Archive of SID

پیوند خزانه ای در چای

فاضل پورحقگوی سرشکه[1،*] مهران غلامی[2]

۱-فاضل پورحقگوی سرشکه، محقق مرکز تحقیقات چای کشور

۲- مهران غلامی، محقق مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گیلان

Email: fps.tea44@gmail.com

Email:mehrangholami@yahoo.com

چکیده

به منظور دستیابی به فن پیوند خزانه‌ای در چای و تولید گیاهان پیوندی پروژه ای در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با ۹ تیمار و سه تکرار در ایستگاه تحقیقات شهید اسلامی لاهیجان به اجرا درآمد. در این تحقیق از سه ژنوتیپ شامل: کلون امیدبخش 100، ژنوتیپ انتخابی 2021 و رقم DN (سریلانکایی) به عنوان پایه و پیوندک استفاده شد. اندازه گیری برخی صفات کیفی مانند پلی فنل کل، میزان فعالیت آنزیم های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز و درصد زنده مانی پیوند و نهال های شاهد در بعد از پیوند مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بین گیاهان پیوندی و غیر پیوندی(شاهد) ازنظر درصد زنده مانیبرای تفاوت معنی داری (α=٪۱) وجود داشت به طوری که درصد زنده مانی نهال های قلمه ای در همه موارد بیش از نهال های پیوندی بوده است. در بین ترکیبات پیوندی، پیوند 100/DN(پایهDN پیوندک100) با ۵۶ درصد بیشترین درصد زنده مانی را نشان داد. همچنین نتایج نشان داد که از نظر پلی فنل کل، آنزیم پلی فنل اکسیداز تفاوت معنی داری (α=٪۱) بین گیاهان پیوندی و غیر پیوندی وجود داشت اما بین گیاهان پیوندی و غیر پیوندی از نظر آنزیم پراکسیداز اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. مقایسه میانگین ها نشان داد که بیشترین مقدار پلی فنل کل مربوط به گیاهان پیوندی 100/2021 (پایه 2021 پیوندک100) به میزان ۱۳/۷۵درصد و کمترین مقدار نیز مربوط به تیمار 100 (شاهد) به میزان ۱۰/۴۲ درصد بود.

واژه‌های کلیدی: کاملیا سیننسیس، پیوند خزانه ای، اثر متقابل پایه وپیوندک، چای

مقدمه

فن پیوند در خزانه، تنها یک وسیله مصنوعی برای توسعه گیاهان مرکبی است که خصوصیات شناخته شده مطلوب و محدودی (دو یا بیشتر از دو خصوصیت مطلوب) دارند و برای ترکیب تحمل تنش با تولید محصول اقتصادی در مکان های دارای شرایط تنش محیطی خاص، مناسب اند و البته در حال حاضر امکان این ترکیب از طریق گزینش کلونی فعلی وجود ندارد(پاله مولا و همکاران، ۱۹۹۲). پیوند زدن برای تولید گیاهان مرکب یک فن رایج در باغبانی است. چون ساختار ژنتیکی چای بسیار هتروزیگوت است، گیاهان مرکبی که از طریق پیوند قلمه بر روی پایه مادری تولید می شوند، از جایگاه علمی و اهمیت تجاری قابل توجهی برخوردارند. ترکیب دو گیاه با ساختار ژنتیکی متفاوت که دارای خصوصیات متنوعی هستند، می تواند فرصت های جدیدی را برای مطالعه این خصوصیات و استفاده از آنها فراهم سازد. تلاش های گذشته برای بررسی اثر پیوند در: (۱) روابط رشد و رکود رشد (دورمانسی) (۲) تحریک گیاه برای تولید زود هنگام شاخساره های کلونی مطلوب از طریق پیوند زدن بر روی بوته های بذری قدیمی چای و (۳) برای به دست آوردن عملکرد بالاتر و برای تحمل شرایط تنش رطوبتی از طریق پیوند بر روی پایه های مناسب بوده است. ضروری است که برای تامین اهداف تجاری، برخی از خصوصیات مطلوب مانند عملکرد بالا، کیفیت خوب و مقاومت به آفات و بیماری ها، مقاومت به خشکی، و غیره در ژنوتیپ ها وجود داشته باشد(کاتیراویتپلایی،۱۹۸۸).

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش ها

به منظور دستیابی به فن پیوند خزانه‌ای در چای و تولید گیاهان پیوندی، پروژه ای در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با ۹ تیمار و سه تکرار در ایستگاه تحقیقات شهید اسلامی لاهیجان به اجرا درآمد. در این تحقیق از سه ژنوتیپ شامل: کلون امیدبخش 100، ژنوتیپ انتخابی 2021 و رقم DN (سریلانکایی) به عنوان پایه و پیوندک استفاده شد. به منظور انجام پیوند خزانه‌ای، از هر یک از ژنوتیپ‌های مذکور یک بار به عنوان پایه و بار دیگر به عنوان پیوندک استفاده گردید. پیوندک گوه‌ای شکلی به طول ۱/۵ سانتی‌متر که از دو طرف برش داده شده اند، بر روی ساقه ۲/۵ سانتی‌متری پایه قرار گرفت. برش ها طوری صورت گرفت که برگ های پایه و پیوندک به موازات هم قرار گیرند. با توجه به اهمیت برقراری تماس کامل بین لایه کامبیوم پایه و پیوندک، لازم بود که دقت لازم در انتخاب پایه و پیوندک هم اندازه اعمال گردد. پس از انجام پیوند، محل اتصال ژنوتیپ‌ها توسط نوار پلی اتیلنی به دقت پوشانده شد و به طور کامل محافظت گردید. سپس پایه‌ها که از قبل و مانند قلمه‌های معمولی و به طور یک طرفه برش خورده بودند با فاصله ۱۵ × ۱۵ سانتی متر در خزانه‌های از قبل آماده شده کشت شدند. مراقبت از خزانه‌ها با توجه به اهمیت حفظ رطوبت و تأمین شرایط سایبان و کنترل دمای خزانه انجام شد. اندازه گیری برخی صفات مانند درصد زنده مانی، میزان فعالیت آنزیم های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز بعد از پیوند انجام و مورد بررسی قرار گرفت . سنجش مقدار کل فنل‌ها به روش رنگ‌سنجی (استاندارد بین المللی،۲۰۰۴)، سنجش فعالیت آنزیم های پراکسیداز(آدام و همکاران، ۱۹۹۲) و پلی فنل اکسیداز(هوآنگ و دیگران،۲۰۰۷) به روش اسپکتروفتومتری در نمونه‌های تهیه شده از نزدیک ترین برگ به محل پیوند در تیمارهای تحت آزمایش به شرح زیر در سال دوم انجام شد.

به منظور آماده سازی عصاره برای سنجش فعالیت آنزیم ها از بافر استخراج شامل: بافر پتاسیم فسفات ۵۰mM با pH=۷/۲، PVPP ۱۰٪، EDTA ۰/۵mM، تریتون ۰/۲٪ و PMSF ۱mM استفاده شد. به ۰/۵ گرم برگ از هر نمونه، ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج انجام افزوده شد و عملیات استخراج روی یخ انجام گردید. سانتریفوژ در rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در $4^{\circ}C$ انجام پذیرفت. محلول روشناور حاصل تا زمان آزمایش در فریزر نگهداری شد. برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز ۹۵۰ میکرو لیتر محلول واکنش (شامل۴۷۵ میکرولیتر گایاکول ۴۵ میلی‌مولار، ۴۷۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۰۰میلی‌مولار) با ۵۰ میکرولیتر محلول روشناور مخلوط شد. تغییرات جذب برای ۲ دقیقه (اکسیداسیون گایاکول) در طول موج ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای محاسبه فعالیت آنزیمی از ضریب خاموشی (۲۶/۶mM-1/cm-1) استفاده گردید. در نهایت میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز بر حسب واحد آنزیمی در گرم بافت تازه (Unit/gr FW) محاسبه گردید. بنابر تعریف، هر واحد آنزیمی عبارت است از مقداری از آنزیم که سبب افزایش یک صدم درصد جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر در هر دقیقه می‌شود.

برای سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز ۳ میلی لیتر محلول واکنش (شامل ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ mM با pH= ۷/۲ ، ۰/۲ میلی لیتر پیروگالول ۰/۰۲M) با ۵۰ میکرولیتر محلول روشناور مخلوط شد. عدد جذب در طول موج ۴۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. در نهایت میزان فعالیت آنزیم با ضریب خاموشی۱-cm/ ۱- ۰/۰۰۱mM بر حسب واحد آنزیمی در گرم بافت تازه (Unit/gr FW) محاسبه گردید. برای آنزیم پلی فنل اکسیداز واحد آنزیمی بیانگر مقدار آنزیمی است که بتواند سوبسترا را به محصول تبدیل نماید.

نتایج

نتایج نشان داد که بین گیاهان پیوندی و غیر پیوندی(شاهد) ازنظر درصد زنده مانی ، تفاوت معنی داری (α=٪۱) وجود داشت به طوری که درصد زنده مانی نهال های قلمه ای در همه موارد بیش از نهال های پیوندی بوده است(جدول۱) در بین ترکیبات پیوندی، پیوند 100/DN (پایهDN پیوندک100) با ۵۶ درصد بیشترین درصد زنده مانی را نشان داد(جدول۲). همچنین نتایج نشان داد که از نظر آنزیم پلی فنل اکسیداز تفاوت معنی داری (α=٪۱) بین گیاهان پیوندی و غیر پیوندی وجود داشت. اما بین گیاهان پیوندی و غیر پیوندی از نظر آنزیم پراکسیداز این اختلاف معنی دار نبود. از نظر پلی فنل کل تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ در بین تیمارهای مورد بررسی وجود داشت(جدول۱). مقایسه میانگین ها نشان داد که بیشترین درصد پلی فنل کل با ۱۳/۸ درصد مربوط به گیاهان پیوندی 100/2021(پایه 2021، پیوندک100) بوده است وکمترین درصد پلی فنل کل نیز به میزان ۱۰/۳درصد در نهال های پیوندی 100/2021 مشاهده گردید(جدول۲)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در نهال های پیوندی و غیر پیوندی

صفات / منابع تغییرات	درجه آزادی	آنزیم پلی فنل اکسیداز	آنزیم پراکسیداز	پلی فنل کل	درصدزنده مانی نهال ها
بلوک	۲	۰/۰۰۱ ns	۰/۱۴۵ ns	۲/۶۹۹ ns	۵۶۸/۴۴ *
تیمار	۸	۰/۰۰۸ **	۰/۰۳۲ ns	۳/۷۵۰ *	۱۶۱۹/۳۳ **
خطا	۱۶	۰/۰۰۱	۰/۰۳۳	۱/۳۵۲	۱۵۱/۲۷۹

جدول۲- مقایسه میانگین های برخی صفات نهال های پیوندی و غیر پیوندی

تیمار	پلی فنل اکسیداز	پلی فنل کل	درصد زنده مانی
100	۰/۰۹۶۳	۱۰/۴۲	۸۴
DN	۰/۱۶۵	۱۲/۲۶	۹۱/۳۳
2021	۰/۱۴۲	۱۱	۸۶
100/ DN	۰/۱۵۵	۱۲/۱۱	۵۶
DN/100	۰/۲۵۷	۱۱/۴۴	۵۲/۶۷
100/2021	۰/۱۸۷	۱۳/۷۵	۵۰
2021/100	۰/۱۸۲	۱۰/۲۸	۲۶/۶۷
2021/DN	۰/۲۳۳	۱۲/۴۸	۳۴/۶۷
DN /2021	۰/۲۳۴	۱۲/۴۶	۴۶/۶۷
	LSD=۰/۰۵۸۲	LSD=۲/۰۱۳	LSD=۲۱/۲۹

بحث ونتیجه گیری

نتایج بررسی ها نشان داد که بین گیاهان پیوندی و غیر پیوندی(قلمه به عنوان شاهد) ازنظر درصد زنده مانی اختلاف معنی داری(α=٪۱) وجود داشت به طوری که مقایسه ارتوگونال(گروهی) نشان داد که درصد زنده مانی گروه قلمه در همه موارد بیش ازگروه پیوند بوده است، اما تیمار های گروه قلمه نسبت به هم تفاوت معنی داری نداشتند. اگرچه نهال های کلون DN با ۹۱/۳ درصد دارای زنده مانی بیشتری نسبت به

www.SID.ir

Archive of SID

سایر کلون ها بود، ولی همگی در یک گروه آماری قرار گرفتند. همچنین مقایسات گروهی بین پایه و پیوندک ها نشان داد، زمانی که کلون امید بخش 100 به عنوان پایه استفاده می گردد، درصد زنده مانی نهال های پیوندی کمتر است و بر عکس زمانی که ژنوتیپ انتخابی 2021 به عنوان پایه مورد استفاده قرار می گیرد درصد زنده مانی نهال های پیوندی بیشتر می شود. همچنین مقایسه ارتوگونال نشان داد که پیوندک کلونDN نسبت به پیوندک دو کلون دیگر تاثیر بیشتری در تولید نهال های پیوندی دارد به طوری که وقتی این کلون برای دو کلون دیگر به عنوان پیوندک مورد استفاده قرار گرفت درصد زنده مانی نهال های تولیدی بیشتر گردید. از طرفی بر اساس نتایج به دست آمده چنین استنباط می شود که دو کلون 100 و DN سازگاری بیشتری برای تولید نهال پیوندی دارند به طوری که مقایسه میانگین ها نشان داد که پیوند 100/DN با ۵۶درصد و به دنبال آن پیوند DN/100 با ۵۲/۷ درصد بیشترین درصد زنده مانی را کسب نموده اند. از نظر فعالیت آنزیم پراکسیداز تفاوت معنی داری بین نهال های پیوندی و غیر پیوندی(قلمه ها) وجود نداشت. بدین معنی که اثر متقابل پایه و پیوندک بر روی فعالیت آنزیم پراکسیداز تاثیر گذار نبود. مقایسات ارتوگونال(گروهی) نیز نشان داد که بین گروه های قلمه و پیوند از نظر فعالیت آنزیم پراکسیداز تفاوت معنی داری وجود ندارد. اما فعالیت این آنزیم در پایه کلون 2021 نسبت به سایر کلون ها متفاوت بوده است. در مورد افزایش یا کاهش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در ارتباط با سازگاری پیوند نتایج مختلفی گزارش شده است به طوری که کاوادونچی و تاجی (۲۰۰۵) میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در بافت‌های پایه و پیوندک برای سازگاری پیوندک نخود روی پایه نخود و نیز روی پایه آکاسیا، گزارش نمودند که وقتی پیوندک‌ها روی پایه سازگار پیوند شدند، میزان فعالیت این آنزیم افزایش یافت. از طرفی دلوایر و هیبانت (۱۹۸۲) افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در پیوندهای ناسازگاری را در مقایسه با پیوندهای سازگار گزارش کرده‌اند. اما گولن و همکاران (۲۰۰۵) افزایش فعالیت معنی‌داری را برای این آنزیم در مطالعه پیوند گلابی- به مشاهده نکردند که این نتایج با نتایج گولن و همکاران(۲۰۰۵) مطابقت دارد، اما با نتایج کاوادونچی و تاجی(۲۰۰۵) و دلوایر و هیبانت (۱۹۸۲) مغایر است. با توجه به اینکه مقدار فعالیت این آنزیم در کلون های مختلف و در اندام های مختلف متفاوت است، ممکن است، این موارد علت نتایج غیر مشابه این تحقیق باشد. اما از نظر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز تفاوت معنی داری بین ژنوتیپ های پیوندی و غیر پیوندی(شاهد) وجود داشت به طوری که مقایسه میانگین ها نشان داد، بیشترین مقدار این آنزیم در ترکیب پیوندی DN/100 وجود داشت و بعد از آن ترکیبات پیوندیDN/2021 و2021/DN بیشترین میزان فعالیت این آنزیم را داشتند و با ترکیب پیوندی DN/100 در یک گروه آماری قرار گرفتند. از این نتیجه استنباط می شود که در اثر پیوند، فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز زیاد می شود. زیرا که کمترین میزان فعالیت این آنزیم در نهال های قلمه ای مشاهده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده تفاوت معنی داری از نظر پلی فنل کل در بین ژنوتیپ های چای وجود داشت به طوری که مقایسه میانگین ها نشان داد که بیشترین درصد پلی فنل کل با ۱۳/۷۵ درصد مربوط به گیاهان پیوندی 100/2021 و کمترین درصد پلی فنل کل نیز در گیاهان پیوندی 2021/100 به میزان ۱۰/۲۸درصد دیده شد. بر این اساس می توان نتیجه گرفت زمانی که کلون 100 روی کلون 2021 پیوند می شود، میزان پلی فنل کل افزایش می یابد ولی عکس این قضیه باعث کاهش میزان پلی فنل کل می گردد. از طرفی مقایسات ارتوگونال نشان داد میزان پلی فنل کل در پایه کلون 100 نسبت به سایر پایه کلون ها متفاوت است و حتی مقدار پلی فنل کل در پیوندک کلون 100 نسبت به پیوندک سایر کلون ها نیز متفاوت می باشد که این مقایسه، نتایج فوق را تایید می کند.

بنابر این می توان گفت که اثر عوامل محیطی، گیاهی و ژنتیک گیاه بر درصد پلی فنل کل تاثیرگذاربود. مالکی و شرما (۱۹۹۳)، گزارش کردند، پلی‌فنل‌ها مهمترین گروه از ترکیبات شیمیایی چای هستند و مقدار آنها در بوته چای به ژنتیک گیاه چای و به فاکتورهای محیطی مانند آب و هوا، نور، بارندگی، دما، خاک (ازلحاظ مواد غذایی قابل دسترس) و سن برگ بستگی دارد. بالاسوبرامانیان و همکاران(۲۰۱۰) گزارش که از نظر پلی فنل کل که نقش اصلی را از نظر کیفیت در هنگام ساخت بر عهده دارد، تفاوت معنی داری بین گیاهان پیوندی و غیر پیوندی Cr-6017 وجود نداشت. اما مقدار پلی فنل کل در این گیاهان بالا بود و در مقایسه با گیاهان غیر پیوندی UPASI-9 بیشتر و تفاوت آنها معنی دارنشان داد.

www.SID.ir

Archive of SID

References:

-Balasubramanian, L. Natto, A and S. Parathiraj. 2010. Unque graft combination of tea, Cr-6017/UPASI-9. CURRENT SCIENCE,VOL.98,NO.11.

- Bradford,M.M.1976.A rapid and sensitive method foe the quantitation of microgeram quantities of protein utilizing the principale of protein- dye binding.Analytical Biochemistry. 72:248-254.

-Deloire, A. and C. Hebant. 1982. Peroxidase activity and lignification at the interfase between stock and scion of compatible and incompatible grafts of Capsicum on Lycopersicum .Ann.Bot.49:887-891.

- Gulen, H., M. Polat., M. Celik and A. Eris. 2005. Cambial isoperoxidases related to graft compatibility in pear-quince graft combinations.Turk. J.Agric-For.29:83-89.

-Huang, Y., J. Sheng, F.Yang and Q. Hu. (2007). Effect of enzyme inactivation by microwave and oven heating on preservation quality of green tea. J. Food Engineering, 78(2), 687-692.

-Kathiravetpillai, A. 1988.Stock-Scion relationships in clonal tea. Proceedings of the Regional Tea (Scientific) Conference: 19th to 21st January 1988, BMICH, Colombo, Sri Lanka. Section 6 : Paper No. 14

- Kawaguchi, M. and A.Taji.2005.Anatomy and physiology of graft incompatibility in sturt ,s desert pea(Swaainsona Formosa), an Australian native plant.V international symposium on new floricultural crops ISHS, Acta Horticult.683.

-International Standard.2004.Determination of substances characteristic of green and black tea Part 1:content of total polyphenols in tea colorimetric method using folin ciocalteu reagent.ISO/FDIS. 14502-1. Web www.iso.org.

- Mac Adam, J.w., C.I. Nellson and R.E Sharp.1992.Peroxidase activity in the leaf elongation Zone of tall activity in genotypes differing in length of the elongation Zone .

-Mulky, M.J. and V.S. Sharma. 1993. Tea culture: processing and marketing, Bomby: Oxford and IBH.

-Pallemulla,D.,S.Shanmugarajah and A. Kathiravetpillai. 1992. Effect of grafting fresh cuttings on yield and drought resistance in tea. S.L.J.Tea.Sri.VOL.,61,NO.,2:45-50.

www.SID.ir