مجله علوم باغبانی ایران
دوره ۴۴، شماره ۱، ۱۳۹۲ (۳۰-۲۱)

تاثیر خصوصیات رشدی پایه بر ریز شاخه پیوندی (Minigrafting) گردو

حامد بلانیان[۱]، محمدرضا فتاحی مقدم[۲*]، علی عبادی[۳] و داراب حسنی[۴]
۱، ۲، ۳، دانشجوی دکتری، دانشیار و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۴، دانشیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
(تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۲۰ – تاریخ تصویب: ۹۰/۱/۲۸)

چکیده

ازدیاد غیرجنسی یکی از بزرگترین مشکلات تولید گردو در ایران است. این آزمایش به منظور بررسی اثرات فیزیولوژیک پایه مانند علفی یا چوب نرم بودن و وجود برگ روی آن بر ریز شاخه پیوندی گردو صورت گرفت که در آن پیوندک های ۲/۵-۱/۵ سانتیمتری گردو روی پایه های گردوی چند هفته ای علفی و چوب نرم با یا بدون برگ و در شرایط کنترل شده پیوند گردیدند. نتایج نشان داد که به طور کلی وجود برگ روی پایه تاثیر منفی بر میزان گیرایی داشته است. میانگین گیرایی در پایه های بدون برگ و برگدار به ترتیب ۵۶ و ۴۸ درصد بود. اختلاف معنی داری بین پایه های علفی و چوب نرم نیز دیده شد، به نحوی که پایه های چوب نرم با میانگین ۵۶٪ دارای گیرایی بیشتری نسبت به پایه های علفی با ۴۶٪ بودند. اثر متقابل بین نوع پایه و وجود برگ نیز مشاهده شد به نحوی که برگ در پایه های علفی باعث افزایش گیرایی ولی در پایه های چوب نرم تاثیر منفی بر گیرایی داشت. تاثیر منفی برگ در پایه های چوب نرم تا حدی بود که گیرایی را از ۷۳٪ در پایه های بی برگ به ۴۳٪ در پایه های برگ دار کاهش داد. وجود برگ بر زمان لازم برای گیرایی تاثیر معنی داری نداشت ولی در پایه های علفی گیرایی در زمان کمتری نسبت به پایه های چوب نرم صورت گرفت. اندازه گیری میزان قند های محلول در محل پیوند در پایه نشان داد که میزان کربوهیدراتها در پایه های چوب نرم در مقایسه با پایه های علفی و همچنین در پایه های برگدار نسبت به پایه های بی برگ بالاتر بود در صورتی که گیرایی از رابطه فوق تبعیت نکرد. این مسئله می تواند بیانگر تاثیر احتمالی عوامل دیگری علاوه بر کربوهیدرات ها باشد که توسط برگهای مسن تر یا جوانتر در پایه های چوب نرم و علفی ساخته شده و به محل پیوند منتقل می گردند که می توانند گیرایی و رشد بعدی پیوندک ها را تحت تاثیر خود قرار دهند. گیاهان پیوندی تا یک سال پس از آزمایش از زنده مانی و رشد مطلوبی برخوردار بوده اند.

واژه های کلیدی: پیوند، گردو، رشد پیوندک، قند های محلول، پایه

مقدمه

گردو (*Juglans regia* L) از خانواده Juglandaceae به عنوان یکی از گیاهان مناطق معتدله به طور وسیعی در دنیا کشت می گردد. ایران با تولید ۴۸۵ هزار تن گردو در سال ۲۰۱۱ رتبه دوم را در دنیا به خود اختصاص داده است.(FAO, 2011). هتروزیگوتی ژنتیکی

* نویسنده مسئول: محمدرضا فتاحی مقدم تلفن: ۰۹۱۲۵۶۶۸۶۲۷ E-mail: fattahi@ut.ac.ir

بالا در گردو باعث می شود که گیاهان تکثیر یافته از بذر دارای تنوع بالایی باشند (Gandev, 2007). این تنوع اگرچه باعث افزایش مواد ژنتیکی متنوع و مناسب می گردد اما محصول تولید شده دارای غیر یکنواختی و نهایتاً ارزش اقتصادی پائین تری خواهد بود.

وجود غلظتهای بالای ترکیبات پلی فنلی در بافتهای رویشی این گیاه که منجر به قهوه ای شدن در اثر ایجاد زخم در بافت می گردد مانع تولید کالوس و تکثیر غیرجنسی به روش پیوند یا قلمه در این گیاه می باشد (Rongting & Pinghai, 1993). پیوند اسکنه و کوپیوند وصله ای از مرسوم ترین روشهای تکثیر غیر جنسی گردو هستند که شدیداً تحت تاثیر شرایط آب و هوایی به ویژه دما و رطوبت محیط در زمان پیوند می باشند (Stanisavljevic & Mitrovic, 1997; Özkan et al., 2001; Karadeniz, 2005). گزارشهای متفاوتی توسط محققین در خصوص میزان گیرایی پیوند گردو بیان شده است که معمولا رضایت بخش نبوده و حتی در بسیاری از موارد اگرچه در مراحل اولیه ابتدا مناسب بوده ولی با گذشت زمان درصد بالایی از گیاهان پیوند شده از بین رفته اند (Solar et al., 2001; Özkan et al., 2001; Ebrahimi et al., 2006; Gandev, 2007). بدلیل وجود مشکلات در پیوند اسکنه و وصله ای مانند درصد پائین گیرایی، روشهای جدید پیوند برای تکثیر این گیاه همواره دارای اهمیت بوده است که از این روش ها می توان به پیوند کالوس گرم (Hot callus grafting) و پیوند هیپوکوتیل (Hypocotyl grafting) اشاره کرد (Vahdati & Zareie, 2005; Soleimani et al., 2008 Lagerstedt, 1981; Avanzato, 1997; Atefi, 1997;).ریز پیوندی روشی است که معمولاً در شرایط درون شیشه ای برای عاری از بیماری کردن گیاهان (Katoh et al., 2003)، تشخیص آلودگی به ویروس (Pathirana & McKenzie, 2005)، بازجوان سازی بافت های بالغ (Chabukswar & Deodhar, 2006، باززایی گیاهان بدون ریشه حاصل از کشت بافت (Raharjo & Litz, 2005) و موارد دیگر استفاده می گردد. این روش را می توان در شرایط *ex vitro* نیز انجام داد که باعث حذف تلفات ناشی از انتقال گیاه به شرایط خارج شیشه می شود (Raharjo & Litz, 2005) و حتی در برخی از موارد برای مثال در ریز پیوندی پسته گیرایی بالاتری در شرایط *ex vitro* در مقایسه با *in vitro* مشاهده گردیده است (Onay et al., 2003). طبق گزارش ها در ریز پیوندی با افزایش طول پیوندک گیرایی به طور قابل ملاحظه ای افزایش می یابد که شاید یکی از دلایل آن افزایش ذخیره مواد غذایی در پیوندک های طویل تر و در نتیجه افزایش زنده مانی آنها پس از پیوند باشد (Khalafalla & Daffala, 2008; Navarrro et al., 1975; Onay et al., 2004). اگرچه در منابع مختلف استفاده از پیوندک های بزرگتر از یک سانتی متر را نیز ریز پیوندی (Micrografting) به شمار آورده اند (Onay et al., 2003; Raharjo & Litz, 2005; Khalafala & Daffala, 2008) اما اصطلاح ریز شاخه پیوندی (Minigrafting) برای این گونه پیوند ها مناسب تر به نظر می رسد (Pasquale et al., 1999; Ewens & Felker, 2003). موفقیت در ریز پیوندی تحت تاثیر عوامل زیادی است که از جمله آنها می توان به نقش مواد تنظیم کننده رشد و کربوهیدراتهای محلول اشاره کرد (Jonard et al., 1983; Navarro et al., 1975). از بین مواد تنظیم کننده رشد گیاهی اکسین و سیتوکینین ها نقش بیشتری بر گیرایی پیوند داشته و باعث افزایش تولید کالوس، افزایش تمایز بافت های آوندی و در نتیجه افزایش گیرایی شده اند (Edriss & Buger, 1984; Wetmore & Rier, 1963). بنابراین، این احتمال وجود دارد که برگ ها به عنوان اندام های تولید کننده مواد تنظیم کننده های رشد گیاهی و همچنین کربوهیدراتها بتوانند گیرایی پیوند را تحت تاثیر قرار دهند. در این آزمایش تاثیر برگ روی پایه و همچنین پایه علفی یا چوب نرم بر گیرایی ریز شاخه پیوندی گردو در شرایط کنترل شده اتاقک رشد مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

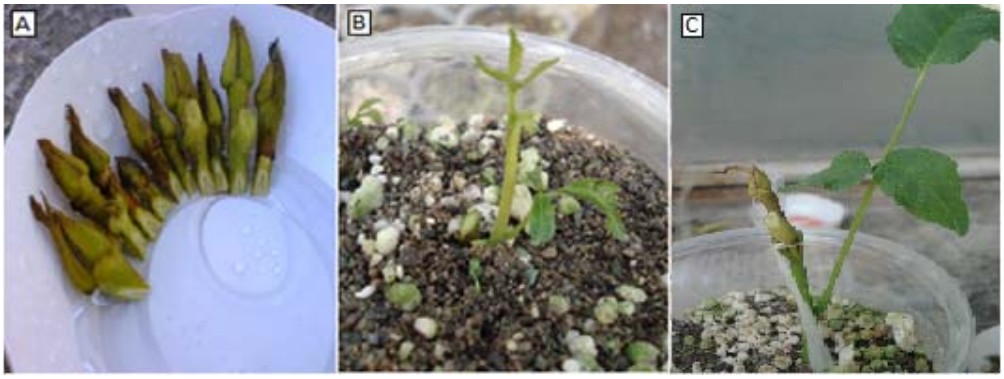
آماده کردن پایه

بذور گردو *J. regia* پس از ضدعفونی با قارچکش به مدت حدود ۱۲ هفته در سردخانه در دمای ۵-۴ درجه سانتی گراد در داخل پرلایت مرطوب سرمادهی شدند. سپس بذور در داخل گلدانهای پلاستیکی ۱۳×۹ سانتی متر که با مخلوطی از نسبتهای مساوی ماسه و پرلایت پر شده بود کشت گردید و در گلخانه قرار داده شدند.

گیاهچه ها پس از شروع به رشد در تمام مراحل آزمایش با محلول غذایی کامل هوگلند تغذیه شدند. به دلیل اینکه اولین برگ حقیقی در نهال تازه روئیده گردو در ارتفاع حدود ۱۰ سانتی متر تشکیل می گردد و در این ارتفاع قطر پایه برای پیوند کم است، گیاهچه های سه هفته ای از بالای اولین جوانه جانبی سربرداری شدند تا شاخه جانبی تولید شده از این جوانه در ارتفاع پائین تر (۳-۲ سانتی متر) و در نزدیک طوقه تولید برگ حقیقی نماید سپس روی این شاخه جانبی عمل پیوند انجام گردید (شکل ۱ (B)). در این آزمایش از دو نوع پایه علفی و چوب نرم استفاده گردید به این صورت که پایه های چوب نرم دارای سن بیشتری بودند و ساقه حالت نیمه چوبی به خود گرفته بود. این حالت حدوداً پنج هفته پس از سربرداری بدست آمد. در صورتی که پایه های علفی که حدوداً دو هفته پس از سربرداری از آنها استفاده گردید دارای ساقه علفی ، آبدار و به رنگ سبز روشن بودند.

آماده کردن پیوندک

پیوندک ها از سرشاخه های درختان بالغ گردوی ' جهان ۲' از ایستگاه تحقیقات گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران تهیه گردید. سرشاخه هایی که دارای قطر نسبتاً مناسبی بودند (۳/۵-۲ میلی متر) از درخت جدا و ۲/۵-۱/۵ سانتی متر از انتهای آنها قطع شده سپس بخش تحتانی توسط تیغ جراحی به صورت V شکل برش داده شدند و تا قبل از عمل پیوند به منظور جلوگیری از قهوه ای شدن قسمت بریده شده در داخل آب نگهداری شدند (شکل ۱ (A)).



شکل ۱- پیوندک های برش یافته آماده پیوند زدن (A)، گیاهچه سربرداری شده به منظور تولید شاخه جانبی (B) و پیوند روی پایه چوب نرم برگدار (C)

انجام پیوند

پیوند در اواخر مرداد و اوایل شهریور سال ۱۳۸۸ صورت گرفت. پس از آماده شدن پایه و رسیدن آنها به سن مناسب از یک سانتی متر بالای اولین برگ سربرداری شدند. در تیمار های بدون برگ ، پس از سربرداری، برگ پایه در زمان پیوند حذف گردید در حالی که در تیمار پایه های برگدار این برگ تا پایان آزمایش روی پایه باقی گذاشته شدند. پس از سربرداری شکافی به طول ۰/۵ سانتی متر به طور عمودی به وسیله تیغ جراحی روی پایه ایجاد گردید و پیوندک از قبل آماده شده در داخل آن قرار داده شد. انتخاب پیوندک ها به نحوی انجام شد که قطر پایه و پیوندک تا حدودی با هم تطابق داشته باشند. همچنین قطر پایه در محل پیوند در پایه های علفی و چوب نرم حدوداً برابر بود (به طور میانگین ۲/۶۳ میلی متر). سپس محل پیوند به وسیله یک نوار نایلونی باریک محکم گردید تا پیوندک جابجا نگردد (شکل ۱ (C)). به منظور حفظ رطوبت محل پیوند، روی گلدانها توسط لیوان های یک بار مصرف شفاف پوشانده شد. برای جلوگیری از آلودگی های قارچی گیاهچه های پیوند شده، هر ۴-۳ روز یکبار با قارچکش کاپتان با غلظت ۲ گرم در لیتر اسپری گردیدند. نهال ها پس از انجام پیوند در اتاقک رشد با دمای ۲۶ درجه سانتی گراد (Reil et al., 1998) و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس قرار داده شدند.

گیاهچه های پیوندی سه هفته پس از گیرایی به گلخانه منتقل شده و لیوان های سرپوش طی چند روز برداشته شد سپس گیاهچه ها در مرحله بعد به گلدانهای بزرگتر دارای مخلوطی با نسبت های مساوی از خاکبرگ، خاک باغچه و ماسه منتقل گردیدند.

صفات و نحوه اندازه گیری آنها

فاکتورهای گیرایی

شروع رشد و باز شدن برگهای پیوندک شاخص گیرایی بود (شکل ۲ (A)) و درصد گیرایی از طریق محاسبه نسبت پیوندک های رشد کرده به کل پیوندها محاسبه گردید. مدت زمان بین پیوند تا شروع رشد پیوندک به عنوان زمان لازم برای گیرایی ثبت گردید. برای محاسبه میزان رشد پیوندک، اندازه گیری طول قسمت رشد کرده پیوندک سه هفته پس از گیرایی صورت گرفت. همچنین تعداد برگهای تولید شده روی پیوندک نیز ثبت گردید. با تقسیم کردن میانگین میزان رشد پیوندک ها بر تعداد برگ های رشد یافته میانگین طول میانگره برای هر تیمار بدست آمد.

میزان کربوهیدرات های محلول

پس از اینکه پایه های علفی و چوب نرم به سن مناسب برای پیوند رسیدند به همان طریق که برای پیوند آماده می شدند از بالای اولین برگ روی شاخه فرعی سربرداری شدند سپس در نیمی از گیاهچه ها برگ مورد نظر را حذف نموده و در نیمی دیگر برگ حفظ گردید. گیاهچه های فوق در گلخانه قرار گرفتند و حدود یک هفته بعد یک سانتی متر انتهایی این پایه ها برای اندازه گیری مقدار کربوهیدراتهای محلول جدا شدند. برای هر تیمار سه تکرار و در هر تکرار از سه گیاهچه نمونه گرفته شد. نمونه ها پس از خرد شدن در داخل آون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد خشک شدند. ۰/۲ گرم از پودر حاصل از نمونه های خشک شده طی دو نوبت (در هر نوبت ۰/۱ گرم) به وسیله اتانل ۸۰ ٪ عصاره گیری شدند. عصاره های حاصل از نمونه اول و دوم پس از مخلوط شدن با یکدیگر به روش اسید سولفوریک- فنل (Dubois et al., 1956) و با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل Lambda EZ207 در طول موج ۴۸۵ نانومتر مورد سنجش قرار گرفته و با مقایسه داده های حاصل با نمونه های شاخص غلظت کربوهیدرات های محلول در نمونه بدست آمد که بر حسب میلی گرم بر گرم ماده خشک ثبت گردید.

تجزیه داده ها

در این بررسی از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. عوامل مورد بررسی علفی یا چوب نرم بودن پایه و عامل دیگر وجود یا عدم وجود برگ روی پایه بود. هر تیمار دارای سه تکرار و در هر تکرار ۱۰ گیاهچه پیوند گردیدند و درمجموع تعداد گیاهچه های پیوند شده ۱۲۰ عدد بود. برای تجزیه داده های این آزمایش از نرم افزار SAS (Version 9.1) استفاده گردید و میانگین داده ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن مقایسه گردیدند.

نتایج

معنی دار بودن تاثیر برگ و چوبی بودن پایه بر گیرایی به ترتیب در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪ به وسیله تجزیه واریانس داده های این آزمایش مشخص گردید (جدول ۱).

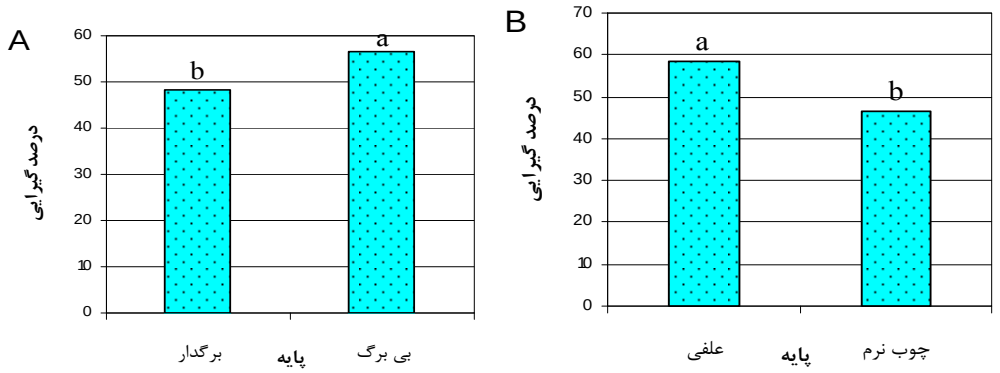
جدول ۱- تجزیه واریانس اثرات برگدار و علفی یا چوب نرم بودن پایه بر فاکتور های گیرایی در ریز شاخه پیوندی گردو

منابع تغییرات	درصد گیرایی		زمان لازم برای گیرایی		رشد پیوندک		کربوهیدرات های محلول	
	df	MS	df	MS	df	MS	df	MS
علفی یا چوب نرم بودن	۱	۴۰۸/۳۳**	۱	۲۶/۵۶**	۱	۰/۳۸ns	۱	۲۳۹/۵۰۲**
برگدار بودن	۱	۲۰۸/۳۳*	۱	۱۲/۱۵ns	۱	۰/۰۴ns	۱	۳۹/۴۲**
علفی یا چوب نرم بودن × برگدار بودن	۱	۱۴۰۸/۳۳**	۱	۰/۰۰۲ns	۱	۴/۲۹**	۱	۹/۲۴ns
خطای آزمایش	۸	۲۵/۰۰	۶۹	۲۹/۹۶	۱۸	۰/۱۹	۸	۲/۹۲
ضریب تغییرات (٪)		۹/۵۲		۲۶/۶۳		۱۰/۱۷		۵/۲۰

* و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ و ns عدم معنی داری

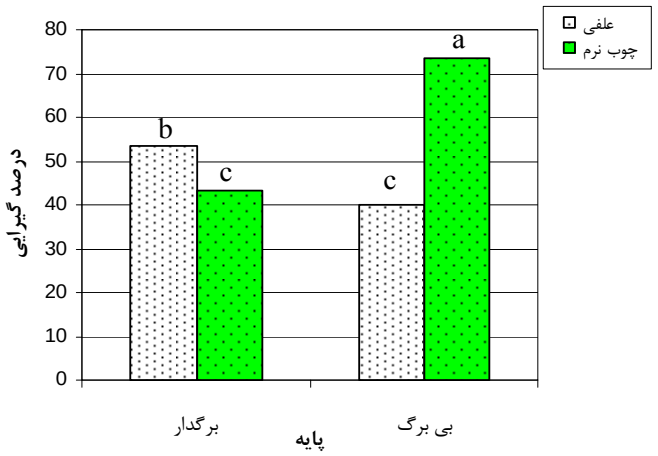
بیشترین گیرایی پیوند ها (۷۳٪) با استفاده از پایه های چوب نرم بدون برگ بدست آمد و کمترین گیرایی (۴۰٪) مربوط به پایه های علفی بدون برگ بود (شکل ۳). در مورد اثرات اصلی، برگ روی پایه به طور معنی

داری (P≤ ۰/۰۵) باعث کاهش گیرایی گردید به طوری که میانگین گیرایی در پایه های برگدار ۴۸٪ و در پایه های بی برگ ۵۶٪ بود (شکل ۲ (A)). همچنین افـزایش میزان چوبی بودن پایه باعث افزایش گیرایی از ۴۶٪ در پایه های علفی به ۵۸٪ در پایه های چوب نرم گردید (P≤ ۰/۰۱) (شکل ۲ (B)).



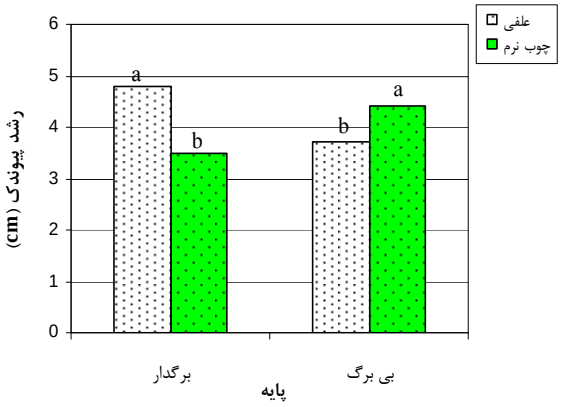
شکل ۲- اثر اصلی برگدار بودن (A) و علفی یا چوب نرم بودن پایه (B) بر گیرایی ریزشاخه پیوندی گردو
(در هر شکل ستون های دارای حروف مشترک با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی دار ندارند)

برگدار بودن پایه تاثیر متفاوتی بر گیرایی در پایه های چوب نرم و علفی داشت و اثر متقابل برگ و میزان چوبی بودن پایه معنی دار بود به نحوی که در پایه های علفی برگ روی پایه گیرایی را افزایش داد ولی در پایه های چوب نرم باعث کاهش گیرایی گردید. تاثیر برگ بر گیرایی در پایه های چوب نرم بیشتر و مشهودتر بود (شکل ۳).



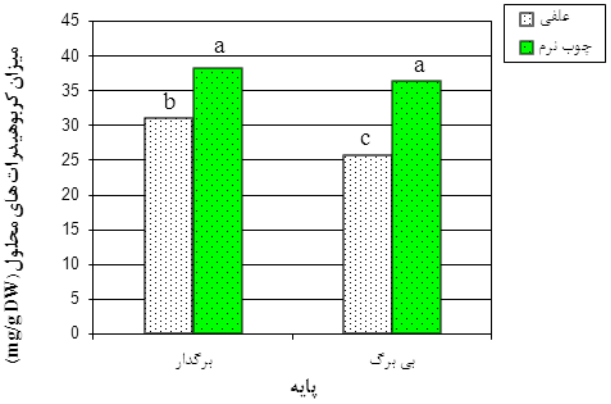
شکل ۳ - اثر متقابل برگدار و علفی یا چوب نرم بودن پایه بر درصد گیرایی ریز شاخه پیوندی گردو
(ستون های دارای حروف مشترک با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی دار ندارند)

در مورد رشد اولیه پیوندک ها پس از گیرایی نیز نتایج تا حدودی مشابه درصد گیرایی بود. یعنی پایه های چوب نرم بدون برگ و علفی برگدار نسبت به دو تیمار دیگر رشد بیشتری داشتند (به ترتیب ۴/۴ و ۴/۸ سانتی متر در مقایسه با ۳/۵ و ۳/۷ سانتی متر).



شکل ۴ - اثر متقابل برگدار و علفی یا چوب نرم بودن پایه بر رشد اولیه پیوندک پس از گیرایی ریز شاخه پیوندی گردو (ستون های دارای حروف مشترک با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی دار ندارند)

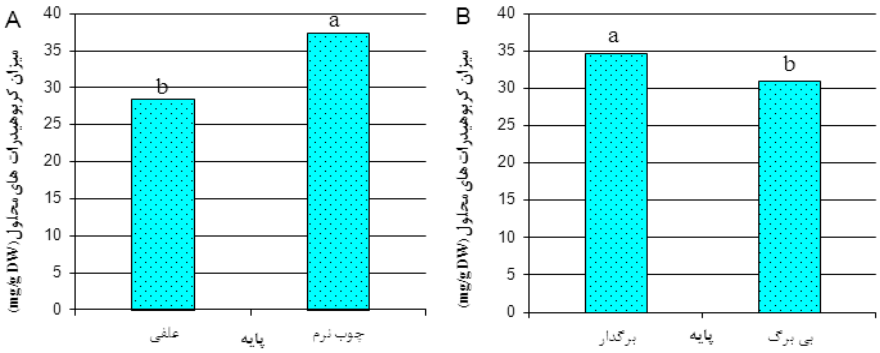
اختلاف رشد اولیه پیوندک در پایه های برگدار و بی برگ در سطح احتمال ۵٪ معنی دار نبود . همچنین تفاوت معنی دار رشد در پایه های علفی و چوب نرم نیز مشاهده نگردید. اثر متقابل برگ و میزان چوبی بودن بر رشد پیوندک در سطح ۱٪ معنی دار بود به نحوی که در پایه های علفی، برگدار بودن پایه رشد پیوندک را افزایش داد ولی در پایه های چوب نرم رشد را کاهش داد (همانند تاثیر برگ بر گیرایی) (شکل ۴). میانگین طول میانگره ها همانند میزان رشد پیوندک در پایه های چوب نرم بی برگ و علفی برگدار به طور معنی داری بیشتر بود. در نتیجه بیشتر بودن میزان رشد پیوندک در پایه های فوق به علت طویل تر بودن میانگره ها بوده است و تعداد گره ها افزایش نیافته است.



شکل ۵- اثر برگدار و علفی یا چوب نرم بودن پایه بر میزان کربوهیدرات های محلول محل پیوند در ریزشاخه پیوندی گردو (ستون های دارای حروف مشترک با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی دار ندارند)

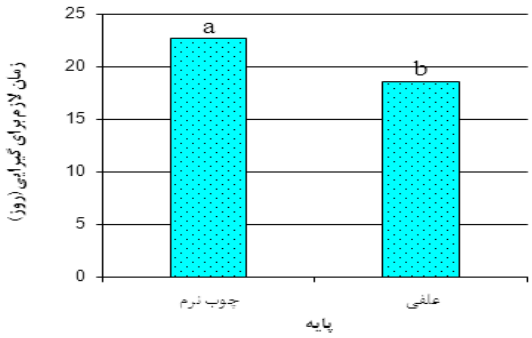
وجود برگ و علفی یا چوب نرم بودن پایه تاثیر معنی داری بر میزان کربوهیدرات های محلول محل پیوند داشتند (جدول ۱). همان طور که انتظار می رفت مقدار کربوهیدرات های محلول در محل پیوند در پایه های چوب نرم در مقایسه با پایه های علفی و همچنین در پایه های برگدار نسبت به پایه های بی برگ بالاتر بود و برگ در پایه های علفی و چوب نرم باعث افزایش ذخیره کربوهیدرات ها گردید ($P\leq$ ۰/۰۱) (شکل ۶)

اگرچه اثر برگ در افزایش کربوهیدرات ها در پایه های علفی بیشتر از پایه های چوب نرم بود (شکل ۵). بالاتر بودن گیرایی و رشد پیوندک همسو با بیشتر بودن کربوهیدراتها در پایه های چوب نرم (۳۷/۳ میلی گرم بر گرم ماده خشک) نسبت به پایه های علفی (۲۸/۴ میلی گرم بر گرم ماده خشک) بود به این مفهوم که گیرایی و رشد پیوندک نیز همانند میزان کربوهیدرات ها در پایه های چوب نرم (۵۸٪) بالاتر از پایه های علفی (۴۶٪) بود (شکل ۲ (B)). برگدار بودن پایه های علفی و چوب نرم باعث افزایش ذخیره کربوهیدرات های محلول گردید اما تنها در پایه های علفی گیرایی و رشد بعدی آن را افزایش داد. در پایه های چوب نرم برگدار نیز اگرچه کربوهیدرات های محلول در مقایسه با پایه های چوب نرم بی برگ بیشتر بود اما گیرایی و رشد بعدی آن در پایه های بی برگ به مراتب بیشتر بود. در مورد برگدار بودن پایه، نتایج حاصل از اندازه گیری کربوهیدرات های محلول با میزان گیرایی همسو نبود به نحوی که در پایه های برگدار اگرچه میزان کربوهیدرات های محلول تا حدودی بالاتر از بی برگ ها بود (شکل ۶ (B)) (۳۴/۷ نسبت به ۳۱/۰ میلی گرم بر گرم ماده خشک) اما گیرایی در پایه های بدون برگ بیشتر بود (۵۶/۶٪ نسبت به ۴۸/۳٪) ($P\leq ۰/۰۵$) (شکل ۶ (A)).



شکل ۶- اثر اصلی برگدار بودن (A) و علفی یا چوب نرم بودن پایه (B) بر میزان کربوهیدرات های محلول محل پیوند در ریز شاخه پیوندی گردو

(در هر شکل ستون های دارای حروف مشترک با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی دار ندارند)



شکل ۷- اثر علفی یا چوب نرم بودن پایه بر زمان لازم برای گیرایی در ریزشاخه پیوندی گردو

(ستون های دارای حروف مشترک با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی دار ندارند)

برگ روی پایه تاثیر چندانی روی زمان لازم برای گیرایی که مشخصه آن شروع رشد پیوندک بود نداشت اما این زمان به طور معنی داری ($P\leq ۰/۰۱$) در پایه های علفی کمتر از پایه های چوب نرم بود به نحوی که در پایه های علفی به طور میانگین ۴ روز گیرایی زودتر از پایه های چوب نرم صورت گرفت (شکل ۷).

گیاهچه های حاصل از ریز شاخه پیوندی به شرایط گلخانه منتقل شده و در گلدانهای بزرگتر حاوی مخلوط

خاکی کشت گردیدند. آنها پس از طی مراحل سازگار سازی به هوای آزاد انتقال یافته و تا یکسال پس از پیوند حدود ۹۰ درصد آنها زنده مانده اند بطوریکه با گذراندن۱۰-۸ هفته سرمادهی مصنوعی مجدداً رشد رویشی خود را شروع نمودند (شکل ۸ (B)).

شکل ۸- وضعیت رشدی گیاهچه حاصل از ریز شاخه پیوندی گردو روی پایه علفی برگدار (A) و رشد گیاهچه های حاصل در دومین فصل رشد در هوای آزاد (B)

بحث

همسویی میزان کربوهیدرات های محلول با گیرایی و رشد پس از آن در پایه های علفی و چوب نرم و عدم همسویی میزان کربوهیدرات ها با گیرایی و رشد پس از آن در پایه های برگدار و بدون برگ می تواند بیانگر تاثیر عوامل دیگری علاوه بر کربوهیدراتها باشد که توسط برگهای جوان تر یا مسن تر در پایه های علفی و چوب نرم ساخته شده و به محل پیوند منتقل می گردند که می توانند گیرایی و رشد بعدی پیوندک ها را تحت تاثیر قرار دهند. فشار ریشه ای، قند های محلول، نسبت C/N، میزان ترکیبات فنلی و میزان تنظیم کننده های رشد گیاهی موجود در بافت های پایه و پیوندک از عوامل فیزیولوژیک موثر برگیرایی پیوند در گردو هستند (Rongting & Pinghai, 1990; Pinghai & Rongting, 1993; Stanisavljvic & Mitrovic, 1997). برگ به عنوان منبع تولید کربوهیدرات ها و مواد رشد گیاهی از سالها پیش شناخته شده است. برخی از مواد رشد گیاهی مثل اکسین ها و سیتوکینین ها باعث افزایش گیرایی و تمایز آوندی می گردند ولی برخی دیگر مثل جیبرلین ها و اسید آبسزیک تاثیر منفی بر فرآیند گیرایی و مسائل پس از آن دارند (Jonard et al., 1993; Ohta, 1991; Shimomura & Fuzihra, 1977; Parkinson & Yeoma, 1982). برگهای جوان و تازه تشکیل شده در تولید اکسین و سیتوکینین نقش دارند در صورتی که برگهای مسن تر می توانند تولید کننده اتیلن و اسید آبسزیک باشند. همچنین شاخه های سریع الرشد تولید کننده جیبرلین فراوان هستند (Arteca, 1995).

اسید جیبرلیک یکی از عوامل محدود کننده گیرایی است و در ساقه های پررشد و علفی بیشتر تولید می شود (Arteca, 1995) همچنین در پایه های علفی نتایج نشان داد که مقدار کربوهیدرات های محلول کمتر بود. از عوامل دیگر می توان به میزان متفاوت ترکیبات پلی فنلی و فشار ریشه ای در بافتهای علفی و چوب نرم اشاره کرد که مجموعه عوامل فوق می تواند باعث تفاوت گیرایی در پایه های علفی و چوب نرم شده باشد. در پایه های علفی برگدار به خاطر جوان تر بودن برگ احتمالاً تولید کربوهیدرات بیشتر به همراه اکسین و سیتوکینین عامل بالاتر بودن گیرایی نسبت به پایه ی علفی بدون برگ بوده است که می تواند دلیلی برای رشد بیشتر پیوندک پس از گیرایی نیز باشد.

آزمایش اخیر نشان داد که در پایه های چوب نرم ذخیره کربوهیدرات های محلول که پیش نیاز برای تولید کالوس و ایجاد انرژی برای مراحل مختلف جوش

خوردن پیوند است بیشتر از بافت های علفی بود اما اینکه برگ روی پایه های چوب نرم منجر به کاهش گیرایی شده شاید به خاطر تولید مواد بازدارنده رشد نظیر اسید آبسزیک توسط برگهای مسن تر این پایه ها باشد که می تواند دلیلی بر کمتر بودن رشد پیوندک روی پایه های چوب نرم برگدار نیز باشد. هرچند تفاوت بسیار زیاد گیرایی در پایه های چوب نرم برگدار و بی برگ را نمی توان تنها با این دلیل توجیه کرد و فاکتورهای دیگری در این تفاوت نقش دارند که نیاز به مطالعات بیشتر دارد. طبق گزارشات Frolich & Ryan (1959) در گیاه ماکادمیا، نگهداری برگ روی پایه پس از پیوند تاثیر زیادی بر گیرایی و همچنین رشد بعدی داشته و آن را افزایش داد ولی در مورد ریز شاخه پیوندی گردو نتایج آزمایش ما حاکی از تاثیر متفاوت برگ در پایه های علفی و چوب نرم بود. نتایج این آزمایش نشان داد که بالاتر بودن میزان کربوهیدرات ها در پایه های چوب نرم منجر به سریع تر شدن فرآیند گیرایی نشده است و اگرچه میزان کربوهیدرات های محلول در پایه های چوب نرم بالاتر بود اما زمان لازم برای گیرایی در پایه های علفی کوتاه تر بود. این موضوع در مورد پیوند سبز (Green grafing) انگور نیز مشاهده شده است (Carlson, 1963). عدم تمایز کامل بافت ها و سرعت بالای تقسیم سلولی و در نتیجه ترمیم سریعتر بافت برش یافته در بافت های علفی نسبت به بافتهای چوبی و یا چوب نرم، علت سریع تر بودن جوش خوردن پیوند در بافت های علفی ذکر شده است.

یکی از مهمترین مزایای ریز شاخه پیوندی گردو نسبت به بسیاری از روشهای تکثیر غیرجنسی سریعتر بودن رسیدن به گیاهچه تکثیر یافته در این روش است. به عنوان مثال در مورد پیوند یا کوپیوند گردو عمل پیوند در سن یک یا دو سالگی پایه صورت می گیرد اما در این روش تنها چند هفته پس از جوانه زنی بذر می توان به گیاهچه های پیوندی دست یافت. این مزیت مهم می تواند تا حدودی خسارت ناشی از تلفات پیوند را کاهش دهد زیرا در صورت عدم موفقیت پیوند زیان از دست دادن گیاهچه چند هفته ای نسبت به پایه یک یا دو ساله کمتر است. اگرچه در پیوند یا کوپیوند می توان در صورت نگرفتن پیوند در سال بعد دوباره پیوند را روی همان پایه تکرار کرد اما ناگفته نماند که در این روش نیز در صورت نگرفتن پیوند فقط چند هفته پس از قطع کردن محل پیوند قبلی روی ساقه تازه روئیده می توان مجدداً عمل پیوند را تکرار کرد. علاوه براین، این نوع پیوند مزایای دیگری نیز دارد که از جمله آنها می توان به امکان تهیه مقدار زیادی پیوندک از یک گیاه مادری در صورت هرس سرشاخه زنی مناسب در اواخر فصل خواب درخت و امکان پیوند در دوره طولانی در یکسال اشاره کرد.

سپاسگزاری

این تحقیق در قالب طرح پژوهشی شماره ۷۳۱۳۱۹۵۱/۱/۰۳ با استفاده از اعتبارات پژوهشی دانشگاه تهران انجام شده است.

REFERENCES

1. Arteca, R. N. (1995). *Plant growth substances – principles & application*. (pp. 47-95). Chapman & Hall.
2. Atefi, J. (1997). Comparison of hypocotyl and hot callus cable graft with traditional grafting method. *Acta Horticulturae*, 442, 309-312.
3. Avanzato, D. (1997). Walnut graft-union callused by heating cable. *International plant propagators*, 47, 211-214.
4. Carlson, V. (1963). How to green graft grapes. *California Agriculture Extension*, 1, 115.
5. Chabuksawar, M. M. & Deodhar, M. A. (2006). Restoration of rooting competence in a mature plant of *Garcinia indica* through serial shoot tip grafting *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 108, 194-199.
6. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Roberts, P. A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
7. Ebrahimi, A., Vahdati, K. & Fallahi, E. (2006). Improved success of persian walnut grafting under environmentally controlled conditions. *International Journal of Fruit Science*, 6, 3-12.
8. Edriss, M. H. & Burger, D. W. (1984). Micro-grafting shoot-tip culture of Citrus on tree Trifoliolate rootstock. *Scientia Horticulturae*, 23, 255-259.
9. Ewens, E. & Felker, P. (2003). The potential of mini-grafting for large-scale production of *Prosopis alba*

clones. *Journal of Arid Environments*, 55, 379–387.
10. FAO. (2011). FAOSTAT database results. http://faostat.Fao.org.faostat. Servlet.
11. Frolich, E. F & Ryan, C. F. (1959). An experiment on the effect of retaining leaves on the rootstock in grafting macadamias. *Reprint from CMS,*1, 1-3.
12. Gandev, S. (2007). Budding and grafting of the walnut (*Juglans regia* L.) and their effectiveness in Bulgaria (Review). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 13, 683-689.
13. Huang, L. C., Liu. S. F., Huang, B. L., Murashige, T., Mahdi, E. F. M. & Van Gundy, R. (1992). Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks *in vitro*: A model for phase reversal of trees. *Plant Physiology*, 98, 166–173.
14. Jonard, R., Hugard, J., Macheix, J., Martinez, J., Mosella-Chancel, L., Poessel, J. L. & Villmure, P. (1983). *In vitro* micrografting and its applications to fruit science. *Scientia Horticulturae*, 20, 147-159.
15. Katoh. N., Yui, M., Sato, S., Shirai, T., Yuasa, H. & Hagimori, M. (2003). Production of virus-free plants from virus-infected sweet pepper by *in vitro* grafting. *Scientia Horticulturae*, 100, 1–6.
16. Khalafalla, M. M. & Daffalla, H. M. (2008). *In vitro* micropropagation and micrografting of gum Arabic tree [*Acacia Senegal* (L.) Wild]. *International Journal of Sustain Crop Production*, 3, 19-27.
17. Lagerstedt, H. B. (1981). A new device for hot-callusing graft unions. *HortScience*, 16, 529-530.
18. Navarro, L., Roistacher, C. N. & Murashige, T. (1975). Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 100, 471–479.
19. Ohta, Y. (1991). Graft-transformation, the mechanism for graft-induced genetic changes in higher plants. *Euphytica, Netherlands Journal of Plant Breeding*, 55, 91-99.
20. Onay, A., Pirinc, V., Adiyaman, F., Isikalan, C., Tilkat, E. & Basaran, D. (2003). *In vivo* and *in vitro* micrografting of pistachio, *Pistacia vera* L. cv Siirt. *Turkey Journal of Biology*, 27, 95-100
21. Onay, A., Pirinc, V., Yildirim, H. & Basaran, D. (2004). *In vitro* micrografting of pistachio (*Pistacia vera* L. var Siirt). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77, 215–219.
22. Özkan, Y., Edize, Y. & Auca, Y. (2001). A study on propagation with patch budding of some walnut cultivars (*Juglans regia* L.). *Acta Horticulturae*, 544, 521-525.
23. Parkinson, M. & Yeoman, M. M. (1982). Graft formation in cultured explanted internode. *New Phytologist,* 91, 711-19.
24. Pasquale, F., Giuffrida, S. & Carimi, F. (1999). Minigrafting of shoots, roots, inverted roots, and somatic embryos for rescue of *in vitro* citrus regenerates. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124,152–157.
25. Pathirana, R. & McKenzie, M. (2005). Early detection of grapevine leafroll virus in *Vitis vinifera* using *in vitro* micrografting. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81, 11–18.
26. Pinghai, D. & Rongting, Xi. (1993). Effect of phenols on survival of walnut grafting. *Acta Horticulturae*, 311, 134-140.
27. Raharjo, S. H. T. & Lits, 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, 1-9.
28. Reil, W. O., Leslie, C. A., Forde. H. I. & McKenna. J. R. (1998). Propagation. In: D. E. Ramos (ed) *Walnut production manual*. (pp. 71-83). University of California division of agriculture and natural resources publication.
29. Rongting, X. & Pinghai, D. (1990). Theory and practice of walnut grafting. *Acta Hotrticalturae*, 284, 69-88.
30. Rongting, X. & Pinghai, D. (1993). A study on uniting process of walnut grafting and the factors affecting. *Acta Hotrticalturae*, 311, 160-170.
31. Shimomura, T. & Fuzihara, K. (1977). Physiological study of graft union formation in Cactus. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 45, 397-406.
32. Solar, A., Stampar, F., Trost, M., Barbo, J. & Avsec, S. (2001). Comparison of different propagation methods in walnut (*Juglans regia* L.) made in Slovenia. *Acta Horticulturae*, 544, 527-530.
33. Soleimani, A., rabiee, V., Hasani, D. & Amiri, M. E. 2008. Effects of rootstock and cultivar on propagation of Persian walnut (*Juglans regia* L.) using hypocotyle grafting. *Seed and Plant Production Journal*, 25, 93-101. (In Farsi)
34. Stanisavljevic, M. & Mitrovic, M. (1997). Effect of variety on success grafting and development of nursery trees of walnut (*J. regia*). *Acta Horticulturae*, 442, 281-283.
35. Vahdati, K. & Zareie, N. (2005). Evaluation of side-stube and hypocotyl grafting efficiency for walnut propagation in Iran. *Acta Horticulturae*, 705, 347-350.
36. Wetmore, R. H. & Rier, J. P. (1963). Experimental induction of vascular tissue in callus of angiosperm. *American Journal of Botany*, 50, 418-30.