

مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۵، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱

ISSN ۲۷۱۶-۹۸۰۴ الکترونیکی، ISSN ۲۷۱۷-۰۶۳۲ چاپی

تکنیک ریزپیوندی و کاربردهای آن در کشاورزی و منابع طبیعی



نوع مقاله: مروری [20.1001.1.27170632.1401.15.1.2.6](https://doi.org/10.1001.1.27170632.1401.15.1.2.6)

سعید سهیلی‌وند

۱- استادیار پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

soheilivand@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۹، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۱۸

صفحه ۱۶-۱

چکیده

ریزپیوندی یک نوع پیوند شامل قرار دادن یک مریستم کوچک یا قسمتی از نوک شاخساره بر روی پایه حاصل از نهال‌های سترون درون شیشه‌ای است. ریزپیوندی درون‌شیشه‌ای مزایای بسیاری را برای تولید کنندگان عرصه کشاورزی و منابع طبیعی فراهم می‌کند. میزان موفقیت در ریزپیوندی به عوامل مختلفی همچون نوع رقم یا ژنوتیپ، طول پیوندک و مرحله رشدی پایه و همچنین به سازگار کردن نهال‌های پیوندی در شرایط گلخانه بستگی دارد. در این مقاله، کاربردهای متعدد تکنیک ریزپیوندی مانند تشخیص زودهنگام آلودگی‌های ویروسی، ویروئیدی و فیتوپلاسمایی، تولید گیاهان پیوندی عاری از بیماری‌های ویروس و شبه‌ویروسی، حذف و غلبه بر محدودیت‌های اکولوژیکی و محیطی، ارائه روشی موثر برای تولید نهال، جوان‌سازی بافت‌های بالغ و کوتاه کردن مرحله جوانی در درختان میوه، احیاء دوباره نوک-شاخساره‌های منجمد (cryopreservation)، حمل و نقل و امکان تبادل سریع ژرم‌پلاسما سالم، تسهیل در شناسایی زودهنگام ناسازگاری پیوند، نجات شاخساره‌های بدون ریشه و جنین‌های ناقص، مطالعه ارتباطات سیگنالی در بخش‌های مختلف گیاه و تولید گیاهان پلوئیدی مورد بحث و بررسی قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: پیوندک، پایه، کشت درون‌شیشه، نوک-شاخساره.

مقدمه

پیوند (grafting) و ریزپیوندی (micrografting) دو تکنیک مشابه هم هستند که بر حسب ویژگی‌هایی همچون اندازه پیوندک و محل انجام آن، بسته به شرایط طبیعی رشد گیاه و یا درون شیشه (*in vitro*) با هم فرق دارند. پیوند یکی از روش‌های پرکاربرد، متداول و قدیمی در تکثیر گیاهان مطلوب است که به‌طور گسترده از زمان پیدایش کشاورزی استفاده شده است. در مقابل، تکنیک ریزپیوندی روشی است نوپا که با پیدایش تکنیک‌های کشت بافت و انتقال ژن، گسترش یافته و به وفور از آن در گیاهان مختلف برای اهداف متنوع استفاده می‌شود. پیوند سنتی با وجود قدمت بالا در بین کشاورزان به خصوص باغداران، دارای معایبی همچون انتقال بیماری و عدم کنترل کامل شرایط محیطی است. حل چنین معضلاتی با استفاده از تکنیک ریزپیوندی و به کمک متخصصان و کارشناسان می‌تواند در حد زیادی برطرف شود. ریزپیوندی قادر است بسیاری از مشکلات ناشی از عدم ریشه‌زنی برخی از شاخساره‌های کشت بافتی را رفع نموده و اصطلاحاً آنها را نجات دهد. البته این تکنیک علاوه بر اینکه در شرایط درون شیشه قابل انجام است می‌تواند با رعایت برخی شرایط در محیط

خارج شیشه‌ای نیز موفق باشد (Vidoy-Mercado

et al. 2021).

اجزای اصلی در ریزپیوندی همانند پیوند متعارف از دو بخش اساسی ریزپیوندک و پایه‌ای که پیوندک بر روی آن پیوند می‌شود، تشکیل می‌شود. فرق اساسی بین ریزپیوندی و پیوندهای معمول باغبانی، در اندازه کوچک ریزپیوندک بوده که گاهی در حد سلول‌های نوک مریستم جوانه است. بنابراین موفقیت این تکنیک شرایط خاصی را می‌طلبد. چنین ریزپیوندهایی، نیاز به دقت و مراقبت‌های خاص دارد و معمولاً در شرایط ضدعفونی شده و کنترل شده درون شیشه انجام می‌شود. با توجه به ویژگی‌ها و شرایط خاص تکنیک ریزپیوندی، این روش امکانات بسیار متنوع‌تر و جدیدتری را برای رسیدن به مطالعات علمی و حتی موفقیت‌های تجاری در اختیار قرار می‌دهد که چنین موقعیت‌هایی در پیوند متعارف سنتی غیرممکن بوده و یا به سختی دست‌یافتی است (Davoudi Pahnekolayi et al. 2019).

بنابراین شناخت دقیق تکنیک ریزپیوندی و گستره استفاده از آن در طیف وسیعی از گیاهان، برای بهره‌مندی بهتر، ضروری به نظر می‌رسد. در ادامه کاربردهای گسترده این تکنیک و استفاده از آن در گونه‌های مختلف گیاهی بحث خواهد شد.

"سهیلی‌وند، تکنیک ریزپیوندی و کاربردهای آن در کشاورزی و منابع طبیعی"

کاربردهای تکنیک ریزپیوندی در گیاهان

همانطوری که عنوان شد ریزپیوندی در علوم کشاورزی و منابع طبیعی به خصوص گیاهان چوبی استفاده شده است و حتی در برخی از خانواده‌های گیاهی مانند مرکبات به دلیل ریشه‌زایی سخت و یا کند آنها در کشت بافت و انتقال ژن، به طور متداول کاربرد دارد (Omar et al. 2018). به عنوان مثال در گیاهان و گونه‌های دیگری مانند پسته (*Pistacia vera*) (Onay et al. 2004; Can et al. 2006)، گل شکرپاره (*Protea cynaroides*) (Wu et al. 2007)، هندوانه (*Citrullus lanatus*) (Zhang et al. 2014)، زیتون (*Olea europea* L.) (Farahani et al. 2011)، بادام (*Prunus dulcis*) (Mill. (Yıldırım et al. 2010)، گلابی (*Pyrus communis*) (Hassanen. 2013)، گیلاس (*Prunus avium*) (Naddaf et al. 2020)، هلو (*Prunus persica* L.) (Deogratias et al. 1985)، گردو (*Juglans regia* L.) (Ribeiro et al. 2022)، انگور (*Vitis vinifera*) (Kim et al. 2005) و سیب (*Malus domestica* Borkh.) (Li et al. 2016) به طور متداول استفاده می‌شود.

در ادامه با جزئیات بیشتر به کاربردهای متنوع این تکنیک در کشاورزی و مطالعات زیستی اشاره می‌شود.

شاخصی برای تشخیص آلودگی‌های ویروسی،

ویروئیدی و فایتوپلاسما

یکی از کاربردهای ریزپیوندی، تشخیص سریع علائم بیماری‌های ویروسی، ویروئیدی و فیتوپلاسمایی است. این تکنیک، نسبت به پیوند معمول در گلخانه، می‌تواند در مدت زمان کمتری، بیماری را تشخیص داده و یک مزیت مهم، در سرعت بخشیدن به اقدامات مدیریتی و کنترل بیماری به شمار آید (Valat et al. 2003).

مزیت دیگر ریزپیوندی در شرایط *in vitro* ایمنی بالای این روش در جهت جلوگیری از نشر بیماری است. چرا که در پیوندهای معمول گلخانه‌ای، احتمال نشر بیماری نسبت به حالت درون شیشه‌ای بیشتر است. در مطالعه‌ای با استفاده از تکنیک ریزپیوندی دو نوع فیتوپلاسمای apple stone fruit yellows (ESFY) proliferation (AP) را از طریق پیوندک‌های آلوده، به پایه‌های *Malus* و *Prunus* شاهد منتقل کردند. در این تحقیق روند انتقال بیماری به پایه‌ها در سه ماه متوالی بررسی شد. نتایج نشان داد که آلودگی با گذشت زمان افزایش می‌یابد (Jarousch et al. 1999).

در درخت مو، علائم ویروس GLRaV VIII با برخی از علائم فیزیولوژیکی مانند کمبود آهن و

تولید گیاهان عاری از بیماری

نیاز برای تولید گیاهان سالم و عاری از بیماری یکی از اصول در توسعه کشاورزی و بخصوص صنعت باغداری است. برای رسیدن به یک روند پایدار در تولید نهال‌های سالم در وارسته‌های مطلوب، روش‌های سنتی پیوند، به دلیل دارا بودن مشکلات متعدد، قادر به تامین این خواسته نبوده و رویکرد جدید ریزپیوندی می‌تواند یک روش جایگزین و دست‌یافتی برای احداث و یا اصلاح یک باغ باشد. زیرا که در مدت کوتاه‌تر قادر است کلنی از گیاهان و وارسته‌های مطلوب یکنواخت و سالم را تولید کند. برای تولید گیاهان سالم با استفاده از تکنیک ریزپیوندی، گزارش‌های مختلفی ارائه شده است. در ریزپیوندی برای تولید گیاهان عاری از ویروس سعی می‌شود تا کوچکترین قطعه قابل پیوند به‌عنوان پیوندک استفاده شود. این ریزپیوندها، قسمت مریستم نوک ساقه را در برمی‌گیرد که به‌دلیل سرعت بالای تکثیر این سلول‌ها و نبود سیستم‌های آوندی توسعه یافته در این منطقه، بهترین و سالم‌ترین نوع ریزپیوند خواهند بود. برای مقابله با برخی از بیماری‌های مخرب، همانند بیماری‌های فیتوپلاسمایی، در درختان مثمر هسته‌دار، شاید تنها راه ممکن، استفاده از پایه‌ها و پیوندک‌های سالم و مقاوم

منیزیم همسان است. بنابراین با استفاده از ریزپیوندی پیوندک‌های گیاهان مشکوک به این بیماری با پایه‌های عاری از ویروس و مشاهده علائم آن در برگ‌های پایه، می‌توان به راحتی وجود بیماری را اثبات کرد. میزان موفقیت و گیرایی ریزپیوندی در این گیاه ۷۵-۸۵ درصد گزارش شده است (Pathirana and McKenzie 2005a).

علاوه بر ویروس GLRaVIII، ریزپیوندی برای تشخیص ویروس corky-bark مو نیز استفاده شده است (Tanne et al. 1993). برای مطالعه جامع‌تر از پایه‌های مختلفی برای بروز علائم بیماری دو نوع ویروس استفاده شده بود. نتایج این تحقیق نشان داد که در مورد ویروس GLRaVIII اختلاف معنی‌داری در بروز علائم بیماری ویروسی در پایه‌های مختلف دیده نمی‌شود (Pathirana and McKenzie 2005a).

در حالی که در مورد ویروس corky-bark، مدت زمان ظهور علائم در پایه‌های مختلف، متفاوت بوده است. به‌طور مثال بر روی پایه LN 33، علائم پس از گذشت ۸-۱۲ هفته مشاهده شدند. در حالی که در پایه R110 در عرض کمتر از ۳۰ روز علائم دیده شد (Tanne et al. 1993).

"سهیلی‌وند، تکنیک ریزپیوندی و کاربردهای آن در کشاورزی و منابع طبیعی"

باشد (Jarausch et al. 1999). این مطلب به نوعی در مورد بیماری‌های ویروسی و ویروئیدی نیز صادق است. در مورد برخی ویروئیدها، هنوز سیستم انتقال آنها درون گیاه، مشخص نشده است. به‌طور مثال برای ویروئیدهای Pospiviroidae که در هسته تکثیر می‌شوند و یا ویروئیدهای Avsunviroidae که در کلروپلاست تکثیر می‌شوند، سیستم انتقال مشخصی تعیین نشده است. برای برخی دیگر از ویروئیدها، مانند CCCVd (coconut cadang-cadang viroid) و CEVd (citrus exocortis viroid)، مشخص شده که در آوندهای آبکش قرار داشته و در آنجا تکثیر و منتقل می‌شوند (Bonfiglioli et al. 1996). بنابراین با استفاده از ناحیه مریستم انتهایی فاقد بافت آوند آبکش به‌عنوان ریزپیوندک می‌توان گیاهان سالم تولید کرد (Barba et al. 2003).

میزان موفقیت در تولید گیاهان عاری از بیماری به اندازه ریزپیوندک بستگی دارد. در مورد گیاه آووکادو (*Persea americana*)، از دو نوع سائز ریزپیوندک، ۰/۵ میلی‌متر و ۱ میلی‌متر از منطقه نوک مریستم به همراه برگ‌های اولیه آن استفاده شد که بر روی پایه‌های عاری از ویروئید ASBVd در محیط *in vitro* پیوند شدند. نتایج پیوند، با استفاده از تکنیک RT-PCR مشخص کرد که

نمی‌توان با سائزهای بزرگ پیوندک، ویروئید را حذف کرد. (Suarez et al. 2005).

اندازه ریزپیوندک هرچه کمتر باشد، احتمال تولید گیاهان سالم بیشتر خواهد بود. به‌طوری که اگر اندازه آن از محدوده خاصی بیشتر شود، معمولاً تمام یا برخی از گیاهان پیوند شده، آلوده خواهند شد. به‌عنوان نمونه، در kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour *) برای تولید گیاهان عاری از ویروس ICRSV (Indian citrus ringspot virus)، از پیوندک‌های با اندازه‌های مختلف ۰/۲-۱ میلی‌متری استفاده شده بود. با تکنیک‌های الیزا و RT-PCR مشخص شد که تمام گیاهان حاصل از پیوندک ۰/۲ میلی‌متری سالم و عاری از ویروس هستند. در حالیکه فقط حدود ۲۰ درصد گیاهان حاصل از ریزپیوندی با پیوندک ۰/۳ میلی‌متر، سالم بودند (Singh et al. 2008).

باززایی گیاهان سالم از گیاهان آلوده به ویروئید CEVd مرکبات، به کمک تکنیک ریزپیوندی انجام شده است (Murashige et al. 1972). با مقایسه این مطالعات مشخص می‌شود که برای تولید گیاهان عاری از بیماری، بایستی پیوندک بسیار ریز بوده و از ناحیه سلول‌های مریستمی باشد. بنابراین

تکنیک‌های پیوند متداول و سنتی، در این موارد کارساز نبوده و فقط بایستی از تکنیک ریزپیوندی استفاده شود.

تولید گیاهان مقاوم به استرس‌های زنده و غیرزنده

القاء تحمل یا مقاومت در مقابل برخی بیماری‌ها یا آفات از طریق پیوندهای معمول امکان‌پذیر است. این مقاومت در گیاهانی مانند خیار، بادمجان، خربزه، هندوانه و گوجه فرنگی از طریق پیوند ایجاد شده است (King et al. 2008). این هدف، اغلب از طریق انتخاب پایه مقاوم به بیماری‌های خاکری صورت می‌گیرد که در نهایت، باعث می‌شود یک وارپته بازارپسند بر روی یک پایه مقاوم معمولاً از نوع وحشی، پیوند شود. چنین روشی، در ریزپیوندی نیز استفاده می‌شود. معمولاً با انتخاب پایه‌های مناسب و مقاوم به انواع استرس‌ها، می‌توان گیاهانی تولید کرد که مقاوم به بیماری‌های خاکری بوده و در عین حال، در مقابل بسیاری از استرس‌ها و تنش‌های غیرزیستی متحمل باشند. حتی با ریزپیوند پیوندک‌های آلوده بر روی پایه‌هایی با ژنوتیپ‌های متنوع می‌توان پایه‌های مقاوم سازگار با آنها را تشخیص داده و در تولید گیاهان مقاوم از آنها استفاده کرد (Jarausch et al. 1999).

چنین استراتژی برای چندین خانواده مختلف گیاهی انجام شده است. در تحقیقی کلن‌های متحمل به ویروس PPV (*plum pox virus*) گونه‌های جنس *Prunus*، با استفاده از تکنیک ریزپیوندی غربال و ارزیابی شدند (Lansac et al. 1997). در گیاه مو نیز از تکنیک ریزپیوندی، به عنوان ابزاری برای انتخاب پایه‌های متحمل به ویروس استفاده شده است (Pathirana and McKenzie 2005b).

در برخی گیاهان پایه‌های مقاوم مشخص بوده و به طور متداول، برای تولید گیاهان مقاوم، استفاده می‌شوند. برای مثال از پایه‌های مناسب برای ریزپیوندی مرکبات، می‌توان به نارنج سه برگ *Poncirus trifoliata* و *Carrizo* اشاره کرد (Volk et al. 2015). همچنین در خانواده *Citrus*، استفاده از گونه‌های لیموترش (*Citrus aurantium*)، لیمو سنگی (*Citrus limonia* و *Citrus linton*) (Osbeck 2010) به عنوان پایه در ریزپیوندی گزارش شده است (Jajoo. 2010).

ازدیاد و تولید انبوه از طریق ریزپیوندی

یکی از کاربردهای مهم دیگر ریزپیوندی، تولید انبوه گیاهان، به خصوص درختان است. جهت بالا بردن میزان موفقیت ریزپیوندی معمولاً از

"سهیلی‌وند، تکنیک ریزپیوندی و کاربردهای آن در کشاورزی و منابع طبیعی"

جوان‌سازی درختان بالغ

ریزپیوندی می‌تواند روشی برای جوان‌سازی گیاهان چوبی باشد؛ به خصوص در مورد آنهایی که قلمه‌هایشان به سختی ریشه‌دار می‌شود. با این روش به راحتی می‌توان جوانه‌ها را (به‌عنوان پیوندک) بر روی پایه‌های بذری پیوند کرد. در بادام به آسانی و بدون اعمال هیچ پیش‌تیماری می‌توان با موفقیت بالا، گیاهچه‌های جدید ریشه‌دار تولید کرد. جوان‌سازی بادام، در محیط *in vitro* به دلیل ازدیاد شاخساره و رشد سریع‌تر آنها و همچنین تولید ریشه‌های جانبی بیشتر، به مراتب دست یافتنی‌تر از حالتی است که در محیط *in vivo* انجام شود (Yıldırım et al. 2010). بسیاری از فاکتورها، می‌توانند در جوان‌سازی یک گیاه نقش داشته باشند. روش‌های مختلفی در ریزپیوندی، می‌تواند با اعمال برخی تیمارهای استرس همچون، تیمارهای حرارتی، هورمونی و اسمزی انجام شود (von Aderkas and Bonga, 2000).

احیاء دوباره بافت‌های منجمد شده

انجماد بافت‌های زنده در ازت و نگهداری بلندمدت آنها، در برخی از گیاهان متداول است. نمونه‌های پیوندک، از جوانه‌های انواع گونه‌های مختلف خانواده مرکبات که به بیماری‌ها و

تیمارهای مختلف هورمونی استفاده می‌شود. در برخی از گزارش‌های علمی چنین عنوان شده که تنظیم‌کننده‌های رشد موجود در محیط کشت، میزان تقسیم سلولی مریستمی زاینده را افزایش داده و وجود مواد غذایی برای فعال شدن و تشکیل کالوس بین پایه و ریزپیوندک یک عامل مهم محسوب می‌شود (Hussain et al. 2014). در ریزپیوندی گیلان به‌ترین تیمار هورمونی یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین (BA) نسبت به بقیه تیمارها گزارش شده است که با ۳۹ درصد بیشترین درصد موفقیت پیوند و با میانگین ۳/۲ روز زودترین زمان گیرایی پیوند را نشان داده است (Naddaf et al. 2020).

در درخت شاه بلوط شیرین (*Castanea sativa*) برای تولید انبوه، پروتکلی ارائه شده است که از نظر تئوری می‌توان از طریق ریزپیوندی سالانه حدود ۲۱ هزار نهال پیوندی تولید کرد (Fernández-Lorenzo and Crecente-Campo, 2009). موفقیت ریزپیوندی به عوامل گوناگونی همچون، محل و مرحله رشد و سن درختی که پیوندک از آن گرفته می‌شود، بستگی دارد. با این حال اثرات بسیاری از این عوامل را می‌توان با بهینه کردن شرایط ریزپیوندی کم‌رنگ‌تر کرد (Fraga et al. 2002).

نمونه دیگر، انتقال ژرم پلاسماهای بادام هندی (*Anacardium occidentale* L.) است که به منظور تبادل مواد گیاهی بین کشورها و مناطق مختلف، این تکنیک برای آن، بهینه شده است (Mnoney and Mantell, 2001).

ارزیابی ناسازگاری (Incompatibility) پیوند

یکی از کاربردهای جالب ریزپیوندی، بررسی سازگاری و ناسازگاری پیوندک‌ها و پایه‌ها، در محیط *in vitro* است. در بسیاری از درختان بخصوص درختان مثمر، می‌توان با استفاده از پایه‌های متعدد و پیوندک‌های مختلف و انجام ریزپیوندی، سازگاری آنها را نسبت به هم مطالعه کرد. این بررسی محدود به فصل یا زمان خاصی نبوده و در یک فضای کوچک و در کمترین زمان قابل اجراست. در تحقیقی بر روی پسته (*P. vera* L. var. Siirt) ریزپیوندی ژنوتیپ خاص، بر روی شش پایه وحشی (*P. terebinthus*, *P. mutica*, *P. atlantica* و *P. khinjuk*) بررسی و به دلیل ناسازگاری پیوندک و پایه ناموفق گزارش شده است (Can et al. 2006).

در ریزپیوندی گیلان (*P. avium* L.) در برخی نمونه‌ها علائم خشکیدگی و کمبود برخی مواد میکرو در گیاه پیوندی مشاهده شد که نشان از

استرس‌ها مقاومت نشان داده بودند، انتخاب، استریل و درازت مایع برای طولانی مدت در بانک‌های ژنی نگه‌داری شده‌اند (Volk et al. 2012).

نکته مهم این است که، این جوانه‌ها، بایستی پس از خارج شدن از حالت انجماد، بر روی پایه‌های مناسب پیوند شوند. تکنیک ریزپیوندی، روش کارآمدی است که در گونه‌های این خانواده، احیای ژنوتیپ‌های منجمد شده را، با موفقیت حدود ۵۳ درصد، تضمین می‌کند (Volk et al. 2015).

تبادل ژرم پلاسما (germplasm exchange) سالم

در تبادلات ژرم پلاسمی بین مناطق یا کشورها، این احتمال وجود دارد که برخی از بیماری‌ها به مناطق دیگر، منتقل شوند. برای حل این معضل و انتقال راحت‌تر مواد گیاهی، یکی از راهکارها، استفاده از تکنیک ریزپیوندی است. برای مثال، در گونه‌های مختلف مرکبات برای حذف بیماری‌ها و تولید گیاهان سالم، از منطقه مرستمی ژنوتیپ‌های منتخب، به عنوان پیوندک و از نارنج سه برگ به عنوان پایه ریزپیوندی استفاده می‌شود. با انتقال چنین گیاهان پیوند شده به جای والد دهنده پیوند، احتمال انتقال بیماری‌ها به همراه گیاهان به حداقل می‌رسد (Navarro et al. 1991).

"سهیلی‌وند، تکنیک ریزپیوندی و کاربردهای آن در کشاورزی و منابع طبیعی"

ناسازگاری ریزپیوندک با پایه بوده است (Amiri 2006).

نجات شاخساره‌های بدون ریشه و جنین‌های ناقص

کشت بافت برخی از گیاهان با مشکلات خاصی روبرو است. برخی از گونه‌ها نسبت به ریشه‌زایی سرسخت بوده و پس از تولید شاخساره، رشد آنها بسیار کند بوده و یا ریشه‌دار نمی‌شوند و یا درصد ریشه‌زایی پایین گزارش شده است. چنین شرایطی در جنین‌زایی سوماتیکی برخی از گیاهان نیز مشاهده شده است. بهترین راه‌حل ممکن، ریزپیوندی آنها بر روی پایه‌های ریشه‌دار است. در کشت بافت گیاه شکرپاره (*P. cynaroides*) مشکل اصلی ناتوانی شاخساره‌ها در تولید ریشه است. به همین دلیل شاید تنها راه ممکن برای حفظ و انتقال گیاهچه‌ها به محیط خاک، استفاده از روش ریزپیوندی و پیوند شاخساره‌ها به پایه‌های بذری است (Wu et al. 2007). در گونه‌های مختلف خانواده Citrus مشکل ریشه‌زایی وجود دارد که برای نجات شاخساره‌ها یا جنین‌های بدون ریشه، از همین روش استفاده می‌شود. علاوه‌بر کشت بافت، در فرایند انتقال ژن نیز، به دلیل استرس عوامل انتخابگر برای انتخاب گیاهان تراریخته از غیرتراریخته، گزارش شده که شاخساره‌های تراریخته قادر به تولید ریشه نیستند.

بنابراین تنها راهکار، کمک گرفتن از تکنیک ریزپیوندی است. چنین موردی در انتقال ژن به سیب نیز مشاهده شده است. بنابراین لاین‌های تراریخته بر روی پایه‌های ریشه‌دار پیوند شدند (Lane et al. 2003).

بررسی پیام‌های بین سلولی از راه دور در گیاه

(long-distance signaling)

پیام‌های سلولی که از طریق آوند آبکش منتقل می‌شوند، در ارتباطاتی که بین اندام‌های گیاهی برقرار است، نقش بسیار مهمی دارند. چنین ارتباطاتی به گیاه این توانایی را می‌دهد که تمام بافت‌ها و اندام‌هایش از تغییرات محیطی و شرایط فیزیولوژیکی دیگر سلول‌ها باخبر شوند و بتوانند پاسخ مناسبی به این محرک‌ها بدهند. تکنیک ریزپیوندی فرصت بسیار مناسبی، برای بررسی پیام‌های متفاوتی همچون: گلدهی، غده‌زایی، گره‌زایی، شاخه‌زایی، خاموشی ژن (PTGS: post-transcriptional gene silencing) و حتی پیام‌های القاء مقاومت به بیماری و مطالعه ساعت زیستی گیاهان را فراهم ساخته است (Inoue et al. 2018). این مطالعات معمولاً با ریزپیوندی گیاهان تراریخته و توسط آنالیزهای هیستوشیمیایی ژن β -glucuronidase (GUS) انجام می‌شود (Turnbull et al. 2002).

در آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) با استفاده از ریزپیوندی گیاه تراریخته، مسیرهای پیام‌رسانی گلدهی در پیوندک و پایه بررسی شده است (Notaguchi et al. 2009). در توتون وحشی (*Nicotiana attenuate*) نیز جریان پیام‌رسانی بین اندام هوایی و ریشه و همچنین جریان siRNAها توسط تکنیک ریزپیوندی مطالعه شده است (Fragoso et al. 2011). در مطالعه دیگری در آرابیدوپسیس، نقش کوتیلدون را در تحریک گلدهی با ریزپیوندی کوتیلدون اثبات کردند (Yoo et al. 2013).

تولید گیاهان پلی‌پلوئیدی

امکان تولید گیاهان پلی‌پلوئیدی با تکنیک ریزپیوندی نوک شاخساره، همزمان با بکار بردن مواد جهش‌زا، وجود دارد. این روش ترکیبی در تولید گیاهان پلی‌پلوئیدی مرکبات با استفاده از ریزپیوندی به همراه موادی همچون کلشی‌سین (colshicine) و اوریزالین (orizalin) انجام شده و گیاهان تتراپلوئیدی به دست آمده که به‌عنوان پایه مادری در تولید گیاهان تری‌پلوئید بدون بذر به کار رفته‌اند. با تولید و انتخاب گیاهان تتراپلوئید و تلاقی آنها با دیپلوئیدها در عرض سه سال، بیش از ۳۲۵۰ گیاه هیبرید به دست آمده است (Aleza et al. 2009).

عوامل موثر در موفقیت ریزپیوندی

همان‌گونه که اشاره شد تکنیک ریزپیوندی ابزار مهمی است که در بسیاری از گونه‌های گیاهی برای مقاصد مختلف استفاده می‌شود. عوامل مختلفی در میزان موفقیت ریزپیوندی دخیل هستند که در ادامه به آنها پرداخته می‌شود.

ژنوتیپ

گونه‌های مختلف گیاهی، پاسخ‌های مختلفی به پیوند و ریزپیوندی می‌دهند. حتی این اختلاف در حد ژنوتیپ‌های مختلف یک گونه نیز مشاهده شده است. ژنوتیپ‌های متنوع مرکبات، به ریزپیوندی، پاسخ‌های متفاوتی می‌دهند. به‌طوری که در ژنوتیپ‌های مختلف مرکبات، موفقیت ریزپیوندی بین ۴۰-۵ درصد گزارش شده است (Murashige et al. 1972).

قرارگیری صحیح و ارتباط مناسب پیوندک و پایه

قرار گرفتن نامناسب پیوندک در محل پیوند، به دلیل نداشتن ارتباط درست با پایه، باعث عدم موفقیت در ریزپیوندی می‌شود. در مواردی پیشنهاد شده که برای کم کردن اثرات مخرب این موضوع، قبل از قرار دادن پیوندک در محل، قسمت زیرین آن را در محلول غذایی فرو کرده و سپس عمل پیوند انجام شود. این کار باعث حفظ

"سهیلی‌وند، تکنیک ریزپیوندی و کاربردهای آن در کشاورزی و منابع طبیعی"

رطوبت، جا گرفتن صحیح در محل پیوند و فراهم کردن مواد مغذی اولیه برای پیوندک می‌شود (Pathirana and McKenzie 2005b). تشکیل کالوس و اتصال بافت‌های آوندی پیوندک و پایه در محل پیوند یکی از عوامل بسیار مهم و اولیه در میزان موفقیت پیوند است. زمان گرفتن پیوند در گیاهان مختلف متفاوت است. برای مثال موفقیت پیوند، در گیاه مو پس از گذشت ۸ روز، با ایجاد اتصالات آوندی مشخص می‌شود (Cantos et al. 1993). در مورد گیاه خرنوب (*Ceratonia siliqua* L.)، با مطالعات هیستولوژی مشخص شده که تشکیل کالوس در منطقه پیوند طی دو هفته اول، انجام شده و تمایز سلول‌ها به آوندهای آبکش در هفته چهارم اتفاق می‌افتد (Hsina and Mtili, 2009).

حفظ رطوبت در محل پیوند

برای تشکیل یک پینه محکم بایستی رطوبت در محل پیوند تا زمان ترمیم کامل حفظ شود (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 استفاده شده است. نتایج به دست آمده نشان داد چکاندن محیط کشت آگاردار در محل پیوند تاثیر معنی‌داری در میزان موفقیت دارد. این

میزان در سیب ۷۰ و در گلابی ۶۰ درصد در مقابل شاهد بدون پوشش غذایی (۱۰ درصد) گزارش شده است (Rafail and Mosleh, 2010). با این وجود در گیاه *P. cynaroides* استفاده از این روش تاثیر معنی‌داری بر میزان موفقیت نداشت (Wu et al. 2007).

اندازه ریزپیوندک

اندازه ریزپیوندک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Suarez et al. 2005). تاثیر اندازه ریزپیوندک در میزان موفقیت ریزپیوندی در گیاهان مختلفی مانند پسته (Onay et al. 2004)، مرکبات (Navarro et al. 1975) و گلابی (Hassanen. 2013) به اثبات رسیده است. در مرکبات سایز پیوندک در میزان موفقیت بسیار موثر بوده است. بطوری که پایین‌ترین درصد موفقیت (۱/۸ درصد) در پیوند ناحیه مریستمی بدون برگ‌های اولیه و بالاترین درصد موفقیت (۴۷/۳ درصد) در پیوندک دارای مریستم به همراه ۶ برگ اولیه (leaf-primordia) به دست آمده است (Navarro et al. 1975). در گلابی، پیوندک‌های دارای اندازه کوچکتر از ۰/۵ سانتی‌متر از موفقیت کمتری (۳۷ درصد) نسبت به پیوندک‌های با سایز ۳/۵ (۸۳ درصد) و ۴ سانتی‌متر (۸۰ درصد) برخوردار بودند (Hassanen. 2013).

2013). با افزایش اندازه پیوندک احتمال موفقیت بطور معنی داری بالا می رود. چنین عنوان شده که دلیل اصلی میزان موفقیت در پیوندک های با اندازه های بزرگتر می تواند این باشد که سلول های لایه کامبیومی پیوندک و پایه بهتر می توانند با هم در تماس باشند (Singh et al. 2008). همانطوری که قبلا ذکر شد اگر هدف تولید گیاهان پیوندی سالم و عاری از بیماری باشد، بایستی از ریزپیوندک های با اندازه های کوچکتر استفاده شود.

سوختگی و سیاه شدن (necrosis) پیوندک

علت اصلی سوختگی و سیاه شدن پیوندک، عدم ارتباط صحیح پیوندک و پایه بوده و در نهایت باعث خشک شدن پیوندک می شود. یکی از دلایل اصلی آن، می تواند ناشی از قرارگیری نامناسب پایه و پیوندک بر روی هم بوده و یا نتیجه ناسازگاری بین پایه و پیوندک باشد. علاوه بر آن، اکسیده شدن محل پیوند می تواند باعث اختلال در ارتباط صحیح بین پیوندک و پایه شود. برای جلوگیری از اکسیده شدن از مواد آنتی اکسیدانی مانند Sodium diethyl- DIECA (diethiocarbamate)، thiourea و cysteine استفاده می شود (Hussain et al. 2014). در نهایت ریزپیوندهایی موفق هستند که پیوندک های آنها

توانسته اند بعد از گذشت یک ماه رشد کاملی داشته و بر روی پایه خود بطور کامل جوش خورده باشند. در این نوع ریزپیوندها، پایه در قسمت پیوند متورم شده و با پیوندک ارتباط کاملی ایجاد می کند (Aleza et al. 2009).

سازگاری به شرایط طبیعی

در مواردی که ریزپیوندی در شرایط *in vivo* انجام شده باشد، در نهایت بایستی گیاهچه های پیوندی به گلخانه منتقل شده و به شرایط طبیعی سازگار شوند. این مرحله یکی از مراحل بسیار حیاتی است که در صورت سهل انگاری، باعث تلفات بسیاری در گیاهچه های پیوندی می شود. روش های سازگاری گیاه پیوندی از شرایط درون شیشه به خاک و شرایط گلخانه برحسب نوع گیاه با هم فرق دارند. در گیاه *kinnow mandarin* (C. *nobilis* Lour * *C. deliciosa* Tenora) گیاهچه های حاصل از ریزپیوندی، پس از گذشت ۵-۶ هفته از پیوند، زمانی که دارای ۲ برگ توسعه یافته هستند، به خاک منتقل می شوند و در دمای 26 ± 2 درجه سلسیوس با ۱۶ ساعت روشنایی در روز و رطوبت بالا نگهداری شده و سازگاری گیاهچه پیوندی، تدریجی و در طی حدود ۱۵-۱۲ روز کامل می شود (Singh et al. 2008).

"سهیلی‌وند، تکنیک ریزپیوندی و کاربردهای آن در کشاورزی و منابع طبیعی"

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به کاربردهای بسیار ریزپیوندی، در زمینه‌های مختلف اعم از تولید گیاهان سالم، تشخیص زودهنگام بیماری‌ها، غلبه بر محدودیت‌های اکولوژیکی و محیطی، تسهیل در شناسایی زودهنگام ناسازگاری پیوند در تولید نهال و گیاهان پلوئیدی، نجات شاخساره‌های بدون ریشه و جنین‌های ناقص، جوان‌سازی بافت‌های بالغ و کوتاه کردن مرحله جوانی در درختان میوه، حمل و نقل ژرم پلاسماهای سالم و احیاء دوباره

نوک-شاخساره‌های منجمد و علاوه‌بر همه این کاربردها، گسترده‌گی استفاده از آن در طیف وسیعی از گیاهان، به خصوص گیاهان چوبی، به نظر می‌رسد، بهینه کردن شرایط برای هر گیاه با هدف خاص، از اهمیت و ارزش ویژه‌ای برخوردار باشد. بنابراین می‌توان چنین اظهار کرد که ریزپیوندی با داشتن مزایای منحصر بفردی مانند سرعت بالا، تولید گیاهان عاری از بیماری و انجام آن فارغ از فصل و شرایط محیطی، نسبت به پیوندهای متداول ارجحیت دارد.

فهرست منابع

References

- Aleza P, Juárez J, Ollitrault P, Navarro L. 2009. Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes. Plant cell reports. 28: 1837-1846.
- Amiri ME. 2006. *In vitro* techniques to study the shoot-tip grafting of *Prunus avium* L. (cherry) var. Seeyahe Mashad. Journal of Food Agriculture and Environment. 4: 151-154.
- Barba, M., Ragozzino, E., Navarro, L. 2003. Viroid elimination by thermotherapy and tissue culture. Viroids. 318-323.
- Bonfiglioli RG, Webb DR, Symons RH. 1996. Tissue and intra- cellular distribution of coconut cadang cadang viroid and citrus exocortis viroid determined by *in situ* hybridization and confocal laser scanning and transmission electron microscopy. The Plant Journal. 9: 457-465.
- Can C, Özaslan M, Töremen H, Sarpkaya K, Iskender E. 2006. *In vitro* micrografting of pistachio, *Pistacia vera* L. var. Siirt, on wild pistachio rootstocks. Journal of Cell & Molecular Biology. 5: 25-31.
- Cantos M, Ales G, Troncoso A. 1993. Morphological and anatomical aspects of a cleft micrografting of grape explants *in vitro*. In International Symposium on Viticulture and Enology. 388: 135-140.
- Davoudi Pahnekolayi M, Tehranifar A, Samiei L, Shoor M. 2019. Optimizing culture medium ingredients and micrografting devices can promote *in vitro* micrografting of cut roses on different rootstocks. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 137: 265-274.

- Deogratias JM, Lutz A, Dosba F. 1985.** *In vitro* micrografting of shoot tips from juvenile and adult *Prunus avium* L. and *Prunus persica* (L.) Batsch to produce virus-free plants. In XIII International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases. 193: 139-146.
- Farahani F, Razeghi S, Peyv M, Attaii S, Mazinani MH. 2011.** Micrografting and micropropagation of olive (*Olea europea* L.) Iranian cultivar: Zard. African Journal of Plant Science. 5: 671-675.
- Fernández-Lorenzo JL, Crecente-Campo S. 2009.** *In vivo* serial micrografting of *Castanea sativa* in short cycles. In I European Congress on Chestnut-Castanea. 866: 291-296.
- Fraga MF, Cañal MJ, Aragonés A, Rodríguez R. 2002.** Factors involved in *Pinus radiata* D. Don. micrografting. Annals of forest science. 59: 155-161.
- Fragoso V, Goddard H, Baldwin IT, Kim SG. 2011.** A simple and efficient micrografting method for stably transformed *Nicotiana attenuata* plants to examine shoot-root signaling. Plant Methods. 7: 1-8.
- Hassanen SA. 2013.** *In vitro* grafting of pear (*Pyrus* spp.). World Applied Sciences Journal. 21: 705-709.
- Hussain G, Wani MS, Mir MA, Rather ZA, Bhat K. 2014.** Micrografting for fruit crop improvement. African J. Biotech., 13: 2474-2483.
- Hsina T, Mtili NE. 2009.** *In vitro* micrografting of mature carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). The Open Horticulture Journal. 2: 44-48.
- Kim CS, Lee CH, Park HS, Lee GP. 2005.** *In vitro* grafting of grape with phylloxera resistant rootstock cultivars. Vitis. 44: 195-196.
- King SR, Davis AR, Liu W, Levi A. 2008.** Grafting for disease resistance. HortScience. 43: 1673-1676.
- Inoue K, Araki T, Endo M. 2018.** Oscillator networks with tissue-specific circadian clocks in plants. In Seminars in Cell & Developmental Biology. 83: 78-85.
- Jajoo A. 2010.** *In vitro* propagation of *Citrus limonia* Osbeck through nucellar embryo culture. Curr. Res. J. Bio. Sci. 2: 6-8.
- Jarausch W, Lansac M, Bliot C, Dosba F. 1999.** Phytoplasma transmission by *in vitro* graft inoculation as a basis for a preliminary screening method for resistance in fruit trees. Plant Pathology. 48: 283-287.
- Lane WD, Bhagwat B, Wahlgren S, Armstrong JD. 2003.** Apple micrografting protocol to establish transgenic clones on field ready rootstock. HortTechnology. 13: 641-646.
- Lansac M, Chalak L, Cardona B, Sorbier A, Bodin-Ferri M, Dosba F, Labonne G, Quiot L, Quiot JB. 1997.** *In vitro* inoculation of *Prunus* species with plum pox potyvirus. In XVII International Symposium Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops. 472: 455-460.
- Li BQ, Feng CH, Hu LY, Wang MR, Wang QC. 2016.** Shoot tip culture and cryopreservation for eradication of Apple stem pitting virus (ASPV) and Apple stem grooving virus (ASGV) from apple rootstocks 'M9' and 'M26'. Annals of Applied Biology. 168: 142-150.
- Mneney EE, Mantell SH. 2001.** *In vitro* micrografting of cashew. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 66: 49-58.
- Murashige T. 1972.** A technique of shoot tip grafting and its utilization towards recovering virusfree citrus clones. HortScience. 7: 118-119.
- Naddaf M, Ganji Moghadam E, Rabiei G, Mohammadkhani A. 2020.** Effect of culture media and growth regulators on micrografting of some sweet cherry cultivars. Research Achievements for Field and Horticulture Crops. 9: 67-78. (In Farsi with English abstract).
- Notaguchi M, Daimon Y, Abe M, Araki T. 2009.** Adaptation of a seedling micro-grafting technique to the study of long-distance signaling in flowering of *Arabidopsis thaliana*. Journal of Plant Research. 122: 201-214.
- Navarro L, Civerolo EL, Juárez J, Garnsey SM. 1991.** Improving therapy methods for citrus germplasm exchange. In Eleventh Conference of the International Organization of Citrus Virologists. 400-408.
- Navarro L, Roistacher C, Murashige T. 1975.** Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. Journal of the American Society for Horticultural Science. 100: 471-479.
- Omar AA, Murata MM, El-Shamy HA, Graham JH, Grosser JW. 2018.** Enhanced resistance to citrus canker in transgenic mandarin expressing Xa21 from rice. Transgenic Research. 27: 179-191.
- Onay A, Pirinç V, Yıldırım H, Basaran D. 2004.** *In vitro* micrografting of mature pistachio (*Pistacia vera* var. Siirt). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 77: 215-219.

- Pathirana R, McKenzie MJ. 2005a.** Early detection of grapevine leafroll virus in *Vitis vinifera* using *in vitro* micrografting. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 81: 11-18.
- Pathirana R, McKenzie MJ. 2005b.** A modified green-grafting technique for large-scale virus indexing of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae*. 107: 97-102.
- Rafail ST, Mosleh MS. 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.
- Ribeiro H, Ribeiro A, Pires R, Cruz J, Cardoso H, Barroso JM, Peixe A. 2022.** *Ex Vitro* rooting and simultaneous micrografting of the walnut hybrid rootstock 'Paradox' (*Juglans hindsii* × *Juglans regia*) cl. 'Vlach'. *Agronomy*. 12: 595.
- Singh B, Sharma S, Rani G, Hallan V, Zaidi AA, Virk GS, 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: 137-143.
- Suarez IE, Schnell RA, Kuhn DN, Litz RE. 2005.** Micrografting of ASBVd-infected avocado (*Persea americana*) plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 80: 179-185.
- Tanne E, Shlamovitz N, Spiegel-Roy P. 1993.** Rapidly diagnosing grapevine corky-bark by *in vitro* micrografting. *HortScience*. 28: 667-668.
- Turnbull CG, Booker JP, Leyser HO. 2002.** Micrografting techniques for testing long- distance signalling in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 32: 255-262.
- Valat L, Burrus M, Fuchs M, Mauro MC. 2003.** Review of techniques to inoculate grapevines with Grapevine fanleaf virus: Lessons and perspectives. *American journal of enology and viticulture*. 54: 279-285.
- Vidoy-Mercado I, Narváez I, Palomo-Ríos E, Litz RE, Barceló-Muñoz A, Pliego-Alfaro F. 2021.** Reinvigoration/rejuvenation induced through micrografting of tree species: signaling through graft union. *Plants*. 10: 1197.
- Vidoy-Mercado I, Imbroda-Solano I, Barceló-Muñoz A, Viruel MA, Pliego-Alfaro F. 2008.** The influence of *in vitro* micrografting on vegetative propagation of the olive cultivar 'Arbequina'. In VI International Symposium on Olive Growing. 949: 31-34.
- Volk GM, Bonnart R, Krueger R, Lee R. 2012.** Cryopreservation of citrus shoot tips using micrografting for recovery. *CryoLetters*. 33: 418-426.
- Volk GM, Bonnart R, Shepherd A, Krueger R, Lee R. 2015.** Cryopreservation of citrus for long term conservation. *Acta Hort*. 1065: 187-192.
- von Aderkas P, Bonga JM. 2000.** Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiology*. 20: 921-928.
- Wu HC, Du Toit ES, Reinhardt CF. 2007.** Micrografting of *Protea cynaroides*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 89: 23-28.
- Yıldırım H, Onay A, Süzerer V, Tilkat E, Ozden-Tokatli Y, Akdemir H. 2010.** Micrografting of almond (*Prunus dulcis* Mill.) cultivars "Ferragnes" and "Ferraduel". *Scientia Horticulturae*. 125: 361-367.
- Yoo SJ, Hong SM, Jung HS, Ahn JH. 2013.** The cotyledons produce sufficient FT protein to induce flowering: evidence from cotyledon micrografting in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*. 54: 119-128.
- Zhang N, Zeng HX, Shi XF, Yang YX, Cheng WS, Ren J, Li YH, Li AC, Tang M, Sun YH, Peng DX. 2014.** An efficient *in vitro* micrografting technology of watermelon. In I International Symposium on Vegetable Grafting. 1086: 65-70.

Micrografting and its Applications in Agriculture and Natural Resources

Saeed Soheilvand

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

soheilvand@gmail.com

Abstract

Micrografting is a grafting technique that involves the placement of a small meristem or section of shoot-tip onto a decapitated rootstock that has been grown aseptically from *in vitro* seedlings. *In vitro* micrografting provides many benefits to producers in agriculture and natural resources. The success rate in micrografting can be affected by different factors such as cultivar or genotype, scion length and rootstock development stage and adaptation of a micrografted seedling in greenhouse conditions. In this review, various applications of micrografting techniques such as early detection of viral, viroid and phytoplasma infections, obtaining of grafted disease-free plants free from virus and virus-like disease, overcoming ecological limits, providing an alternative production technique, rejuvenation of mature tissue, bypassing the juvenile phase in fruit trees, recovery of cryopreserved shoot tips, allowing a quick supply of safe germplasm exchange, facilitating the early diagnosis of grafting incompatibilities, saving rootless shoots and deficient embryos, testing long-distance signalling in plants, productions of polyploidy plants are discussed.

Keywords: Scion, Rootstock, *In vitro*, Shoot-tip.