native plant. In: international symposium on new floricultural crops ISHS. Acta Hort. 683.
14. **Lee, J. M., Kubota, C., Tsao, S. J., Hoyos Echevarria, P., Morra, L. and Oda, M. 2010.** Current status of vegetable grafting: diffusion, grafting techniques, automation. Sci. Hort. 127 (2): 93-105.
15. **Mulky M. J. and Sharma, V. S. 1993.** Tea culture: processing and marketing, Bomby: Oxford and IBH. 355 p.
16. **Nimal Punyasiri, P. A., Jeganathan, B., Dananjaya Kottawa-Arachchi, J., Mahasen, A. B., Ranatunga, I., Sarath, B., Abeysinghe, M., Kumudini Gunasekare, T. and Rathnayake and Bandara, B. M. 2015.** New sample preparation method for quantification of phenolic compounds of tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze): A polyphenol rich plant. Journal of Analytical Methods in Chemistry. [http:// dx.doi. org/ 10. 1155/2015/964341](http://dx.doi.org/10.1155/2015/964341).
17. **Pallemulla, D., Shanmugarajah, S. and Kathiravetpillai, A. 1992.** Effect of grafting fresh cuttings on yield and drought resistance in tea. Sri Lanka J. Tea Sci. 61 (2): 45-50.
18. **Pourcel, L., Routaboul, J. M., Cheynier, V., Lepiniec, L. and Debeaujon, I. 2006.** Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. T. Plant Sci.12 (1): 29-36.
19. **Ramkumar, S., Suresh kumar, P., Sudhakar, G., Anitha, J., Geetha, S., Mohankumar, P. and Kanniappan Gopalakrishnan, V. 2016.** Biochemical and molecular analysis of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze tea from the selected P/11/15 clone. J. Genet. Eng. Biotechnol. 14: 69-75.
20. **Ramos, D. E. 1998.** Walnut Production Manual. University of California. 316 p.
21. **Ranjith, K., Victor, J. and Ilango, R. 2014.** Evaluation of certain tea clones as scions for nurse grafting in tea (*Camellia* Spp.). International Symposium on Plantation Crops. Kozhikode, Kerala.
22. **Rongting, X. 1993.** A study on the uniting process of walnut grafting and the factors affecting. Acta Hort. 311:160-172.
23. **Rongting, X. and Pinghai, D. 1990.** Theory and practice of walnut grafting. Acta Hort. 284: 69-89.
24. **Stanisavljevic, M. and Mitrovic, M. 1997.** Effect of variety on successful grafting and development of nursery trees of walnut. Acta Hort. 442: 281-283.
25. **Tahardi, J. S., Riyadi, I. and Dodd, W. A. 2003.** Enhancement of somatic embryo development and plant let recovery in *Camellia sinensis* by temporary liquid immersion. J. Bioteknolo. Pertan. 8: 1-7.
26. **Telles, C. A., Biasi, L. A., Mindêllo Neto, U. R., Deschamps, C. 2009.** Fenóis totais Peroxidase e suas relações com a compatibilidade de mudas de pessegueiro interenxertadas. Ciência Agrotecnol. 33 (1):86-9.
27. **Tuwei, G., Kaptich, F. K. K., Langat, M. C., ChomboI, K. C. and Corley, R. H. V. 2008.** Effects of grafting on tea 1. Growth, Yield and Quality. Exp. Agric. 44 (4): 521-535.
28. **Ze-sheng, Y., Yao-guo, Q. and Yan-hui, H. 2008.** Effects of Graft on Activities of Three Protective Enzymes of Bitter Gourd under Waterlogging. Northera Hort. 12: 69.