

## برهمکنش تنظیم‌کننده‌های رشد و قارچ ریشه – آربسکولار بر ریزپیوندی برون شیشه‌ای پسته

### Interaction of Growth Regulators and Arbuscular Mycorrhizal Fungi on *In Vivo* Micrografting of Pistachio (*Pistacia vera* L.)

زینب صادقی<sup>۱</sup>، محمد حسین شمشیری<sup>۱</sup>، واحد باقری<sup>۱\*</sup> و امان اله جهان‌شاه<sup>۲</sup>

۱. گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، ایران.

۲. پژوهشکده پسته، رفسنجان، ایران.

\*نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (v.bagheri@vru.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۳۰

#### چکیده

ریزپیوندی روش مهمی از ریزافزایی می‌باشد که طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی به‌ویژه گیاهان چوبی را شامل می‌شود. در دهه گذشته، ریزپیوندی تبدیل به یک راهکار ارزشمند برای تسهیل در بازیابی شاخه و سازگاری گونه‌های باغبانی در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*) و آزاد (*In vivo*) شده است. این آزمایش به‌منظور مطالعه ریزپیوندی پسته (*Pistacia vera* L.) در شرایط برون شیشه‌ای و برهمکنش تنظیم‌کننده رشد و همزیستی قارچ ریشه بر گیرایی و استقرار دانه‌های ریزپیوندی صورت گرفت. پیوندک‌ها از سرشاخه‌های سال جاری درختان بالغ ۶-۷ ساله رقم احمد آقایی تهیه و روی پایه‌های ۱۴ روزه بذری رقم قزوینی در شرایط کنترل شده ریزپیوندی شدند. مایه کوبی گیاهان با قارچ *Funneliformis mosseae* برای بررسی اثر همزیستی قارچ ریشه بر گیرایی و استقرار دانه‌های پیوندی همزمان با کشت بذر انجام شد. پیوندک‌ها پس از غوطه‌وری در محلول اسید آسکوربیک (صفر و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به مدت ۶۰ دقیقه، توسط اسید ایندول بوتریک (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و بنزین آدنین (صفر، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر) تیمار شدند. نتایج نشان داد که مایه کوبی قارچ ریشه بر مولفه‌هایی مانند درصد گیرایی پیوند، درصد زنده‌مانی، رشد پیوندک، وزن خشک پیوندک و تعداد برگ تأثیر مثبت داشت. با کاربرد تنظیم‌کننده رشد، میزان موفقیت ریزپیوندی افزایش یافت به طوری که سطح ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید ایندول بوتریک و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر بنزین آدنین موثرتر مشاهده شد. در این پژوهش، تیمار اسید آسکوربیک اثرات متفاوتی داشت اما در بیشتر موارد اثر معنی‌داری بر ریزپیوندی نداشت حتی در ترکیب با تنظیم‌کننده رشد اثر منفی داشت. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش به نظر می‌رسد که استفاده از تنظیم‌کننده رشد و قارچ ریشه‌ها بر درصد زنده‌مانی گیاهان ریزپیوند شده اثر مثبت داشته و این گیاهان بقاء بیشتری داشتند.

**واژه‌های کلیدی:** آنتی اکسیدانت، تنظیم‌کننده رشد، قارچ ریشه، پسته، ریزپیوندی.

#### مقدمه

جنس پسته (*Pistacia*) متعلق به تیره پسته‌سانان<sup>۱</sup> راسته ساپیندالیس<sup>۲</sup> گیاهی دو پایه، و خزان‌پذیر می‌باشد. این جنس دارای ۱۱ گونه است و تنها گونه *Pistacia vera* دارای میوه‌های درشت و خندان می‌باشد و ارزش تجاری دارد و سایر گونه‌ها بیشتر به‌عنوان پایه مورد استفاده قرار می‌گیرند (Heidary-Sharifabad et al., 2021). پسته یکی از محصولات مهم باغبانی کشور است که از جنبه‌های مختلف اقتصادی، اجتماعی و زیست محیطی اهمیت فوق العاده‌ای دارد. به دلیل شرایط مناسب

اقلیمی، پسته ایران دارای مرغوبیت بالایی بوده و از نظر کیفیت در بین رقبای خارجی خود کم‌نظیر می‌باشد. از آن جایی که درختان پسته به میزان زیادی از نظر ژنتیکی هتروزیگوت بوده و دگرگرده افشان هستند، مناسب‌ترین و پرکاربردترین راه برای ازدیاد درختان میوه استفاده از روش‌های تکثیر غیرجنسی، به‌ویژه پیوند است (Bai et al., 2019).

ریزپیوندی فنی است شامل استفاده از نوک شاخه به‌خصوص قسمت مریستمی جوانه انتهایی (۱/۰ تا ۸/۰ میلی‌متر) به عنوان پیوندک و پیوند آن بر روی پایه، که هم در شرایط درون شیشه‌ای و هم در شرایط خارج شیشه امکان‌پذیر است. این فن اولین بار در دهه ۸۰ میلادی مورد استفاده قرار گرفت (Rehman and Gill, 2019). روش پیوند اپی‌کوتیل و ریزپیوندی در پسته مورد بررسی قرار گرفته و امکان انجام آن در پسته گزارش شده است (Javanshah, 1994; Can et al., 2006). یکی از مهم‌ترین مزایای ریزپیوندی پسته نسبت به بسیاری از روش‌های تکثیر غیرجنسی، دستیابی سریع‌تر به نهال پیوندی است. به‌عنوان مثال، در پسته عمل پیوند در سن یک یا دو سالگی پایه صورت می‌گیرد، اما در ریزپیوندی تنها چند هفته پس از جوانه‌زنی بذر می‌توان به گیاهچه‌های پیوندی دست یافت. با استفاده از روش ریزپیوندی می‌توان نهال‌های پسته را در یک محیط کوچک و در زمان کوتاه تولید کرد. در مطالعه‌ای موفقیت ریزپیوندی پسته ("*Pistacia vera L. cv. "Siirt"*) در شرایط درون شیشه و آزاد مورد بررسی قرار گرفت (Onay et al., 2003). سن پیوندک‌ها تنها عامل مورد بررسی بود. انتهای شاخه‌ها از درختان بالغ پسته ۱، ۵، ۱۰ و ۳۰ ساله به‌عنوان پیوندک مورد استفاده قرار گرفته شد. گیاهچه‌های ۱۰ تا ۱۲ روزه رشد یافته در شرایط سترون یا گیاهچه‌های ۳ تا ۵ ماهه که در داخل گلدان‌ها در شرایط آزاد رشد یافته بودند، به‌عنوان پایه مورد استفاده قرار گرفتند. جهت اتصال کامل پایه و پیوندک در شرایط آزاد از پارافیلیم استفاده شد. این سیستم جدید ریزپیوندی در شرایط آزاد، رشد مناسب و تکامل شاخه‌های جدید را ایجاد نمود.

تلفات شدید گیاهچه‌های درون شیشه‌ای به هنگام مقاوم‌سازی، یعنی در مرحله انتقال به گلخانه و مزرعه هنوز به عنوان یکی از مشکلات مهم در ازدیاد گیاهان با تکنیک ریزافزایی مطرح است. ثابت شده است که قارچ ریشه-آربسکولار باعث افزایش سازگاری گیاهان ریزپیوندی و ریزازدیادی شده می‌شود، هر چند که اطلاعات زیادی در این ارتباط در دست نیست (Dolcet-Sanjuan et al., 1996). در پژوهشی که بر روی ارقام گیاه چرمیویا (*Annona cherimola Mill.*) انجام شد، نقش قارچ ریشه (*Glomus intraradices*) در میزان بقای گیاهان ریزپیوندی مثبت ارزیابی شد، به‌طوری‌که گیاهان تلقیح شده با قارچ ریشه به میزان ۹۰-۱۰۰ درصد افزایش زنده‌مانی داشتند (Padilla and Encina, 2011). همچنین در پژوهشی دیگر میزان سازگاری و رشد زردآلوهای ریزپیوندی شده بر پایه آلوی میروبالان ۲۹-سی با قارچ *Glomus intraradices* و تریکودرما *Trichoderma harzianum* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که تلقیح گیاهان ریزپیوندی شده با قارچ ریشه و تریکودرما میزان رشد گیاهان (زیست‌توده) را به ترتیب ۲۴ و ۳۸ درصد نسبت به گیاهان شاهد افزایش داد (Tataranni et al., 2011).

طبق مطالعات انجام شده تعادل بین ترکیبات فنولی و هورمون‌ها در بافت گیاه می‌تواند موفقیت در گیرایی پیوند را تحت تأثیر قرار دهد. در اثر زخم ایجاد شده در گیاه (پایه و پیوندک) بافت آسیب دیده سریع قهوه‌ای و یا سیاه می‌شود و این می‌تواند سبب نکروزه و مرگ گیاه پیوندی شود و درصد گیرایی پیوند را کاهش دهد (Torahi and Hourri, 2012). در ریزپیوندی برون شیشه‌ای، میزان ترکیبات پلی‌فنولی و پراکسیداز به نسبت بالا بوده (چون پیوندک از درختان بالغ رشد کرده در مزرعه تهیه می‌شود) و این سبب پژمرده شدن و مرگ گیاه پیوندی پس از مدت کوتاهی می‌شود (Can et al., 2006). در یک پژوهش اثر آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در کاهش اکسیداسیون مواد فنولی در طول فرآیند ریزپیوندی آزمایش شد و پلی‌وینیل‌پیرولیدون (PVP<sup>۱</sup>) بهترین نتیجه را داشت. اما بهترین نتایج در خصوص رشد پیوندک وقتی به دست آمد که محلول‌های آنتی‌اکسیدانی توسط اضافه کردن تنظیم‌کننده رشد بنزیل آمینوپورین (BAP<sup>۲</sup>) تکمیل شدند. این تنظیم‌کننده رشد یا ترکیبی از آن با دیگر ترکیبات محلول همچنین سرعت رشد پیوندک را افزایش داد که به گیاهچه‌ها اجازه داد در کمتر از ۶ هفته بعد از ریزپیوندی، به گلخانه منتقل شوند (Alzate et al., 2002). در یک پژوهش دیگر که با هدف بررسی نوع پیوندک، سن پایه و تنظیم‌کننده رشد بر درصد موفقیت ریزپیوندی گردو انجام شد، نقش تنظیم‌کننده رشد مثبت گزارش

شد (Farsi et al., 2018). نتایج این پژوهشگران نشان داد بیشترین گیرایی پیوند در پایه‌های یک ساله تیمار شده با تنظیم کننده رشد بنزیل‌آدنین با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر به همراه اسید ایندول بوتریک با غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد.

با توجه به اینکه تکنیک ریزپیوندی باعث صرفه‌جویی در زمان و هزینه‌های انجام پیوند در پسته می‌شود و سریع‌تر می‌توان به نهال پیوندی دست پیدا کرد است، این پژوهش با هدف بررسی نقش تنظیم کننده‌های رشد و اسید آسکوربیک و قارچ ریشه‌های- آربسکولار در استقرار گیاهان ریزپیوندی پسته انجام گرفت.

## مواد و روش‌ها

### تهیه مایه تلقیح

در این آزمایش از یک گونه قارچ ریشه- آربسکولار به نام *Funneliformis mosseae* استفاده شد. قارچ مورد نظر با استفاده از گیاه سورگوم به عنوان گیاه تله به مدت چهار ماه در گلخانه (شرایط گلخانه شامل دمای  $20 \pm 3$  درجه سلسیوس، رطوبت نسبی  $50 \pm 40$  درصد و ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی) تکثیر شد. خاک مورد استفاده به نسبت ۱:۲ به ترتیب خاک مزرعه و ماسه بود که در دمای ۱۲۱ درجه و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت یک ساعت اتوکلاو شد و سپس گلدان‌های سه کیلوگرمی تا ۳/۴ حجم گلدان با این خاک پر شد و روی آن تا دو سانتی‌متر از مایه قارچ پوشانده و بذره‌های سورگوم روی آن‌ها قرار داده و روی بذرها با خاک اتوکلاو شده پوشانده و سپس آبیاری شد. بعد از گذشت چهار ماه، نمونه‌هایی از ریشه میزبان تهیه و جهت اطمینان از میزان آلودگی مورد آزمون قرار گرفت. در مرحله بعد بخش‌های هوایی گیاه میزبان قطع و پس از قطعه قطعه کردن ریشه و مخلوط کردن آن با خاک گلدان، مخلوط یکنواخت شامل قطعات ریشه آلوده، اسپور (۱۸ اسپور در هر گرم مایه قارچ) و خاک گلدان تهیه گردید که به عنوان مایه قارچ مورد استفاده قرار گرفت.

### تهیه پایه و تلقیح دانها

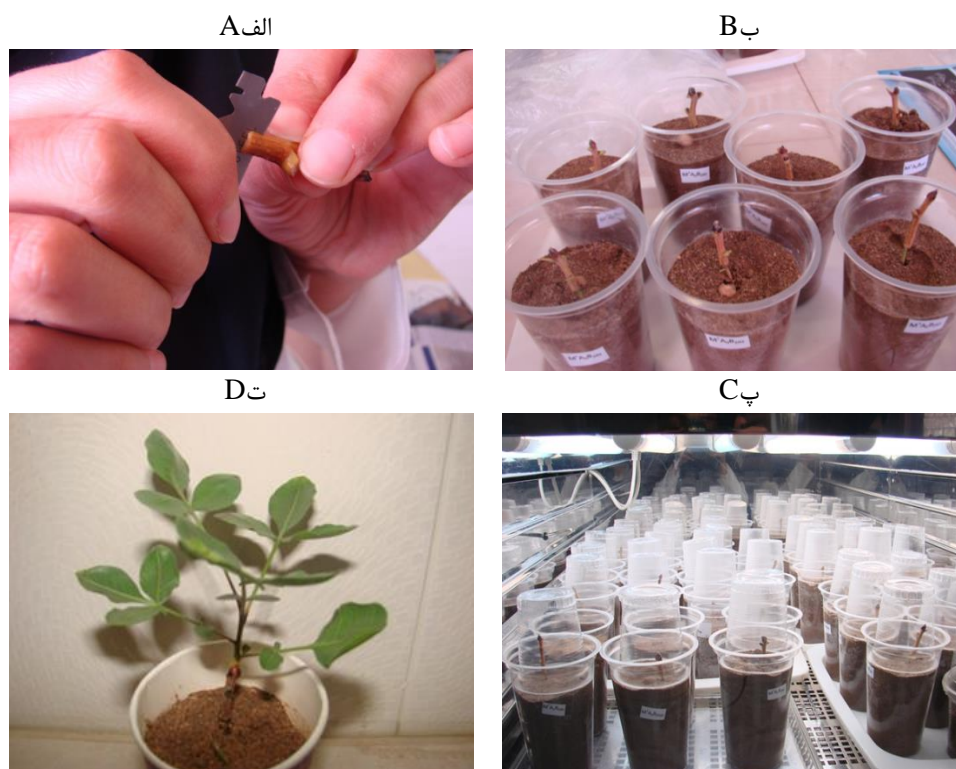
بذره‌های پسته رقم قزوینی (تهیه شده از پژوهشکده پسته ایران) پس از شستشو با آب جاری، در محلول هیپوکلریت سدیم پنج درصد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند و پس از آن به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر استریل خیسانده شده و پس از سه مرتبه شستشو با آب مقطر، در بین پارچه مرطوب در محل تاریک با دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. بذرها پس از گذشت سه روز شروع به جوانه‌زنی کردند و در گلدان‌های پلاستیکی نیم کیلویی حاوی نسبت‌های مساوی از ماسه و پرلیت اتوکلاو شده (یک ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱۵ اتمسفر) کشت شدند و در شرایط کنترل شده اتافک رشد با دمای ۲۷ درجه سلسیوس و رطوبت ۴۰ درصد نگهداری شدند. در گلدان‌هایی که تیمار قارچ ریشه اعمال شد، ابتدا دوسوم از گلدان با مخلوط خاکی (خاک و ماسه به ترتیب به نسبت ۱:۲) پر شد و ۲۰ گرم مایه قارچ روی محیط کشت ریخته و سپس یک بذر جوانه‌دار شده روی سطح بسترکشت قرار داده و با دو سانتی‌متر ماسه اتوکلاو شده (یک ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱۵ اتمسفر) پوشانده شد. گلدان‌های شاهد نیز مقدار ۲۰ گرم مایه قارچ که اتوکلاو شده بود، دریافت داشتند. سن پایه‌ها برای پیوند دو هفته و طول پایه‌ها بین ۲/۵-۲ سانتی‌متر و قطر آنها بین ۲-۱/۵ میلی‌متر بود.

### تهیه پیوندک

پیوندک‌ها از سرشاخه‌های سال جاری درختان ماده رقم احمدآقایی تهیه شد که دارای قطر بین ۳-۲ میلی‌متر و طول ۳-۲ سانتی‌متر بودند. پیوندک‌ها به مدت ۲۰ دقیقه توسط محلول هیپوکلریت سدیم سه درصد ضدعفونی شدند.

### نحوه انجام عمل پیوند و اعمال تیمارها

برای انجام عمل پیوند، دو هفته پس از کشت بذر، پایه‌ها از دو سانتی‌متری بالای لپه‌ها سربرداری شدند. پس از سربرداری پایه و ایجاد برش‌های مورب در دو سمت ساقه به منظور برداشتن پوست، انتهای پیوندک‌ها شکاف داده شد (شکل ۱- A) و انتهای پایه درون شکاف پیوندک‌ها جای گرفت (شکل ۱- B). به منظور حفظ رطوبت محل پیوند، با استفاده از یک نوار پارافیلیم به عرض یک سانتی‌متر، محل پیوند پوشانده و سپس روی گلدان‌ها با لیوان‌های یک بار مصرف شفاف پوشانده شد (شکل ۱- C).



شکل ۱- (A) آماده‌سازی پیوندک (B)، دانهال پیوند شده (C)، درپوش گذاری دانهال پیوندی (D) گیاه پیوندی.  
 Fig. 1. Preparation of rootstock (A), grafted seedling (B), covering of grafted seedling (C) grafted plant (D).

اعمال تیمارهای تنظیم کننده رشد در قالب دو آزمایش مستقل و به صورت جداگانه اما همزمان با هم انجام شد. بدین صورت که در آزمایش اول در محل پیوند از آنتی‌اکسیدان اسید آسکوربیک با دو غلظت صفر و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و از پیوندک‌هایی به طول ۲ تا ۳ سانتی‌متر که دارای جوانه انتهایی و یک یا دو جوانه جانبی بودند استفاده شد. پیوندک‌ها پس از برش به مدت ۶۰ دقیقه در محلول اسید آسکوربیک قرار داده شدند و سپس بیدرنگ برای ریزپیوندی مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین تیمار اسید ایندول بوتریک (IBA) با سه غلظت صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به صورت یک قطره قبل از قرارگیری پیوندک بر پایه در محل پیوند استفاده شد.

در آزمایش دوم در محل پیوند از آنتی‌اکسیدان اسید آسکوربیک با دو غلظت صفر و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و از پیوندک‌هایی به طول ۲ تا ۳ سانتی‌متر که دارای جوانه انتهایی و یک یا دو جوانه جانبی بودند استفاده شد. پیوندک‌ها پس از برش به مدت ۶۰ دقیقه در محلول اسید آسکوربیک قرار داده شدند و سپس بیدرنگ برای ریزپیوندی مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین تیمار بنزیل آدنین (BA) با سه غلظت صفر، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر به صورت یک قطره در محل پیوند استفاده شد. دانهال‌های پیوندی بیدرنگ در اتاقک رشد (دمای ۲۵ درجه سلسیوس، با طوبت ۷۰ درصد همراه با نور مهتابی فلورسنت سفید) به مدت چهار هفته نگهداری شدند. سپس گیاهان برای برقراری همزیستی قارچ به مدت سه ماه در گلخانه (شرایط دمایی ۲۰/۲۵ درجه سلسیوس روز و شب و رطوبت نسبی ۶۵ درصد و نور ۱۰۰۰ لوکس) منتقل شدند.

#### اندازه‌گیری پارامترها

درصد پیوندک‌های شکوفا شده به عنوان درصد گیرایی و میزان رشد اولیه پیوندک‌ها (طول پیوندک رشد کرده) تا سه هفته پس از پیوند ثبت و تجزیه و تحلیل شد. همچنین درصد زنده مانی در پایان آزمایش محاسبه شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک پیوندک ابتدا گیاه از ناحیه طوقه جدا و به دو قسمت پایه و پیوندک تقسیم شد و پس از شستشو و خشک شدن برای اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده و سپس وزن شدند.

در پایان آزمایش (۱۳۰ روز بعد از کاشت بذر) درصد کلونیزاسیون ریشه‌ها، پس از رنگ‌آمیزی قطعات هم‌اندازه ریشه‌ها انتخاب و سپس بر روی هر لام ۱۰ قطعه ریشه قرار گرفته و با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۱۰۰X میزان کلونیزاسیون آن‌ها بر طبق فرمول زیر محاسبه شد (Phillips and Hayman, 1970).

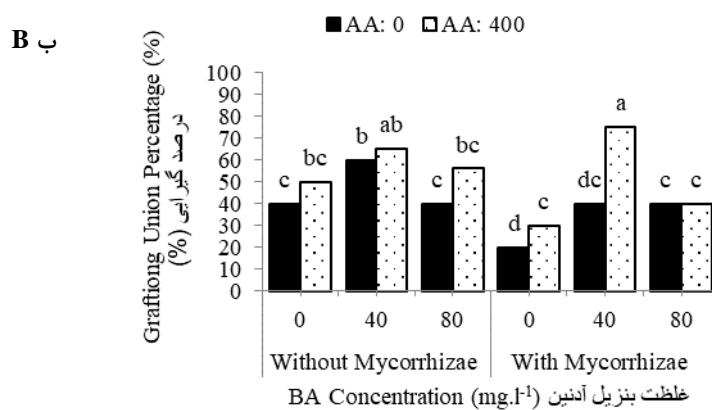
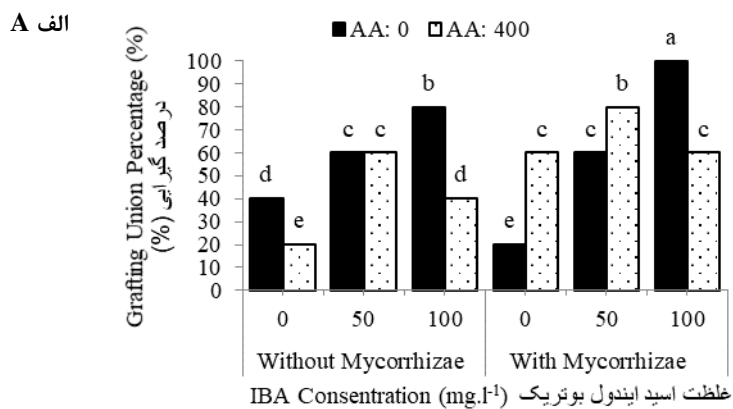
$$100 \times \frac{\text{تعداد ریشه آلوده شده}}{\text{تعداد ریشه مشاهده شده}} = \text{کلونیزاسیون ریشه (\%)}$$

این پژوهش با هدف بررسی ریزپیوندی در پسته و برهمکنش تنظیم کننده رشد و قارچ ریشه- آریسکولار بر رشد دانه‌های پسته اهلی به صورت دو آزمایش مستقل طراحی و اجرا شد. آزمایش اول به صورت فاکتوریل با سه عامل قارچ (با قارچ ریشه و بدون قارچ ریشه)، اکسین (غلظت صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و اسید آسکوربیک (غلظت صفر و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و آزمایش دوم نیز به صورت فاکتوریل با سه عامل قارچ (با قارچ ریشه و بدون قارچ ریشه)، سایتوکینین (غلظت صفر، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر) و اسید آسکوربیک (غلظت صفر و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) در قالب دو آزمایش جداگانه با ۵ تکرار بر روی پایه‌های بذری رقم قزوینی در قالب طرح پایه به‌طور کامل تصادفی انجام گرفت. همبستگی بین صفات مربوط به پایه و پیوندک و صفات مربوط به گیرایی با آزمون غیرپارامتری اسپیرمن توسط نرم‌افزار Minitab صورت گرفت. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و ترسیم نمودارها نیز توسط نرم‌افزار Excel انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

## نتایج

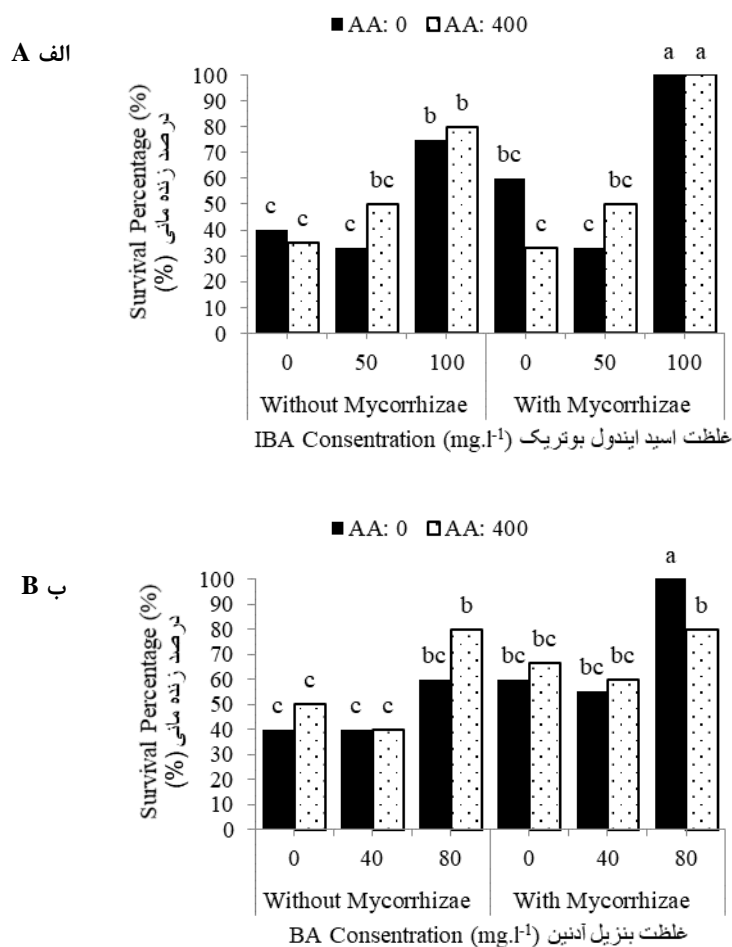
براساس نتایج به دست آمده توانایی درصد گیرایی پیوند از ۲۰ تا ۱۰۰ درصد در بین تیمارهای مختلف متفاوت مشاهده شد. در آزمایش اول با کاربرد تنظیم کننده رشد اسید ایندول بوتریک درصد گیرایی هم در گیاهان قارچ ریشه و هم در گیاهان بدون قارچ ریشه افزایش یافت. همچنین نتایج نشان داد که استفاده از اسید آسکوربیک در گیاهان قارچ ریشه منجر به نتایج بهتری شد، هر چند که در برهمکنش با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تنظیم کننده رشد اسید ایندول بوتریک درصد گیرایی توسط اسید آسکوربیک کاهش یافت (شکل ۲، الف). در آزمایش دوم، بهترین نتایج با تیمار اسید آسکوربیک با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در گیاهان قارچ ریشه مشاهده شد. استفاده از بنزیل آدنین همراه با اسید آسکوربیک در گیاهان قارچ ریشه و بدون قارچ در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر اثرات مثبت‌تری بر درصد گیرایی پیوند داشت (شکل ۲، ب).

مقایسه میانگین‌های آزمایش اول نشان داد که بیشترین درصد زنده‌مانی (۱۰۰ درصد) مربوط به تیمار تنظیم کننده رشد اسید ایندول بوتریک در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در گیاهان قارچ ریشه بود هر چند که اختلاف معنی‌داری بین سطوح اسید آسکوربیک مشاهده نشد. در آزمایش دوم کاربرد بنزیل آدنین در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر در گیاهان قارچ ریشه و بدون قارچ ریشه باعث بیشترین درصد زنده‌مانی نسبت به بقیه سطوح شد. هر چند که در هر دو آزمایش تأثیر قارچ ریشه مثبت ارزیابی شد. براساس نتایج به دست آمده در این پژوهش تیمار با اسید آسکوربیک اثر معناداری بر درصد زنده‌مانی پیوندک‌ها در هیچ کدام از تیمارهای ترکیبی نداشت (شکل ۳، الف و ب).



شکل ۲- اثر اسيد ايندول بوتريک (الف)، بنزيل آدنين (ب) و اسيد آسکوربیک بر درصد گيرايی نهال‌های پسته تلقیح شده با قارچ ریشه - آریسکولار (*Funneliformis mosseae*).

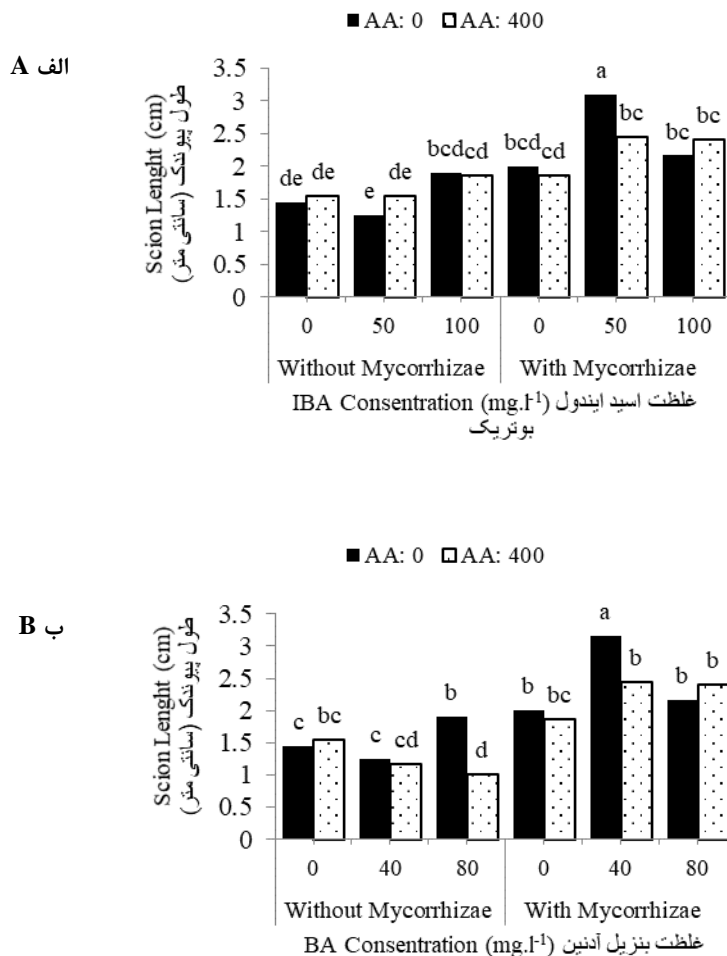
Fig. 2. Effect of Indole-3-butyric acid (A), Benzyl Adenine (B) and ascorbic acid on micrografting success of pistachio inoculated with mycorrhiza (*Funneliformis mosseae*).



شکل ۳- اثر اسید ایندول بوتریک (الف)، بنزیل آدنین (ب) و اسید آسکوربیک بر درصد زنده‌مانی نهال‌های پسته تلقیح شده با قارچ ریشه-آربسکولار (*Funneliformis mosseae*)

Fig. 3. Effect of Indole-3-butyric acid (A), Benzyl Adenine (B) and ascorbic acid on survival percentage of micrografting pistachio inoculated with mycorrhiza (*Funneliformis mosseae*).

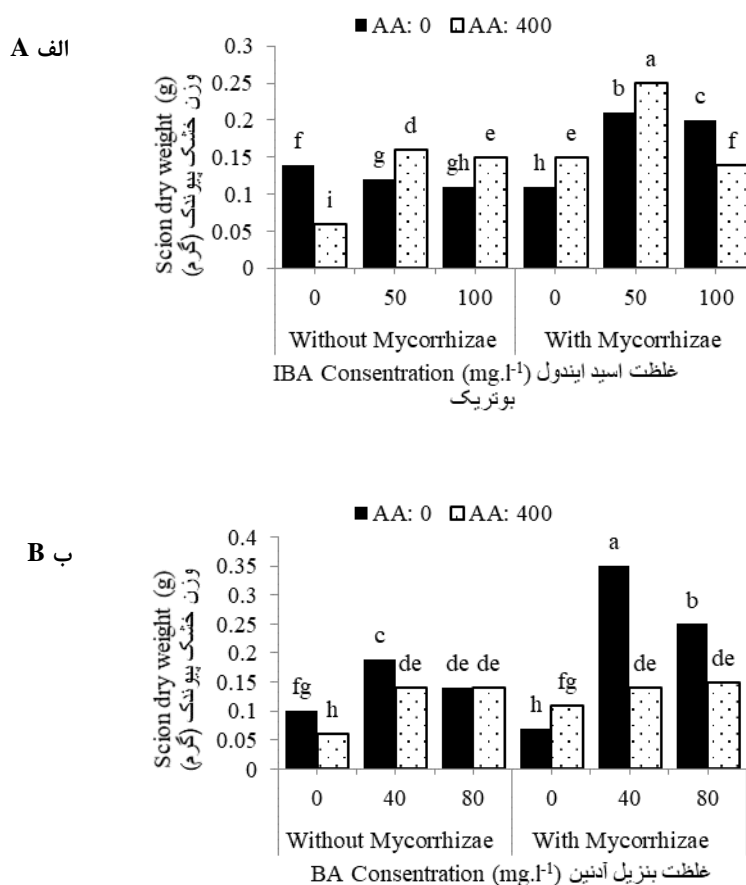
بر اساس نتایج تجزیه واریانس آزمایش اول و دوم اثرات سه‌گانه قارچ ریشه، اسید آسکوربیک و تنظیم کننده رشد بر میزان رشد پیوندک از لحاظ آماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول تجزیه واریانس نشان داده نشده است). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در مجموع میزان رشد پیوندک در گیاهان ریز پیوند شده در تیمار قارچ ریشه نسبت به شاهد (بدون قارچ ریشه) قابل توجه بود. استفاده از اسید آسکوربیک در هر دو آزمایش اثر معنی‌داری بر رشد پیوندک چه در گیاهان قارچ ریشه و بدون قارچ ریشه نداشت. نتایج حاکی از آن می‌باشد که کاربرد تنظیم کننده رشد اسید ایندول بوتریک و بنزیل آدنین صرف نظر از اسید آسکوربیک توانست رشد پیوندک را به‌ویژه در گیاهان قارچ ریشه بهبود دهد (شکل ۴، الف و ب). به‌طور مثال، کاربرد ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید ایندول بوتریک بدون در نظر گرفتن اسید آسکوربیک در گیاهان قارچ ریشه، منجر به ۳/۲ سانتی‌متر رشد پیوندک شد. نکته قابل توجه اثر کاهشی رشد پیوندک در هر دو آزمایش در غلظت‌های بالای تنظیم کننده رشد بود.



شکل ۴- اثر اسید ایندول بوتریک (الف)، بنزیل آدنین (ب) و اسید آسکوربیک بر رشد پیوندک نهال‌های پسته تلقیح شده با قارچ ریشه-آرسکولار (*Funneliformis mosseae*). میانگین‌های دارای حروف مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ ندارند.

Fig. 4. Effect of Indole-3-butyric acid (A), Benzyl Adenine (B) and ascorbic acid on scion length of micrografting pistachio inoculated with mycorrhiza (*Funneliformis mosseae*). Means followed by the same letter are not significantly different ( $P < 0.05$ ).

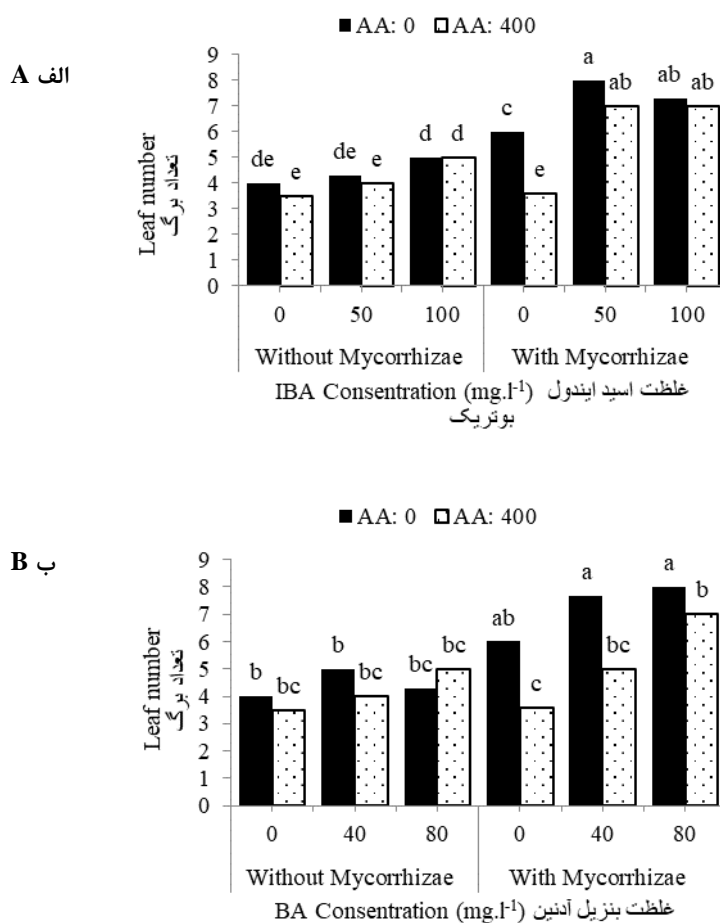
وزن خشک پیوندک در آزمایش اول و دوم زیر تأثیر اثرات مستقل قارچ ریشه، اسید آسکوربیک، تنظیم کننده رشد و برهمکنش متقابل بین آنها قرار گرفت و از لحاظ آماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود هر چند که اثر اسید آسکوربیک در آزمایش اول به تنهایی معنی‌دار نشد (جدول تجزیه واریانس نشان داده نشده است). همان‌طور که در نتایج آورده شده است، اثر تنظیم کننده رشد در تمام گیاهان به‌ویژه گیاهان قارچ ریشه بر وزن خشک پیوندک مثبت ارزیابی شد و از روند منطقی‌تری در گیاهان تیمار شده با اسید آسکوربیک پیروی کردند (شکل ۵، الف و ب). از طرفی به ترتیب در غلظت‌های ۱۰۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید ایندول بوتریک و بنزیل آدنین از وزن خشک پیوندک کاسته شد. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در آزمایش دوم اثر اسید آسکوربیک در مقایسه با شاهد اثر کاهشی بر وزن خشک پیوندک داشت (شکل ۵، ب). به‌طور مثال، در سطح ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین کاربرد اسید آسکوربیک نسبت به شاهد (صفر میلی‌گرم بر لیتر اسید آسکوربیک) نزدیک به ۱۳۳ درصد وزن خشک را کاهش داد.



شکل ۵- اثر اسید ایندول بوتریک (الف)، بنزیل آدنین (ب) و اسید آسکوربیک بر وزن خشک پیوندک نهال‌های پسته تلقیح شده با قارچ ریشه-آربسکولار (*Funneliformis mosseae*). میانگین‌های دارای حروف مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ ندارند.

Fig. 5. Effect of Indole-3-butyric acid (A), Benzyl Adenine (B) and ascorbic acid on scion dry weight of micrografting pistachio inoculated with mycorrhiza (*Funneliformis mosseae*). Means followed by the same letter are not significantly different ( $P < 0.05$ ).

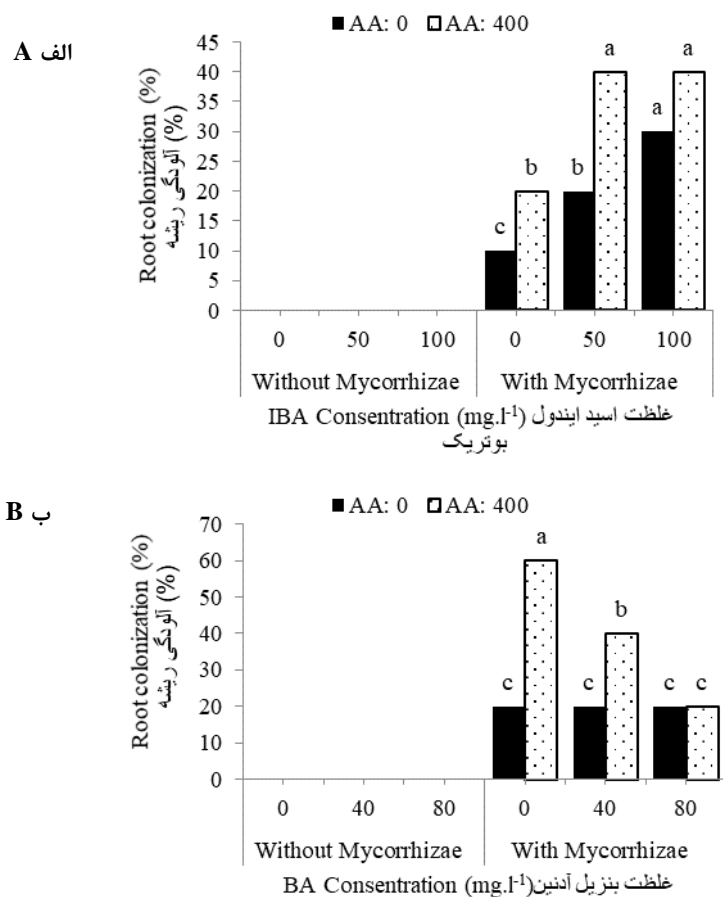
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که به جز اثر ساده قارچ ریشه که در سطح پنج درصد معنی‌دار بود، تمامی اثرات ساده و متقابل دوگانه و سه‌گانه قارچ ریشه، اسید آسکوربیک و تنظیم‌کننده رشد در هر دو آزمایش بر تعداد برگ از لحاظ آماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. صرف نظر از اثر قارچ ریشه و اسید آسکوربیک، کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد اسید ایندول بوتریک و بنزیل آدنین باعث افزایش تعداد برگ شد، به طوری که بیشترین تعداد برگ با ۸ عدد به ترتیب در تیمار ۸۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین و اسید ایندول بوتریک به دست آمد. اثر مثبت کاربرد قارچ ریشه در هر دو آزمایش مشهود بود، به طوری که گیاهان زیر تیمار تنظیم‌کننده رشد و اسید آسکوربیک که با قارچ ریشه تلقیح شده بودند، نسبت به گیاهان بدون قارچ ریشه از تعداد برگ بیشتری برخوردار بودند (شکل ۶، الف و ب).



شکل ۶- اثر اسید ایندول بوتریک (الف)، بنزیل آدنین (ب) و اسید آسکوربیک بر تعداد برگ نهال‌های پسته تلقیح شده با قارچ ریشه-آریسکولار (*Funneliformis mosseae*). میانگین‌های دارای حروف مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ ندارند.

Fig. 6. Effect of Indole-3-butyric acid (A), Benzyl Adenine (B) and ascorbic acid on scion leaf number of micrografting pistachio inoculated with mycorrhiza (*Funneliformis mosseae*). Means followed by the same letter are not significantly different ( $P < 0.05$ ).

نتایج مقایسه میانگین‌ها در آزمایش اول نشان داد که با افزایش غلظت اسید ایندول بوتریک درصد آلودگی ریشه نیز افزایش یافت، هر چند که در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اختلاف معنی‌دار نبود. همین‌گوی افزایشی در گیاهان تیمار شده با اسید آسکوربیک نیز مشاهده شد (شکل ۷، الف). در آزمایش دوم درصد آلودگی ریشه‌الگوی متفاوتی نشان داد به‌طوری که با کاربرد اسید آسکوربیک و با افزایش غلظت بنزیل آدنین میزان آلودگی ریشه کاهش یافت. این در حالی بود که در حالت بدون اسید آسکوربیک اختلاف بین سطوح تنظیم‌کننده رشد معنی‌دار نبود (شکل ۷، ب).



شکل ۷- اثر اسید ایندول بوتریک (الف)، بنزیل آدنین (ب) و اسید آسکوربیک بر درصد آلودگی نهال‌های پسته تلقیح شده با قارچ ریشه-آریسکولار (*Funneliformis mosseae*). میانگین‌های دارای حروف مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ ندارند.

Fig. 7. Effect of Indole-3-butyric acid (A), Benzyl Adenine (B) and ascorbic acid on root colonization of micrografting pistachio inoculated with mycorrhiza (*Funneliformis mosseae*). Means followed by the same letter are not significantly different ( $P < 0.05$ ).



شکل ۸- اثر غلظت ۴۰ میلی‌گرم بنزیل آدنین بر تشکیل پینه در محل پیوند سه هفته بعد از ریزپیوندی.

Fig. 8. Effect of Benzyl Adenine (BA) at 40 mg L<sup>-1</sup> on callus formation at grafting point 3 weeks after micrografting.

## بحث

پژوهشگران بسیاری نشان دادند که عوامل مؤثر بر گیرایی پیوند به دو گروه عوامل درونی (ژنتیکی) و عوامل بیرونی (محیطی) تقسیم می‌شوند (Huarachi Morejon, 2013). ترکیبات درونی مثل فنول‌ها، اسیدهای فنلیک، فعالیت رویشی پایه و پیوندک، زمان پیوند و شرایط محیطی مثل دما و رطوبت نسبی در گیرایی پیوند بسیار مؤثر هستند. علاوه بر این عدم ایجاد ارتباط منظم بین آوندها به دلیل تشکیل پریدرم در پارانشیم و عدم قرار گرفتن لایه‌های زاینده پایه و پیوندک روی هم، مانع از جوش خوردن کامل پایه و پیوندک می‌شود (Rasool et al., 2022). تشکیل پینه (کالوس) پیش‌شرط اصلی برای گیرایی پیوند است به‌طوری‌که تشکیل پینه اولین رخداد و تغییر ظاهری در محل پیوند می‌باشد (Izadi et al., 2013). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تیمار اسید ایندول بوتریک با غلظت ۱۰۰ و بنزیل آدنین با غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر بر گیرایی پیوند موثرتر بودند. در شکل شماره ۸ تأثیر بنزیل آدنین (۴۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر میزان تشکیل پینه در محل پیوند مشاهده می‌شود. پیوند ژن‌های بیوسنتز کننده اکسین و ژن‌های سیگنالینگ را القا می‌کند و کاربرد بیرونی اکسین اغلب برای انجام پیوند ضروری است. اکسین‌ها و سایتوکینین‌ها موجب تحریک پینه‌دهی می‌شوند. استفاده از اسید ایندول بوتریک در محل پیوند از طریق افزایش تقسیم یاخته‌ای و طولیل شدن دیواره یاخته‌ای منجر به تشکیل سریع‌تر و بهتر پینه و متعاقباً موجب ترمیم و اتصال بهتر محل پیوند می‌شود (Kumar et al., 2018). تشکیل پینه مسیر اولیه برای انتقال آب تا زمان تشکیل ارتباط آوندی را فراهم می‌کند. این تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی باعث می‌شوند که پیوندک قبل از خشک شدن و از دست دادن مواد غذایی بتواند با پایه ارتباط کامل ایجاد کند. اکسین نه تنها فعالیت لایه زاینده را کنترل می‌کند بلکه نوع یاخته‌های در حال تشکیل لایه زاینده را نیز تعیین می‌کند و باعث هیدرولیز نشاسته و انتقال قندها و مواد مغذی به محل برش پایه می‌شود (Sharma and Zheg, 2019). اکسین با غلظت مناسب در افزایش سرعت رشد یاخته‌های پایه و پیوندک بسیار مؤثر بوده و این سرعت رشد باعث افزایش سرعت اتصال بین پایه و پیوندک شده و درصد گیرایی را به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد. امروزه مشخص شده است که کاربرد موضعی اکسین می‌تواند جایگزین پریموردیای برگ در القا اتصالات آوندی در ساقه شود و باعث تشکیل آوندهای جدید از یاخته‌های پارانشیمی شود. از طرفی غلظت به رفته اسید ایندول استیک نیز مهم می‌باشد، به‌طوری که در غلظت‌های پایین آوند آبکش و در غلظت‌های بالا آوندهای چوب تمایز می‌یابد (Nanda and Melnyk, 2018). تیمار پیوندک توسط تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و یا آنتی‌اکسیدان‌ها سبب افزایش درصد گیاهان ریزپیوندی می‌شود (Farsi et al., 2018). تنظیم‌کننده‌های رشد نظیر بنزیل آمینوپورین می‌تواند باعث رشد سریع‌تر پیوندک شود و به گیاهچه‌ها اجازه می‌دهد که در کمتر از ۶ هفته بعد از ریزپیوندی به میزان رشد لازم برای انتقال به گلخانه برسند (Alzate et al., 2018). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که صرف نظر از اثر تیمار قارچ ریشه و اسید آسکوربیک با افزایش غلظت اکسین مولفه‌های اندازه‌گیری شده زیر تأثیر مثبت قرار گرفت و بهترین نتایج با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید ایندول بوتریک قرار گرفت اما نتایج در مورد کاربرد سایتوکینین کمی متفاوت بود به‌طوری که بهترین موفقیت در گیرایی پیوند در بنزیل آدنین غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد. گزارش شده است که در محل زخم در گیاه آرابیدوپسیس، ژن‌های دخیل در بیوسنتز سایتوکینین تنظیم و افزایش می‌یابند و به نظر می‌رسد که تشکیل پینه در محل زخم گیاه آرابیدوپسیس در واکنش به همین تغییرات باشد (Iwase et al., 2011). براساس نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر، غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین در بیشتر مولفه‌ها اثر کاهشی داشت. مشخص شده است که کاربرد تنظیم‌کننده‌ها در غلظت‌های بالا و نامناسب، اثر بازدارندگی دارند. تحقیقات بر روی اثر سایتوکینین گاهی اوقات متناقض می‌باشد و به نظر می‌رسد که به تنهایی برای پیوند اهمیت زیادی ندارد. به احتمال فراوان اثر تحریک‌کنندگی و بازدارندگی آن به دلیل برهمکنش و غلظتی است که با دیگر هورمون‌ها از جمله اکسین دارد. در یک پژوهش گزارش شده است که انواع مختلف سایتوکینین در سطوح متفاوت اسید ایندول استیک اثرات متفاوتی بر گیاه حسن یوسف دارد، به‌طوری‌که کاربرد زآتین همراه با مقدار پایین اسید ایندول استیک بیشتر در تمایز یابی آوندی مؤثر بود، اما کینتین در مقدار بالای اسید ایندول استیک تأثیر کمی داشت (Aloni et al., 1990). به هر حال برای حصول نتایج دقیق و همچنین غلظت بهینه تنظیم‌کننده رشد نیاز به بررسی‌های بیشتری می‌باشد.

یکی از عوامل مهم بازدارنده در گیرایی پیوند وجود غلظت‌های بالای ترکیبات فنولی در بافت‌های رویشی پسته است که وجود آن در ترشحات آوند چوب، از تشکیل بافت پینه جلوگیری می‌کند. ترکیبات فنولی پس از صدمه دیدن بافت در حین پیوند زدن، با فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز، اکسید شده و موجب قهوه‌ای یا سیاه شدن بافت مزبور می‌شوند. از طرفی اکسیداسیون فنول‌ها باعث رسوب پروتئین‌ها در محل پیوند می‌شود و لایه‌ای نکروزه از یاخته‌های مرده در محل پیوند ایجاد می‌شود که از گیرایی پیوند جلوگیری می‌کند. در یک پژوهش در گردو علت کاهش گرای پیوند وجود ترکیبات فنولی گزارش شده است (Rongting and Pinghai, 1993). بنابراین استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها به منظور کاهش اکسیداسیون ترکیبات پلی‌فنولی و در نتیجه کاهش قهوه‌ای شدن قسمت‌های برش یافته می‌تواند راهی مفید برای بهبود شرایط تکثیر و پیوند در پسته باشد. نتایج آزمایشات سایر پژوهشگران نیز بیانگر نقش مثبت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در گیرایی پیوند می‌باشد. به‌طور مثال، در یک آزمایش مشخص شد که تیمار محل پیوند با آنتی‌اکسیدان‌های پلی‌وینیل پیرولیدین، آلومین و اسید آسکوربیک، میزان گیرایی پیوند و درصد زنده‌ماندن آن‌ها نسبت به شاهد افزایش یافت که دلیل آن، جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های اکسید کننده اسید ایندول استیک (IAA) و اکسید شدن فنول‌ها می‌باشد (Zakynthinos and Rouskas, 1997). همچنین فرو بردن پیوندک در محلول‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر اسید آسکوربیک و اسید سیتریک سبب کاهش قهوه‌ای شدن و جلوگیری از خشک شدن پیوندک در بادام هندی گردید (Thimmappaiah Puthra and Anil, 2002). کاربرد سایتوکینین BAP همراه با آنتی‌اکسیدان‌های PVP، آلومین و اسید آسکوربیک در گیرایی پیوند نتیجه بهتری نسبت به کاربرد جداگانه آن‌ها دارد به‌علاوه با کاربرد این مواد آغاز تشکیل پینه در مقایسه با شاهد خیلی زودتر بوده و بعد از گیرایی نیز رشد جوانه پیوندی خیلی زودتر آغاز می‌شود (Zakynthinos and Rouskas, 1997). این نتایج با نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر در تضاد می‌باشد زیرا تیمار اسید آسکوربیک به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان اثرات متفاوتی داشت به‌طوری که در بیشتر موارد اثر معنی‌داری بر ریزپیوندی نداشت و حتی در ترکیب با تنظیم‌کننده‌های رشد، اثر بازدارنده نیز داشت. در تایید نتایج پژوهش حاضر گزارش شده است که کاربرد آنتی‌اکسیدان‌ها به‌طور قابل توجهی میزان موفقیت در پیوند را کاهش می‌دهد (Javanshah, 1994). این پژوهشگران پیشنهاد کردند که دلیل این امر می‌تواند رطوبت بیش از حد ایجاد شده توسط محلول باشد که این خود باعث رقیق شدن مواد مسوول در گیرایی پیوند می‌شود. در راستای نتایج پژوهش حاضر نتایج یک آزمایش دیگر نیز قابل ارزیابی می‌باشد. در آزمایشی که بر روی گیاه *Protea cynaroides* انجام شد خیساندن ریزپیوندک‌ها در محلول آنتی‌اکسیدان (اسید آسکوربیک و اسید سیتریک) به شدت باعث سیاه شدن بافت در محل پیوند گردید. در این آزمایش بهترین نتایج با ریزپیوندک‌های بدون تیمار (شاهد) به‌دست آمد (Wu et al., 2007). همچنین یک دلیل احتمالی مهم در عدم مهار اکسیداسیون فنول توسط محلول آنتی‌اکسیدانی ممکن است استفاده از غلظت پایین اسید آسکوربیک به کار رفته در پژوهش حاضر باشد زیرا گیاه پسته از جمله گیاهانی می‌باشد که مقدار ترکیبات فنول در بافت‌ها بسیار بالا می‌باشد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که همزیستی قارچ ریشه تأثیر چندانی بر مولفه‌های مربوط به گیرایی پیوند نداشت که این موضوع به‌طور کامل قابل انتظار بود زیرا در فرآیند گیرایی پیوند ریشه‌ها فرصت کافی جهت آلودگی با قارچ را نداشتند و درصد آلودگی پایین بود اما وجود تیمار قارچ ریشه پس از گیرایی بر رشد بعدی پیوندک و درصد زنده‌مانی اثر معنی‌داری داشت. طول پیوندک، وزن کل تر و خشک پیوندک و تعداد برگ گیاهان قارچ ریشه هم در حد معنی‌داری بیشتر از گیاهان بدون قارچ ریشه بود. تحقیقات نشان داده است که تلقیح گیاهان با قارچ ریشه-آریسکولار در چنین شرایطی نقش مهمی را در افزایش تحمل گیاه به محدوده وسیعی از تنش‌های محیطی ایفا می‌نماید که این همزیستی می‌تواند از بهبود روابط آبی، کسب مواد غذایی بیشتر و همچنین اصلاح ساختار خاک و تولید تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، در مقاومت گیاه موثر باشد (Bagheri et al., 2019). مشخص شده که ریشه‌هایی که با قارچ ریشه‌ها همزیستی ایجاد می‌کنند از نظر فیزیولوژیکی و متابولیکی تغییراتی حاصل می‌کنند. مقدار تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مانند اکسین و سایتوکینین در این ریشه‌ها افزایش می‌یابد که می‌تواند منشأ قارچی و یا گیاهی داشته باشد. توزیع مواد فتوسنتزی بین ریشه و اندام هوایی با تلقیح ریشه تغییر می‌کند و کیفیت و کمیت ترشحات ریشه نیز دست‌خوش تغییراتی می‌شود. مهم‌ترین تأثیر قارچ ریشه افزایش رشد گیاهی است. از دیگر دلایل مؤثر بر میزان رشد توسط قارچ ریشه‌ها، اثر این قارچ‌ها بر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به‌ویژه اسید ایندول استیک می‌باشد. افزایش مقدار اسید ایندول استیک، جیبرلین و سایتوکینین در گیاه *Prosopis juliflora* همزیست با

*G. fasciculatum* گزارش شده است (Selvaraj and Chellappan, 2006). نتایج پژوهش حاضر هم نشان داد که میزان رشد پیوندک و به دنبال آن تعداد برگ‌ها در آزمایش اول و دوم در تیمارهای قارچ ریشه نسبت به تیمارهای بدون قارچ ریشه بیشتر بود و این بیانگر تأثیر مثبت قارچ ریشه در میزان رشد پیوندک می‌باشد که با گزارشات فوق مبنی بر افزایش رشد توسط قارچ ریشه مطابقت دارد. همچنین در پژوهش حاضر وزن خشک پیوندک در هر دو آزمایش در تیمار قارچ ریشه نسبت به تیمار بدون قارچ ریشه افزایش داشت که با گزارشات دیگر پژوهشگران (Morone-Fortunato and Avato, 2008) مطابقت دارد. قارچ ریشه‌ها می‌توانند از طریق توسعه یک سیستم ریشه‌ای وسیع، افزایش کارایی فتوسنتزی و ظرفیت هدایت آب، افزایش جذب عناصر غذایی، دفع پاتوژن‌های خاکی و در نهایت با کاهش اثرات تنش‌های محیطی موجب رشد و عملکرد گیاهان شوند (Quiroga et al., 2017). تاکنون مطالعات زیادی بر نقش قارچ ریشه- آریسکولار بر گیرایی پیوند صورت نگرفته است اما احتمال داده می‌شود که چون این قارچ‌ها سبب آزاد شدن هورمون‌ها به‌ویژه اسید ایندول استیک می‌شود پس می‌توانند در گیرایی پیوند نقش داشته باشند. از طرفی چون این قارچ‌ها سبب مقاومت گیاهان در برابر تنش رطوبتی می‌شوند به همین دلیل در ایجاد مقاومت پیوندک در اثر کاهش رطوبت نقش دارند.

همان‌طور که در نتایج آورده شده است با افزایش غلظت اسید ایندول بوتریک و اسید آسکوربیک میزان کلونیزاسیون ریشه نیز افزایش یافت. مشخص شده است که اکسین به‌عنوان یک هورمون مهم در تشکیل ریشه‌های جانبی نقش دارد. از طرفی کلونیزاسیون قارچ از طریق همین ریشه‌های جانبی صورت می‌گیرد. علاوه بر این اکسین‌ها باعث افزایش جوانه‌زنی اسپور و رشد هیف و افزایش سرعت آلودگی و درصد آلودگی می‌شوند (Ludwig-Müller, 2010). نتایج پژوهش حاضر اما در مورد بنزیل‌آدنین متفاوت بود به‌طوری که با افزایش غلظت بنزیل‌آدنین به‌ویژه در تقابل با اسید آسکوربیک از میزان درصد کلونیزاسیون کاسته شد. مطالعات زیادی نشان داده شده است که سایتوکینین به عنوان یک تنظیم کننده منفی بر آغاز ریشه‌های جانبی عمل می‌کند جایی که محل اولیه نفوذ هیف‌های قارچ می‌باشد (Fukaki and Tasaka, 2009). در هر صورت اطلاعات مشخصی در این مورد وجود ندارد.

## نتیجه‌گیری

ریزپیوندی یکی از روش‌های نسبتاً جدید برای تکثیر گیاهان می‌باشد که در گیاهان چوبی به منظور تولید گیاهان بدون بیماری، بازجوان سازی، بررسی موثر سازگاری پایه و پیوندک و افزایش غیرجنسی همسانه‌ها استفاده می‌شود. پژوهش حاضر نشان داد که برخلاف تکثیر پسته از روش پیوند سنتی که سن باردهی را به ۷ و ۸ سال کاهش می‌دهد، اما امکان استفاده از پیوند ایپی کوتیل در پسته وجود دارد به‌طوری که گیرایی پیوند در این شیوه در آزمایش حاضر نزدیک به ۱۰۰ درصد رسید. ریزپیوندی برون شیشه‌ای در پسته باعث کاهش تلفات انتقال به شرایط آزاد می‌شود و حتی گیرایی بالاتری نسبت به شرایط درون شیشه‌ای دارد. براساس نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، مشخص شد که کاربرد اسید ایندول بوتریک و بنزیل‌آدنین اثر مثبت بر کاهش زمان لازم بر گیرایی و درصد گیرایی داشتند که در پژوهش حاضر غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید ایندول بوتریک و غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آدنین نسبت به غلظت‌های دیگر نتایج بهتری نشان دادند. علاوه بر این مشخص گردید که کاربرد اسید ایندول بوتریک و بنزیل‌آدنین به همراه اسید آسکوربیک نتایج بهتری نسبت به کاربرد تنهایی هر کدام از آنها داشت. تاکنون مطالعه کاملی روی اثر قارچ ریشه‌ها بر گیرایی پیوند صورت نگرفته است اما احتمال داده می‌شود که چون این قارچ‌ها سبب آزاد شدن اسید ایندول استیک می‌شود پس می‌توانند در گیرایی پیوند نقش مثبت داشته باشند. در هر صورت برای ریزپیوندی برون‌شیشه‌ای پسته و غلبه بر مشکلات پیوند پسته نیاز به تحقیقات بیشتری در این زمینه می‌باشد.

## سپاس‌گزاری

بدین‌وسیله از گروه علوم باغبانی دانشگاه ولی‌عصر (عج) و پژوهشکده پسته رفسنجان برای انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

## References

- Aloni, R., S.F. Baum and C.A. Peterson. (1990). The role of cytokinin in sieve tube regeneration and callose production in wounded *Coleus* internodes. *Plant Physiology*, 93, 982-989.
- Alzate, A., N. Royero, V. Nunez, J. Cabra, J. Tohme and A. Mejia-Jimenez. (2002). Optimization of the *in vitro* propagation methodology of selected clones of soursop (*Annona muricata* L.) and evaluation of the compatibility of different scion and rootstock combinations for in vitro micrografting. Annual Report CIAT.
- Bagheri, V., M.H. Shamshiri, H. Alaei and H. Salehi. (2019). The role of inoculum identity for growth, photosynthesis, and chlorophyll fluorescence of zinnia plants by arbuscular mycorrhizal fungi under varying water regimes. *Photosynthetica*, 57, 409-419.
- Bai, Q., Z. Ma, Y. Zhang, S. Su and P. Leng. (2019). The sex expression and sex determining mechanism in *Pistacia* species. *Breed Science*, p:18167.
- Can, C., M. Özaskan, H. Töremen, K. Sarpkaya and E. Iskender. (2006). In vitro micrografting of pistachio, *pistacia vera* L. var. Siirt, on wild pistachio rootstocks. *Journal of Cell & Molecular Biology*, 5, 25-31.
- Dolcet-Sanjuan, R., E. Claveria, A. Camprubi, V. Estaun and C. Calvet. (1996). Micropropagation of walnut trees (*Juglans regia* L.) and response to arbuscular mycorrhizal inoculation. *Agronomie*, 16, 639-645.
- Farsi, M., M.R. Fatahimoghadam, Z. Zamani and D. Hasani. (2018). Effects of scion cultivar, rootstock age and hormonal treatment on minigrafting of persian walnut. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 5, 185-197.
- Fukaki H. and M. Tasaka. (2009). Hormone interactions during lateral root formation. *Plant molecular biology and biotechnology*, 69, 437 – 449.
- Heidary-Sharifabad, A., M.S. Zarchi and G. Zarei. (2021). ICPTC: Iranian commercial pistachio tree cultivars standard dataset. *Data in Brief*, 38, 107348.
- Huarachi Morejon, N. (2013). Genetic and Environmental Factors Affecting Improvement of Rootstocks for Tomato. Doctoral dissertation, The Ohio State University.
- Iwase, A., N. Mitsuda, T. Koyama, K. Hiratsu, M. Kojima, T. Arai, Y. Inoue, M. Seki, H. Sakakibara, K. Sugimoto, and M. Ohme-Takagi. (2011). The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 21, 508-514.
- Izadi, Z., H. Zarei and M. Alizadeh. (2013). Role of grafting technique on the success of stenting propagation of two rose (*Rosa* sp.) varieties. *American Journal of Plant Sciences*, 4, 41-44.
- Javanshah, A. (1994). Epicotyl grafting in pistachio (*Pistachio vera* L.) 1<sup>st</sup> international symposium on pistachio nut, Adena-Turkey, 20<sup>th</sup> -24<sup>th</sup> September.
- Kumar, R.S., L.X. Gao, H.W. Yuan, D.B. Xu, Z. Liang, S.C. Tao, W.B. Guo, D.L. Yan, B.S. Zheng and J. Edqvist. (2018). Auxin enhances grafting success in *Carya cathayensis* (Chinese hickory). *Planta*, 247, 761-772.
- Ludwig-Muller, J. (2010). Hormonal responses in host plants triggered by arbuscular mycorrhizal fungi. In: Koltai H, Kapulnik Y, eds. Arbuscular mycorrhizas: physiology and function, 2nd edn. Dordrecht: Springer, 169 – 190
- Morone-Fortunato, I. and P. Avato. (2008). Plant development and synthesis of essential oils in micropropagated and mycorrhiza inoculated plants of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture Journal*, 93, 139-149.
- Nanda, A.K. and C.W. Melnyk. (2018). The role of plant hormones during grafting. *Journal of Plant Research*, 131, 49-58.
- Onay A., V. Pirinc, F. Adiyaman, C. Isikalan, E. Tilkat and D. Basaran. (2003). *In vivo* and *in vitro* micrografting of pistachio, *Pistacia vera* L. cv Siirt. Turkey Journal of Biology. *Turkish Journal of Biology*, 27, 95-100.
- Padilla, I.M.G. and C.L. Encina. (2011). The use of consecutive micrografting improves micropropagation of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) cultivars. *Science Horticulture*, 129, 167-169.
- Phillips, J.M. and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *British Mycological Society*, 55, 158-161.
- Quiroga, G., G. Erice, R. Aroca, F. Chaumont and J.M. Ruiz-Lozano. (2017). Enhanced drought stress tolerance by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in a drought-sensitive maize cultivar is related to a broader and differential regulation of host plant aquaporins than in a drought-tolerant cultivar. *Front. Plant Science*, 8, 1-15.
- Rasool, A., S. Mansoor, K.M. Bhat, G.I. Hassan, T.R. Baba, M.N. Alyemeni, A.A. Alsahli, H.A. El-Serehy, B.A. Paray and P. Ahmad. (2020). Mechanisms underlying graft union formation and rootstock scion interaction in horticultural plants. *Front. Plant Science*, 11, 1-19.
- Rehman, H.U. and M. I. S. Gill. (2015). Micrografting of fruit crops-A review. *Journal of Horticulture*, 2, 1-7.
- Rongting, X. and D. Pinghai. (1993). A study on uniting process of walnut grafting and the factors affecting.

- Acta Horticulturae*, 311, 160-170.
- Selvaraj, T. and P. Chellappan. (2006). Arbuscular mycorrhizae: A diverse personality. *Journal of Central European Agriculture*, 7, 349-358.
- Sharma, A. and B. Zheng. (2019). Molecular responses during plant grafting and its regulation by auxins, cytokinins, and gibberellins. *Biomolecules*, 9, 2-20.
- Tataranni, G., G. Montanaro, B. Dichio and C. Xiloyannis. (2011). June. Effects of mycorrhizas on hydraulic conductivity in micrografted Myrobalan 29C rootstocks. In XV International Symposium on Apricot Breeding and Culture 966, pp. 235-240.
- Thimmappaiah Puthra, G.T. and S.R. Anil. (2002). In vitro grafting of cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Science Horticulture*, 92, 177- 182.
- Torahi, A. and M. Ali Hourii. (2012). The most suitable method and time of ber tree (*Ziziphus spinachristi* L.) budding in Ahvaz. *Plant Productions*, 34, 75-89. (In Persian).
- Wu, H.C., E.S. Du Toit and C.F. Reinhardt. (2007). Micrografting of *Protea cynaroides*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 89, 23-28.
- Zakinthinos, G. and D. Rouskas. (1997). Specific treatments on walnut grafting improvement. *Acta Horticulturae*, 442, 285-290.

## Interaction of Growth Regulators and Arbuscular Mycorrhizal Fungi on *In Vivo* Micrografting of Pistachio (*Pistacia vera* L.)

Zeinab Sadeghi<sup>1</sup>, Mohammad Hossein Shamschiri<sup>1</sup>, Vahed Bagheri<sup>1\*</sup> and Amanullah Javanshah<sup>2</sup>

1. Department of Horticultural Science, College of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran

2. Pistachio Research Center, Rafsanjan, Iran

\* Corresponding Author, Email: (v.bagheri@vru.ac.ir).

Micrografting is an important technique supporting the micropropagation of a range of plant species, particularly woody plant species. In the past decade, *in vivo* and *in vitro* micrografting has become a strategy to facilitate shoot recovery and acclimatization of horticultural species. This experiment was conducted to study pistachio (*P. vera* L.) micrografting under *in vivo* condition and interaction of growth regulator and arbuscular mycorrhizal fungi on micrografting success and establishment. The scions were prepared from shoot tips of 6-7 years- old mature trees of "Ahmad Aghaie" cultivar and were micrografted on 14-deys- old "Qazvini" under controlled conditions. In order to examine the effect of mycorrhizal symbiosis on micrografting success and establishment, inoculation of rootstocks with mycorrhizae (*Funneliformis mosseae*) was performed at the time of seed sowing. After floating the scions in ascorbic acid (0 and 400 mg L<sup>-1</sup>) for 60 min, they were treated with IBA (0, 50 and 100 mg L<sup>-1</sup>) and BA (0, 40 and 80 mg L<sup>-1</sup>). The results showed that, mycorrhizal inoculation had a positive influence on graft success percentage, survival percentage, scion growth, scion dry weight and leaf number. With the use of growth regulator, the success rate of micrografting increased so that the level of 100 mg L<sup>-1</sup> of indolebutyric acid and 40 mg L<sup>-1</sup> of benzyl adenine was observed to be more effective than other levels. In this study, ascorbic acid treatment had different effects, but in most cases it did not have a significant effect on micrografting, even in combination with growth regulators, the treatment had a negative effect. According to the results obtained from this study, it seems that the use of growth regulator and AM fungi had a positive effect on the survival rate of micrografted plants and these plants had a longer survival.

**Keywords:** Antioxidant, Growth Regulator, Mycorrhizal, Pistachio, Micrografting.