10.22092/rafhc.2021.121461.1131

مقاله ترویجی

نشریه علمی یافته‌های تحقیقاتی در گیاهان زراعی و باغی
جلد ۹، شماره ۱، سال ۱۳۹۹

مطالعه اثر محیط کشت و تنظیم‌کنندهٔ رشدی در ریزپیوندی برخی از ارقام گیلاس

Effect of culture media and growth regulators on micrografting of some sweet cherry cultivars

محمد اسماعیل نداف[۱]، ابراهیم گنجی مقدم[۲]، غلامرضا ربیعی[۳] و عبدالرحمن محمدخانی[۴]

۱- دانشجوی دکتری، اصلاح و فیزیولوژی میوه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۲- دانشیار، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران.
۳ و ۴- به ترتیب، استادیار و دانشیار، گروه علوم باغبانی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۴

چکیده

اسماعیل نداف، م.، گنجی مقدم، ا.، ربیعی، ع. ر. و محمدخانی، ع. ۱۳۹۹. مطالعه اثر محیط کشت و تنظیم‌کنندهٔ رشدی در ریزپیوندی برخی از ارقام گیلاس. **نشریه علمی یافته‌های تحقیقاتی در گیاهان زراعی و باغی ۹ (۱): ۷۸- ۶۷.**

ریزپیوندی، روشی جدید برای تکثیر یک گیاه کامل جهت ایجاد باغ‌های سالم می‌باشد. این مطالعه با هدف بررسی تاثیر محیط کشت و وجود تنظیم کنندهٔ رشدی بر ریزپیوندی تعدادی از ارقام گیلاس در شرایط درون شیشه‌ای در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی در مرکز تحقیقات کشاورزی خراسان رضوی در طی سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۶ انجام شد. ریزپیوندی با پیوندک‌های مریستمی از هفت رقم گیلاس به عنوان فاکتور اول روی پایه "گزیلا ۶" به روش اسکنه در چهار تیمار مختلف محیط کشت و تنظیم‌کننده رشدی به عنوان فاکتور دوم انجام شد. گیاهان ریزپیوندی، ابتدا برروی محیط‌های مختلف تیماری استقرار یافتند. بعد از سه هفته، نمونه‌ها جهت ریشه‌زایی به محیط MS با یک میلی‌گرم در لیتر ایندول ۳- بوتیریک اسید (IBA) و برای سازگاری به بستر پرلیت/ پیت موس با نسبت برابر منتقل شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که برای همه شاخص‌های ریزپیوندی در بین تیمارها، ارقام (به جز شاخص زمان گیرایی) و اثرات متقابل رقم در تیمار اختلاف معنی دار وجود داشت. بین تیمارها، تیمار محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین (BA) دارای بیشترین درصد موفقیت پیوند (۳۹ درصد)، تعداد برگ (۴/۷)، رشد طولی (۶/۲ سانتی‌متر) و زمان شروع گیرایی پیوند (۳/۲ روز) بود و در بین ارقام، رقم گیلاس "حاج یوسفی" برای شاخص درصد موفقیت پیوند (۳۵/۴ درصد) و رشد طولی (۵ سانتی‌متر)، رقم گیلاس "سیاه مشهد" برای شاخص زمان گیرایی (۳/۸ روز) و رقم گیلاس "دوم رس مشهد" برای شاخص تعداد برگ (۳/۵) دارای نتایج بهتری بودند و در نهایت در ریزپیوندهای موفق، میزان ریشه زایی ۴۱ درصد و سازگاری ۲۵/۳ درصد بدست آمد. استفاده از روش ریزپیوندی در ارقام گیلاس به دلیل سرعت و پتانسیل بالای تولید نهال، جهت اصلاح باغ‌های ناسالم و قدیمی درختان گیلاس توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: آغازه های برگی، سازگاری، عاری از ویروس، کشت بافت، نوک شاخه.

نویسنده مسئول: e.ganji@areeo.ac.ir تلفن: ۰۵۱۳۸۷۱۷۰۷۱

مقدمه

به‌دلیل تنوع اقلیمی ایران کاشت محصولات باغی گامی موثر در راستای توسعه پایدار کشاورزی و ارزآوری اقتصادی می‌باشد. این مهم نیازمند تولید نهال‌های سالم و عاری از آلودگی از ارقام مطلوب است که در توسعه صنعت باغداری نقش مهمی دارد. گیلاس یکی از مهم‌ترین محصولات باغی در جهان است و ایران از نظر تولید این محصول در جایگاه سوم دنیا قرار دارد (۹). درحال حاضر استفاده از دانهال‌های بذری به‌دلیل تفرق ویژگی‌های پایه و دیربارده‌ی و همچنین قلمه به‌خاطر مشکلات ریشه‌زایی برای آن به کلی منسوخ شده است، از این رو تکثیر آنها بیشتر از طریق پیوند صورت می‌گیرد اما روش‌های تکثیر پیوند نیز باعث توسعه عوامل آلودگی خصوصا ویروسی شده و موجب کاهش کمی و کیفی محصول می‌گردد (۱). باتوجه به اهمیت تولید درختان میوه و خسارات قابل توجه ناشی از بیماری‌ها، لزوم اجرای مدیریت صحیح در تولید مواد گیاهی عاری از ویروس ضروری است ولی تلاش‌های بسیاری که تاکنون برای استفاده از ترکیبات شیمیایی وکنترل ناقلین برای حذف عوامل ویروسی انجام گرفته هنوز نتایج موفقیت‌آمیزی نداشته است (۱۰).

با توجه به مشکلات تکثیر از طریق روش‌های سنتی، ریزازدیادی می‌تواند منجر به تولید گیاهان کلونی سالم و یکنواخت در مدت زمان بسیار کمتری شود (۱۳). ریزازدیادی یک روش تکثیر کلونی می‌باشد که سبب تولید نامحدود و گسترش سریع گیاهان برتر انتخابی از برنامه‌های اصلاحی می‌گردد. در روش‌های کشت بافت نیز ثبات ژنتیکی در انبوه گیاهان تولیدی در طول مدت ریزازدیادی تحت تاثیر عوامل زیادی قرار می‌گیرد، ولی مشخصا مناسب‌ترین اندامی که باعث حفظ خصوصیات ژنتیکی رقم می‌گردد مریستم جوانه‌هاست. از طرفی استفاده از کشت مریستم یکی از موثرترین روش‌های حذف عوامل بیماری‌زای ویروسی نیز هست چراکه عدم وجود بافت آوندی و فضاهای بین سلولی و همچنین سرعت بالای تقسیم سلولی مانع از تکثیر عوامل ویروسی در مریستم جوانه‌ها می‌شود. امروزه استفاده از مریستم انتهایی شاخساره متداول‌ترین شیوه برنامه‌های عاری‌سازی ویروسی در گیاهان، خصوصا درختان میوه می‌باشد (۱۷).

موفقیت برنامه ریزازدیادی بستگی زیادی به ریشه دهی، مقاوم سازی و سازگاری گیاهان جوان دارد که منجر به بقای گیاهان و رشد قابل قبول آنها در شرایط هوای آزاد می‌شود. کلید توسعه موفقیت آمیز ریزازدیادی از طریق ریزپیوندی، کارآیی بالای تکثیر گیاهان در محیط کشت درون شیشه‌ای می‌باشد. ریز پیوندی شامل جایگذاری نوک مریستم یا نوک شاخه روی پایه‌ای که از طریق بذر یا ریزازدیادی پرورش یافته است، می‌باشد (۱۰). ریزازدیادی درختان میوه به‌دلیل مشکلات متعدد از جمله ازدیاد و باززایی درون شیشه‌ای گیاهان چوبی

نسبت به گیاهان علفی دارای محدودیت‌های زیادی است. باززایی کامل از کشت مریستم در شرایط کشت بافت در بسیاری از گونه‌های چوبی نیز مشکل می‌باشد، از این رو ریزپیوندی برای این منظور پیشنهاد کارآمدتری است. کشت مریستم به طور مستقیم منجر به تولید گیاه کامل نمی‌گردد چون در بسیاری از اوقات پس از کشت مریستم و به دست آمدن گیاهچه و تشکیل ریشه‌های نابجا مسئله ای جدی بوده و در مواردی ناممکن به نظر می‌رسد، اما در این شرایط استفاده از فنون ریزپیوندی جایگزینی مناسب برای کشت مریستم خواهد بود. در ریزپیوندی، مریستم جدا شده بر روی پایه بذری یا پایه رویشی جایگذاری شده و پس از رشد، واجد سیستم ریشه‌ای از پیش آماده خواهد بود. ریز پیوندی سبب تولید تعداد زیادی گیاه عاری از ویروس پیوندی در زمانی بسیارکوتاه می‌گردد (۱۶).

انجام موفق روش ریزپیوندی توسط کشت مریستم اولین بار در درختان میوه روی مرکبات گزارش شده است (۱۷). بعد از آن این روش تکثیر، در بسیاری از درختان میوه از جمله گیلاس (۴)، بادام (۱۱)، هلو (۶)، زردآلو (۱۹)، فندق (۱۵)، سیب و گلابی (۲۰)، انگور (۲) انجام شده است. ریزپیوندی کاربردهای بیشماری از جمله تولید گیاهان عاری از ویروس به بوسیله پیوندک نوک مریستم (۳)، تشخیص ویروس از طریق ریزپیوندی پایه‌های حساس (۱۸)، شناخت سریع ناسازگاری ژنتیکی پیوند (۱۲)، تکثیر گیاهان سخت ریشه زا در شرایط درون شیشه‌ای (۲۳)، مطالعه فرآیندهای فیزیولوژیکی محل پیوند (۸)، تکثیر گونه‌های خاص و تولید ترکیبات خاص (۲۲) و همچنین تکثیر گیاهانی که در حالت طبیعی پیوند آنها بسیار مشکل است دارد(۲۱).

این مطالعه با هدف بررسی تاثیر محیط کشت و وجود تنظیم‌کننده رشدی بر موفقیت ریزپیوندی، هفت رقم گیلاس بر روی پایه رویشی "گزیلا ۶" در شرایط درون شیشه‌ای انجام شده است.

مواد و روش‌ها

در این بررسی از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با دو فاکتور در پنج تکرار و ده گیاهچه درهرتکرار به عنوان واحد آزمایشی استفاده شد. فاکتور اول شامل رقم در هفت سطح (ارقام زرد دانشکده، سیاه مشهد، دوم‌رس مشهد، بینگ، پیش‌رس مشهد، تکدانه مشهد وحاج یوسفی) و فاکتوردوم شامل چهار سطح تیمارکشت (M1H1: محیط کشت MS با نصف غلظت مواد تشکیل دهنده بدون تنظیم کننده رشدی، M1H2: محیط کشت MS با نصف غلظت مواد تشکیل دهنده با یک میلی‌گرم BA، M2H1: محیط کشت MS کامل بدون تنظیم کننده رشدی و M2H2: محیط کشت MS کامل با یک میلی‌گرم BA) بود.

تهیه پایه

پایه‌ها جهت ریزپیوندی، ازگیاهچه‌های

رویشی پایه گیلاس "گزیلا ۶" که از طریق کشت بافت تولید شده بودند (۵) تهیه شدند. این پایه دارای ویژگی‌های نیمه پاکوتاه، زودباردهی، عملکرد بالا و سازگاری با اکثر ارقام تجاری و شرایط اقلیمی در ایران می‌باشد. ساقه‌های هرگیاهچه رویشی را زمانی که به قطر مناسب (بیش از پنج میلی‌متر) رسیدند، از محیط رشد جدا نموده و بعد از برش ابتدا و انتهای آنها با طول بیش از دو سانتی‌متر به عنوان پایه استفاده شدند.

تهیه پیوندک

برای تهیهٔ پیوندک، نمونه‌هایی از جوانه‌های رویشی هفت رقم تجاری گیلاس که دارای بیشترین سطح زیر کشت در کشور می‌باشند از ایستگاه تحقیقات گلمکان مشهد به طول ۱/۵ تا دو سانتی‌متر از شاخه‌های درختان جدا شد و پس از گندزدایی با اتانول ۷۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس کلراکس ۲۰ درصد به مدت ده دقیقه، در شرایط استریل سه بار آبشویی شدند، پس از حذف فلس‌های جوانه، ریزنمونه‌های مریستمی به اندازه دو میلی‌متر آماده سازی شد و در لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت MS (۱۴) با یک میلی‌گرم در لیتر BA، برای استقرار مریستم، کشت شدند. پس از حدود سه هفته جوانه‌های مریستمی که تحریک به رشد شدند به تنهایی یا همراه با آغازه‌های برگی، برای ریزپیوندی به اندازه دو تا پنج میلی‌متر جدا شده و به عنوان ریز پیوندک استفاده گردیدند.

انجام ریزپیوندی

ریزپیوندی برابر با روش استاندارد برای گیلاس انجام شد (۴). تمام شرایط ریزپیوندی به‌جز نوع رقم، نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده رشدی، ثابت در نظر گرفته شد. ریزنمونه‌های تولیدی از کشت مریستم به عنوان ریزپیوندک و ساقه‌های تولیدی از گیاهان رویشی "گزیلا ۶" به‌عنوان پایه از محیط رشدی بیرون آورده شده و عمل ریزپیوندی زیر استریومیکروسکوپ انجام شد. برای این کار در قسمت انتهایی پایه‌ها برشی به ابعاد یکی میلی‌متر ایجاد شده و مریستم جوانه به تنهایی یا همراه با آغازه‌های برگی به ابعاد دو تا پنج میلی‌متر در برش پایه به روش پیوند اسکنه قرار گرفت و سپس توسط پوشش چسب پارچه‌ای استریل محل پیوند آن بسته شد.

رشد گیاهان پیوندی

ریزنمونه‌های پیوندی ابتدا روی محیط‌های مختلف تیماری مستقر شدند، تمامی محیط‌های کشت دارای ۳۰ گرم در لیتر سوکروز و ۲/۸ گرم در لیتر فایتوژل بود که در pH= ۵/۷ ثابت شده بودند. گیاهان پیوند شده ابتدا به مدت یک هفته در شرایط نور کم (۱۰۰ لوکس) و سپس به مدت سه هفته تا زمان گیرایی موفق پیوند، در شرایط دمای ۱±۲۷ درجه سانتی‌گراد و نور ۱۵۰۰ لوکس و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی در اتاقک رشد با شرایط یکسان نگهداری شدند. بعد از سه هفته، گیاهان ریزپیوندی جهت ریشه‌زایی به محیط کشت MS همراه با یک میلی‌گرم در لیتر IBA منتقل شدند. گیاهان ریزپیوندی طی هشت هفته در

شرایط درون شیشه‌ای نگهداری شدند و بعد از ریشه‌زایی جهت سازگاری در گلدان‌های حاوی پرلیت/ پیت موس (به نسبت یک: یک) داخل ظروف پلی اتیلنی قرار گرفتند.

اندازه‌گیری شاخص‌های پیوند

شاخص‌های تعیین کننده در موفقیت پیوند در هرکدام از گیاهچه‌های ریزپیوند شده اندازه گیری شد. شاخص‌های درصد موفقیت پیوند (نسبت پیوندک‌های رشد کرده به کل پیوندها بعد از چهار هفته)، زمان گیرایی پیوند (مدت زمان بین پیوند تا زمان شروع رشد و باز شدن برگهای پیوندک)، تعداد برگ‌های تولید شده روی پیوندک (سه هفته پس از گیرایی پیوند) و میزان رشد پیوندک (اندازه‌گیری طول قسمت رشد کرده پیوندک سه هفته پس از گیرایی) و همچنین درصد ریشه‌زایی (در زمان انتقال نمونه ها به گلدان) و درصد سازگاری (۳۰ روز بعد از انتقال گیاهچه‌های ریزپیوندی) ثبت گردید. درپایان داده‌های بدست آمده توسط نرم افزار آماری SAS 9/1 تجزیه و تحلیل شد و میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد مقایسه و نمودارها توسط نرم افزار Excel ترسیم شدند.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در بین تیمارها، ارقام (به‌جز زمان گیرایی پیوند) و اثرات متقابل رقم در تیمار برای تمام شاخص‌های ریزپیوندی اختلاف معنی‌دار حداقل در سطح پنج درصد وجود داشت (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس عوامل موثر بر شاخص‌های ریزپیوندی در گیلاس

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		موفقیت پیوند	زمان گیرایی	تعداد برگ	طول شاخه
رقم	۶	۱۷۲/۷**	۴/۱^{ns}	۱/۳*	۲/۱*
تیمار	۳	۱۹۳۱**	۶۵/۴**	۳۷/۸**	۷۴/۱**
رقم در تیمار	۱۸	۹۰/۴*	۹/۱*	۳/۲**	۵/۴*
خطا	۱۱۲	۳۳/۴	۱/۴	۰/۲۳	۰/۸۲
ضریب تغییرات (درصد)	-	۱۸/۱	۲۸/۱	۱۴/۹	۲۰/۱

ns، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری و اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

درصد موفقیت ریزپیوندی

در شاخص درصد موفقیت پیوند، در فاکتور تیمار، تیمار محیط کشت MS با یک میلی‌گرم در لیتر BA، بیشترین میزان موفقیت پیوند (۳۹ درصد) و محیط کشت نصف MS بدون هورمون کمترین درصد موفقیت (۲۵/۵ درصد) را دارا بودند. در فاکتور رقم نیز بیشترین درصد موفقیت پیوند مربوط به پیوندک‌های مریستمی

رقم "حاج یوسفی" (۳۵/۴ درصد) و کمترین آن در رقم "بینگ" (۲۷/۸ درصد) بود. همچنین در بین اثرات متقابل رقم و تیمار، بیشترین درصد موفقیت پیوند با پیوندک‌های مریستمی رقم "سیاه مشهد" روی محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BA (۴۸/۵ درصد) و کمترین آن در نیز با پیوندک‌های مریستمی همان رقم "سیاه مشهد" روی محیط کشت نصف MS (۲۰/۴ درصد) بود. بطورکلی در تمامی آزمایشات، میانگین درصد موفقیت ریزپیوندی ۳۱/۹ درصد بدست آمد (جدول ۲).

جدول ۲- تاثیر نوع محیط کشت و تنظیم کننده رشدی روی درصد موفقیت ریزپیوندی در گیلاس

ارقام †	تیمار				میانگین ارقام
	M2H2	M1H2	M2H1	M1H1	
بینگ	۳۶/۸^{bc}	۲۵/۷^{cd}	۲۵/۶^{cd}	۲۳/۲^{de}	۲۷/۸^{C}
دوم‌رس مشهد	۴۰/۶^{abc}	۲۷/۹^{cd}	۳۵/۳^{bc}	۲۶/۳^{cd}	۳۲/۵^{AB}
حاج یوسفی	۴۶/۹^{ab}	۳۷/۶^{bc}	۳۵/۶^{bc}	۲۱/۸^{de}	۳۵/۴^{A}
پیش‌رس مشهد	۳۱/۱^{bc}	۳۰/۸^{bcd}	۳۳/۰^{bc}	۲۹/۸^{bcd}	۳۱/۱^{BC}
سیاه مشهد	۴۸/۵^{a}	۳۰/۵^{bcd}	۳۶/۸^{bc}	۲۰/۴^{e}	۳۴/۰^{AB}
تکدانه مشهد	۲۳/۳^{de}	۴۰/۶^{abc}	۲۹/۴^{bcd}	۲۱/۲^{de}	۲۸/۴^{C}
زرد دانشکده	۴۵/۸^{ab}	۲۲/۶^{de}	۳۱/۷^{bc}	۳۵/۹^{bc}	۳۴/۱^{AB}
میانگین تیمار	۳۹/۰^{A}	۳۰/۸^{C}	۳۲/۵^{B}	۲۵/۵^{D}	۳۱/۹

†حروف غیرمشابه در جدول، بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در بین میانگین‌ها در سطح ۵ درصد می‌باشد.

زمان گیرایی ریزپیوندها

درمورد شاخص گیرایی پیوند، در بین تیمارها، تیمار محیط کشت MS با یک میلی‌گرم در لیتر BA کوتاه‌ترین زمان‌گیرایی پیوند (میانگین ۳/۲ روز) و تیمار محیط کشت نصف MS بدون تنظیم کننده رشدی، طولانی‌ترین زمان گیرایی (۶/۳ روز) را دارا بودند. در بین ارقام نیز کوتاه‌ترین زمان‌گیرایی مربوط به رقم "سیاه مشهد" (۳/۸ روز) و طولانی‌ترین زمان گیرایی در رقم "حاج یوسفی" (۵/۱ روز) بدست آمد. در بین اثرات متقابل رقم و تیمار نیز کوتاه‌ترین زمان توسعه و رشد پیوندک‌ها در ریزپیوندهای موفق مربوط به پیوندک‌های مریستمی رقم "سیاه مشهد" روی محیط کشت MS بدون تنظیم کننده رشدی (۱/۴ روز) و طولانی‌ترین زمان‌گیرایی نیز با پیوندک‌های مریستمی رقم" حاج یوسفی" روی محیط کشت نصف MS بدون هورمون (۸/۴ روز) بود. همچنین در کل آزمایش ریزپیوندی، میانگین زمان گیرایی پیوند ۴/۳ روز بود (جدول ۳).

جدول ۳- تاثیر نوع محیط کشت و تنظیم کننده رشدی روی زمان‌گیرایی در گیاهان ریزپیوندی گیلاس

ارقام†	تیمار				میانگین ارقام
	M2H2	M1H2	M2H1	M1H1	
بینگ	۳/۵^{bc}	۳/۶^{bc}	۴/۹^{cd}	۵/۵^{de}	۴/۴^{BC}
دوم‌رس مشهد	۳/۵^{bc}	۴/۸^{cd}	۳/۱^{bc}	۶/۶^{ef}	۴/۵^{BC}
حاج یوسفی	۳/۱^{bc}	۲/۰^{ab}	۷/۰^{ef}	۸/۴^{f}	۵/۱^{C}
پیش‌رس مشهد	۳/۱^{bc}	۲/۱^{ab}	۵/۳^{cde}	۵/۴^{de}	۴/۰^{AB}
سیاه مشهد	۳/۳^{bc}	۴/۸^{cd}	۱/۴^{a}	۵/۶^{de}	۳/۸^{A}
تکدانه مشهد	۴/۳^{cd}	۴/۶^{cd}	۳/۱^{bc}	۶/۲^{ef}	۴/۶^{BC}
زرد دانشکده	۲/۰^{ab}	۴/۴^{cd}	۳/۴^{bc}	۶/۵^{ef}	۴/۱^{AB}
میانگین تیمار	۳/۲ ^{A}	۳/۸ ^{B}	۴/۰ ^{BC}	۶/۳ ^{C}	۴/۳

†حروف غیرمشابه در جدول، بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در بین میانگین‌ها در سطح ۵ درصد می‌باشد.

تعداد برگ ریزپیوندک

میزان برگ تولیدی در قسمت پیوندک در گیاهان ریزپیوندی سه هفته بعد از گیرایی پیوندها ثبت گردیدند که نتایج نشان داد در بین تیمارها، بیشترین تولید برگ در ریزپیوندهای موفق نیز مانند سایر شاخص‌های پیوند مربوط به تیمار محیط کشت MS با یک میلی‌گرم در لیتر BA (۵/۷ عدد) و تیمار محیط کشت نصف MS بدون هورمون، کمترین میزان برگ (۲/۴ عدد) را داشت. در بین ارقام تفاوت اندکی وجود داشت و ارقام "دوم‌رس مشهد" و "حاج یوسفی" بیشترین تعداد برگ (۳/۵ عدد) را داشتند. در بین اثرات متقابل رقم و تیمار بهترین نتیجه مربوط به رقم " دوم‌رس مشهد" در تیمار محیط کشت MS با یک میلی‌گرم در لیتر BA (۵/۷ عدد) و کمترین آن نیز مربوط به ریزپیوندک‌های مریستمی رقم " زرد دانشکده" روی محیط کشت MS بدون هورمون (۱/۷ عدد) بود و در کل نتایج آزمایش، میانگین تعداد برگ در ریزپیوندک‌های گیاهان ۳/۳ عدد بدست آمد (جدول ۴).

جدول ۴- تاثیر نوع محیط کشت و تنظیم کننده رشدی روی تعداد برگ تولیدی در گیاهان ریزپیوندی گیلاس

ارقام†	تیمار				میانگین ارقام
	M2H2	M2H1	M1H2	M1H1	
بینگ	۴/۹^{ab}	۳/۵^{bc}	۲/۲^{cd}	۲/۳^{cd}	۳/۲ ^{AB}
دوم‌رس مشهد	۵/۷^{a}	۴/۵^{ab}	۲/۱^{cd}	۱/۸^{de}	۳/۵ ^{A}
حاج یوسفی	۴/۷^{ab}	۳/۳^{bc}	۳/۵^{bc}	۲/۳^{cd}	۳/۵ ^{A}
پیش‌رس مشهد	۴/۶^{ab}	۱/۹^{de}	۳/۰^{bcd}	۲/۷^{cd}	۳/۰ ^{B}
سیاه مشهد	۴/۷^{ab}	۲/۴^{cd}	۳/۵^{bc}	۱/۹^{de}	۳/۱ ^{B}
تکدانه مشهد	۳/۶^{bc}	۲/۲^{cd}	۳/۳^{bc}	۲/۸^{cd}	۳/۰ ^{B}
زرد دانشکده	۵/۰^{ab}	۱/۷^{e}	۴/۱^{abc}	۲/۹^{bcd}	۳/۴^{A}
میانگین تیمار	۴/۷ ^{A}	۲/۸ ^{C}	۳/۱ ^{B}	۲/۴^{D}	۳/۳

†حروف غیرمشابه در جدول، بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در بین میانگین‌ها در سطح ۵ درصد می‌باشد.

رشد طولی پیوندک

برای محاسبه میزان رشد پیوندک، طول قسمت رشد کرده پیوندک سه هفته پس از گیرایی اندازه‌گیری گردید. با توجه به نتایج در بین تیمارها، بیشترین میزان رشد پیوندک همانند سایر شاخص‌ها، مربوط به تیمار محیط کشت MS با یک میلی گرم در لیتر BA بود (۶/۲ سانتی‌متر) و تیمار محیط کشت نصف MS بدون هورمون، کمترین میزان رشد طولی را داشت (۲/۸ سانتی‌متر) و در بین ارقام بیشترین و کمترین میزان رشد به‌ترتیب مربوط به ارقام "حاج یوسفی" (۵ سانتی‌متر) و " سیاه مشهد" و "بینگ" (۴/۱ سانتی‌متر) بود. در اثرات متقابل رقم و تیمار نیز بهترین نتیجه مربوط به ریزپیوندک‌های مریستمی رقم "دوم‌رس مشهد" روی محیط کشت MS با یک میلی‌گرم در لیتر BA (۷/۱ سانتی‌متر) و کمترین میزان رشد پیوندک مربوط به ریزپیوندک‌های مریستمی همان رقم "دوم‌رس مشهد"روی محیط کشت نصف MS بدون هورمون (۱/۹ سانتی‌متر) بود و در کل نتایج آزمایشات ریزپیوندی، میانگین رشد طولی ریزپیوندک ۴/۵ سانتی‌متر بدست آمد (جدول ۵).

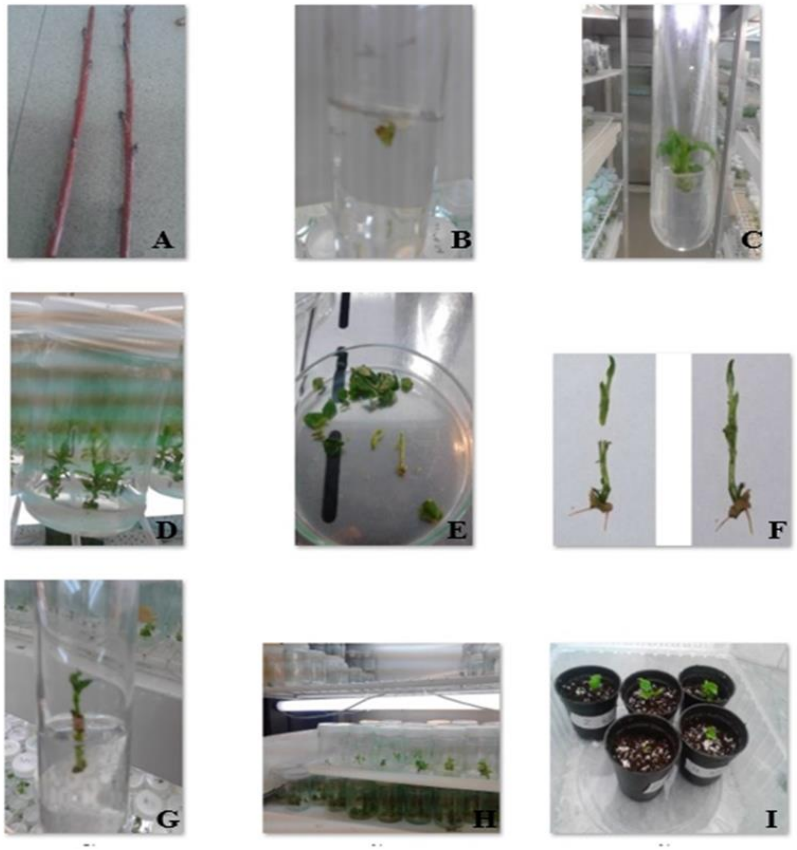
جدول ۵- تاثیر نوع محیط کشت و تنظیم کننده رشدی روی رشد طولی پیوندک در گیاهان ریزپیوندی گیلاس

ارقام†	تیمار				میانگین ارقام
	M2H2	M2H1	M1H2	M1H1	
بینگ	۵/۹^{abc}	۴/۲^{cd}	۳/۸^{de}	۲/۴^{ef}	۴/۱ ^{B}
دوم‌رس مشهد	۷/۱^{a}	۵/۹^{abc}	۳/۵^{de}	۱/۹^{f}	۴/۶ ^{AB}
حاج یوسفی	۷/۰^{a}	۶/۴^{ab}	۳/۸^{de}	۲/۶^{ef}	۵/۰ ^{A}
پیش‌رس مشهد	۶/۴۹^{ab}	۲/۸^{ef}	۴/۹^{bcd}	۳/۷^{de}	۴/۵ ^{AB}
سیاه مشهد	۶/۲^{ab}	۲/۵^{ef}	۵/۰^{bcd}	۲/۷^{ef}	۴/۱ ^{B}
تکدانه مشهد	۵/۵^{bc}	۴/۱^{cd}	۵/۸^{bc}	۳/۸^{de}	۴/۸ ^{A}
زرد دانشکده	۶/۰^{abc}	۴/۶^{cd}	۴/۷^{cd}	۲/۳^{ef}	۴/۴^{AB}
میانگین تیمار	۶/۲ ^{A}	۴/۴ ^{B}	۴/۵ ^{B}	۲/۸ ^{C}	۴/۵

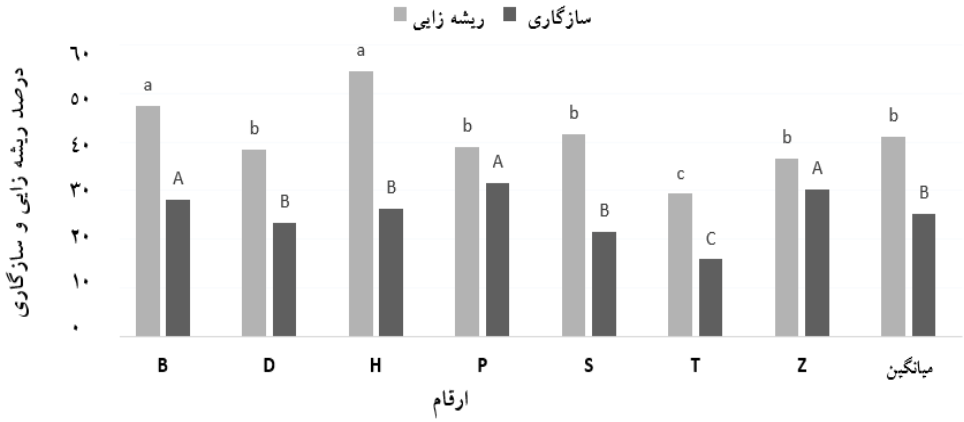
†حروف غیرمشابه در جدول، بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در بین میانگین‌ها در سطح ۵ درصد می‌باشد.

ریشه‌زایی و سازگاری گیاهان ریزپیوندی

بعد از سومین واکشت و بررسی شاخص‌های ریزپیوندی، گیاهچه‌های ریزپیوندی شده موفق حاصل پس از رشد در محیط ریشه‌زایی قرار گرفتند و سه هفته بعد به محیط گلدان حاوی مخلوط پرلیت و پیت موس (به نسبت ۱:۱) جهت سازگاری منتقل شدند (شکل ۱). نتایج حاصل از ریشه‌زایی در گیاهان ریزپیوندی موفق نشان داد که در شاخص درصد ریشه‌زایی بیشترین میزان مربوط به رقم "حاج یوسفی" (۵۴/۵ درصد) و کمترین آن در رقم "تکدانه مشهد" (۲۹/۳ درصد) بود و میانگین کل درصد ریشه‌زایی ارقام ۴۱ درصد بود. همچنین سه هفته بعد از انتقال گیاهان ریزپیوندی ریشه‌دار شده به گلدان، برای شاخص درصد سازگاری نیز بیشترین میزان مربوط به رقم "پیش‌رس مشهد" (۳۱/۷ درصد) و کمترین آن مربوط به رقم "تکدانه مشهد" (۱۵/۹ درصد) بدست آمد و میانگین کل درصد سازگاری نیز در نهایت برای ارقام گیلاس ۲۵/۳ درصد بدست آمد (شکل ۲).



شکل ۱- مراحل ریزپیوندی گیلاس در شرایط درون شیشه‌ای (رقم پیش‌رس مشهد) ۱: آماده سازی ریزنمونه مریستم ۲: جداسازی و کشت ریزنمونه مریستم ۳: استقرار ریزنمونه‌های مریستمی جهت ریزپیوندک ۴: تکثیر نوشاخه‌های تولیدی ۵: آماده سازی ریزپیوندک و پایه ۶: انجام ریزپیوندی ۷: ریشه‌زایی ۸: سازگاری گیاهان ریزپیوندی.



شکل ۲- مقایسه درصد ریشه‌زایی و سازگاری در گیاهان ریزپیوندی ارقام گیلاس: زرد دانشکده: **Z**، سیاه مشهد: **S**، دوم‌رس مشهد: **D**، بینگ: **B**، پیش‌رس مشهد: **P**، تکدانه مشهد: **T**، حاج یوسفی: **H**

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشـــان داد که موفقیت در ریزپیوندی در شرایط درون شیشه‌ای تحت تاثیر نوع رقم، نوع محیط و وجود تنظیم کننده‌های رشـدی قرار دارد. در ارقام مختلف گیلاس برای شـــاخص‌های ریزپیوندی به جز شـــاخص زمان گیرایی، تفاوت معنی‌داری وجود داشـــت که با نتایج بسیاری از گزارشات تطابق داشت. با توجه به سرعت بالای تکثیر سلول‌های مریستمی محل پیوند، تنظیم کننده‌های رشـــدی میزان تقســـیم سلولی را خصوصا در سلول‌های مریستمی لایه زاینـده محل پیونـد افزایش و بـاعـث تشـــکـیـل کالوس می‌شـــوند که این امر به نوبه خود باعث افزایش درصد موفقیت پیوند می‌گردد. از طرفی وجود مواد غذایی برای فعال شـــدن و ایجاد پل پینه‌ای بین ریزپیوندک و پایه‌ها ضـــروری اســـت (۱۰). نتایج این آزمایش هم موید این موضـــوع بوده و نشـــان داد کـه در ریزپیونـدی گیلاس، محیط کامل MS نسبت به محیط نصـف MS و محیط دارای هورمون نســـبت بـه محیط بـدون هورمون کارآیی بیشتری در موفقیت پیوند، رشد ریزنمونه‌ها و تولیـد نوشـــاخـه دارد. نتایج این تحقیق، مشـــابه نتایج بدســـت آمده از ارزیابی ریزپیوندی گیلاس رقم "سیاه مشـهد" روی پایه بذری آلبالو بود که موفقیت پیوند در محیط MS کامل حاوی ۰/۵، ۰/۵، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب از تنظیم کننده های رشـدی BA، IBA و GA بیشـتر از محیط کشـت نصـف MS بدون هورمون بود (۴). در بررســی ریزپیونـدی بـادام رقم"نـان پـاریـل" روی پـایـه بـذری هم بهترین پاســخ ریزپیوندی در محیط کشـــت MS حاوی یک و دو میلی‌گرم بر لیتر به‌ترتیب BA و IBA بود (۱۱). درای ریزپیونـدی زردآلو روی پـایـه بـذری در محیط کشـــت MS تغییریافته با ۲/۲ تا ۸/۸ میکرومول BA بیشـترین موفقیت بود (۷). همچنین در ریزپیوندی گلابی و سیب با افزایش غلظت تنظیم کننده رشـــدی BA تا دو میلی‌گرم بر لیتر موفقیت پیوند افزایش یافت (۲۰).

توصیه ترویجی

روش ریز پیوندی، یک روش عملی سـریع با پتانسـیل بالا برای تولید نهال و بازسـازی باغ‌های سـالم می‌باشـد که علاوه بر تولید گیاهان عاری از ویروس جهت تشخیص سریع روابط ناسازگاری پیوند و تکثیر گیاهان سـخت ریشـه زا نیز توصـیه می‌گردد. عوامل بسـیاری در موفقیت ریزپیوندی نقش دارنـد کـه از آن جملـه می‌توان بـه کـاربرد تنظیم کننـده‌های رشـــدی ماننـد بنزیل آدنین و اکسـین در غلظت مناسـب و آنتی اکسـیدان‌هایی مانند اسـید آسـکوربیک و اسـید سـیتریک اشـاره نمود. جایگذاری مناســـب پیوندک روی پایه به صورتی که پایه و پیوندک در ارتباط نزدیک‌تری با یکدیگر قرار گیرند مثل پیوند اسـکنه و بسـتن محل پیوند به گونه‌ای که ارتباط آوندی برقرار شـود نیز اهمیت بسزایی دارد. زمان تهیه پیوندک در فاصـــلـه بین خرداد تـا آبـان و اســـتفـاده از پیونـدک‌هـای بـا انـدازه بزرگتر در گیرایی پیونـد دارای نقش قابل ملاحظه‌ای می‌باشـــد. همچنین

پیوندهای درون شـــیشـــه‌ای به دلیل عدم دخالت شرایط محیطی نامناسب و حفظ رطوبت نسبت به پیوندهای هوای آزاد ارجحیت بیشتری دارند. لذا توصیه می‌شود که شرکت‌های تولید کننده نهال و کشاورزان پیشرو با رویکردی جدید درصنعت باغداری نوین، روش‌های ریزازدیادی از جمله ریزپیوندی گیلاس را جهت رســیدن به حداکثر بهره‌وری در تولید نهال‌های باکیفیت و ســالم جایگزین روش‌های سـنتی تکثیر این محصـول با ارزش کنند.

سپاسگزاری

این پژوهش، به عنوان بخشـــی از پروژه ملی تولیـد گیـاهـان ســـالم و عـاری از ویروس در هســـته دارها محســـوب می‌گردد که در مرکز تحقیقات و آموزش کشـــاورزی و منابع طبیعی خراســان رضــوی طی ســال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۶ اجرا شده است، لذا از مسئولین و کارکنان بخش تحقیقـات علوم زراعی و بـاغی خصـــوصـــا آزمایشـــگاه کشـــت بافت باغبانی این مرکز قدردانی می‌گردد.

منابع

۱- **گنجی مقدم، ا. و بوذری، ن .۱۳۸۸.** راهنمای علمی و کاربردی گیلاس. انتشـارات سـروا. تهران. ۳۴۴ صفحه.

2. **Aazami, M. and Bagher, M. 2010.** In vitro micro-grafting of some Iranian grapevine cultivars. Romanian Biot. 15:5576-5580.
3. **Abbas, M. Khan, M. Fatima, B. Iftikhar, Y. Mughal, S. Jaskani, M. Khan, I. and Abbas, H. 2008.** Elimination of Citrus tristeza closterovirus (CTV) and production of certified citrus plants through shoot-tip micrografting. Pak. J. Bot. 40:1301-1312.
4. **Amiri, M. 2006.** In vitro technique to study the shoot tip grafting of Sweet cherry (*Prunus avium* L) var Seeyahe Mashhad. Food Agri. 41: 151-154.
5. **Daneshvar Hossini, A. Ganji Moghadam, E. and Anahid, S. 2010.** Effects of Media Cultures and Plant Growth Regulators in Micro Propagation of 'Gisela 6' Rootstock. Ann. Biol. Res. 1(2):135-141.
6. **Deogratias, J. Lutz, A. and Dosba, F. 1986.** In vitro micrografting of shoot tips from juvenile and adult *Prunus avium* L. and *Prunus persica* L. Batsch to produce virus-free plants. Acta Horti. 193: 139–45.
7. **Deogratias, J. Castellani, V. Dosba, F. Jaurez, J. Arregui, J. Ortega, C. Ortega, V. Llacer, G. and Navarro, L. 1991**. Study of growth parameters on apricot shoot-tip grafting in vitro (STG). Acta. Horti. 293: 363-371.
8. **Estrada-Luna, A. López-Peralta, C. and Cárdenas-Soriano, E. 2002.** In vitro micrografting and histology of the graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia spp*.). Sci. Hortic. 92:317-327.
9. **FAO. 2015.** Http: //faostat.fao.org/faostat.
10. **Hussain, G. Wani, M, Mir, M. Rather, Z. and Bhat, K. 2014.** Micrografting for fruit crop improvement. African J. Biotec. 13(25): 2474-2483.
11. **Isikalan, C. Namli, S. Akbas, F. and Erol, A. 2011.** Micrografting of almond

(*Amygdalus communis*) cultivar 'Nonpariel'. Aust. J. Crop Sci. 5: 61-65.

12. **Jonard, R. Lukman, D. Schall, F. and Villemur, P. 1990.** Early testing of graft incompatibilities in apricot and lemon trees using in vitro techniques. Sci. Hor.43:117-128.
13. **Murashige, T. Bitters, W. Rangan, T. Nauer, E. Roistacher, C. and Holliday, P. 1972.** A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free Citrus clones. Hort Sci. 7: 118–119.
14. **Murashige, T. and Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
15. **Nas, M. and Read, P. 2003.** Simultaneous micrografting rooting and acclimatization of icropropagated American chestnut grapevine and hybrid hazelnut. Eur. J. Hort. Sci. 68: 234-237.
16. **Navarro, L. 1988.** Application of shoot-tip grafting in vitro to woody species. Acta Horti. 227: 43–55.
17. **Navarro, L. Roistacher, C. and Murashige, T. 1975.** Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virusfree citrus. J. Amer. Soc. Hort. Sci.100: 471–479.
18. **Pathirana, R. and McKenzie, M. 2005.** Early detection of grapevine leafroll virus in *Vitis vinifera* using in vitro micrografting. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 81:11-18.
19. **Piagnani, M. Prinsi, B. and Bassi, D. 2006.** Experimental approaches to in vitro grafting in *Prunus armeniaca* and *P. spinosa*. Adv. Hort. Sci. 20(3.:224-230.
20. **Rafail, S. and 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 2010.
21. **Ramanayake, S. and Kovoor, T. 1999.** In vitro micrografting of cashew (*Anacardium occidentale* L.). J. Hort. Sci. Biotech. 74:265-68.
22. **Richardson, F. Saoir, S. and Harvey, B. 1996.** A study of the graft union in in vitro micrografted apple. Plant growth reg. 20:17-23.
23. **Wang, G. Li, X. Chen, Q. and Tian, J. 2010.** Studies on factors affecting the microshoot grafting survival of walnut. Acta Horti. 861:327-331.