

Investigate the Possibility of Early Prediction of Sweet Cherry Graft Incompatibility by *in vitro* Techniques

Arezoo Jalali¹, Ebrahim Ganji Moghaddam^{2*} , Ali Marjani³

- 1- Ph.D. Student of Horticulture, Department of Agriculture, Faculty Agriculture, Bojnourd Branch, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran
- 2- Associate Professor, Department of crop and Horticulture Science Research, Khorasan Razavi, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Agriculture, Bojnourd Branch Islamic Azad University, Bojnourd, Iran

Citation: Jalali, A., Ganji moghaddam, E., & Marjani, A (2022) . Investigate the possibility of early prediction of sweet cherry graft incompatibility by in vitro techniques. *Plant Productions*, 45(2), 287-298.

Abstract

Introduction

Graft compatibility is one of the most problems in fruit tree. Determination graft compatibility, it may last a long time but it was achieved in a short time by in vitro techniques. Plants increase their capacity antioxidant rapidly when stress occurs to increase resistance and tolerance to the conditions created. Since grafting in plants is also considered a form of stress, this way. It can be said that the plant's ability to disperse excess energy and neutralize free radicals is impaired, thus increasing the antioxidant capacity to increase the resistance to stress, so in incompatible grafts increases phenolic compounds and peroxidase to minimize oxidative damage compared to compatible grafts. This study Investigation the possibility of early determination of grafting (in) compatibility of sweet cherry by compare phenolic compound and peroxidase activity in vitro techniques.

Materials and Methods

Two factorial experiment was carried out on the base of completely randomized design with three replications. Treatments including the first factor, four levels of sweet cherry cultivars "Bing", "Takdaneh", "Siyah Mashhad", and "Adli" and the second factor, four levels of rootstocks Gisela-5, Gisela-6 (compatibility control), Mahaleb-168, and GF-305 (incompatibility

* **Corresponding Author:** Ebrahim Ganji Moghaddam
E-mail: eganji@hotmail.com

control). Measurement of total phenolic compounds was determined according to the Folin-Ciocalteu method (Singleton et al., 1999). Antioxidant enzyme extraction was determined with the method of Mac Adam (1992) with some modifications. Analysis of variance was carried out by SAS software ver. 9.1 and mean comparison was conducted using LSD test.

Results and Discussion


The result showed that the highest and lowest percentage of grafting were “Bing” cultivar on Gisela-6 rootstock with an average of 64.21% and “Bing” cultivar on GF-305 rootstock of 1.1%. The highest number of leaves and longitudinal growth of scion was in “Bing” cultivar on Gisela-6. The highest number of roots and root lengths were in “Takdaneh” cultivar on Gisela-6 and “Bing” on Gisela-6. The highest amount of total phenol at the graft union was GF-305 and the lowest at the graft union was Gisela-5. The highest and lowest of peroxidase were at the graft union of “Bing” on-G5-305 and “Bing” and “Siyah mashhad” on Gisela. In general, the highest levels of total phenol and peroxidase at the graft union were higher on the GF-305 incompatible rootstock than Gisela-6 compatible rootstock. Therefore, our finding leads to the conclusion that phenolic compounds and peroxidase activity can be used to pre-screen for incompatible grafts. In general, the amount of total phenol in the grafts made on Gisela-6 (compatible control) and Gisela-5 rootstocks was less than GF-305 (incompatible control). GF-305 is incompatible with cherry cultivars. Phenolic compounds such as Catechins above the graft site can be used as a biochemical marker in the diagnosis of graft incompatibility (Baron *et al.*, 2019). Peroxidase levels in incompatible grafts were higher than compatible grafts. It seems that the peroxidase enzyme can be used to predict incompatible grafts quickly. Preliminary analyzes on the role of peroxidase indicate that this enzyme is involved in the formation of cell wall constituents and in the next step reduces the flexibility of the cell wall by creating cross-linking between phenolic polymers of the cell wall (Cassab & Varner, 1987).

Conclusion

The highest levels of total phenol and peroxidase at the graft union were higher on the GF-305 incompatible rootstock than Gisela-6 compatible rootstock. Therefore, the finding of this study leads to the conclusion that phenolic compounds (mostly) and peroxidase activity can be used to pre-screen for incompatible grafts

Keywords: Compatibility, Cultivar, Peroxidase, Phenol

بررسی امکان پیش‌بینی زود هنگام ناسازگاری پیوند گیلاس با استفاده از روش درون‌شیشه‌ای

آرزو جلالی^۱، ابراهیم گنجی مقدم^۲ *، علی مرجانی^۳

۱- دانشجوی دکتری باغبانی، گروه کشاورزی، دانشکده کشاورزی، واحد بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران
۲- دانشیار، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران
۳- استادیار، گروه کشاورزی، دانشکده کشاورزی، واحد بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران

چکیده

تعیین ناسازگاری پیوند ممکن است مدت‌ها به طول انجامد اما با استفاده از روش‌های درون‌شیشه‌ای در مدت زمان کوتاه می‌توان به این مهم دست یافت. این مطالعه سال ۱۳۹۸-۱۳۹۹ در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی با هدف بررسی امکان پیش‌بینی ناسازگاری پیوند گیلاس و مقایسه میزان فنل کل و پراکسیداز در پیوندهای سازگار و ناسازگار در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتور اول پیوندک در چهار سطح "بینگ"، "تکدانه"، "سیاه مشهد" و "عدلی"، فاکتور دوم پایه در چهار سطح گیزلا-۵، گیزلا-۶ (شاهد سازگار)، محلب-۱۶۸ و جی‌اف-۳۰۵ (شاهد ناسازگار) بود. نتایج نشان داد بیشترین و کمترین درصد گیرایی پیوند، به ترتیب در رقم بینگ روی پایه گیزلا-۶ با میانگین ۶۴/۲۱ درصد و بینگ روی پایه جی‌اف-۳۰۵ با میانگین ۱/۱ درصد بود. بیشترین تعداد برگ و رشد طولی پیوندک در پیوند بینگ روی گیزلا-۶ بود. بیشترین تعداد و طول ریشه، به ترتیب در پیوند تکدانه روی گیزلا-۶ و بینگ روی گیزلا-۶ مشاهده شد. بیشترین فنل کل در پیوند، تکدانه روی جی‌اف-۳۰۵ و کمترین فنل کل در پیوند، تکدانه روی گیزلا-۵ بود. بیشترین و کمترین میزان فعالیت پراکسیداز به ترتیب در محل پیوند بینگ روی جی‌اف-۳۰۵ و سیاه مشهد و بینگ روی گیزلا-۶ مشاهده شد. به‌طور کلی میزان فنل کل و پراکسیداز در محل پیوند، ارقام گیلاس روی پایه ناسازگار جی‌اف-۳۰۵ نسبت به پایه سازگار گیزلا-۶ بیشتر بود. بنابراین به نظر می‌رسد می‌توان از سنجش ترکیبات فنلی و پراکسیداز برای انجام پیش‌غربالگری پیوندهای ناسازگار استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: پراکسیداز، رقم، سازگاری، فنل

* نویسنده مسئول: ابراهیم گنجی مقدم
رایانامه: eganjmi@hotmail.com



مقدمه

امروزه باغداران خواهان حفظ درختانی هستند که دارای صفات ارزشمند است. با توجه به نقش پایه در میزان رشد، عادت رشد، زودباردهی، میزان تولید و اندازه میوه انتخاب پایه مناسب برای باغداران از اهمیت بسیاری برخوردار است (Ganji moghaddam and Gonabadi, 2017). پایه‌های گیزلا در سال‌های ۱۹۶۵ تا ۱۹۷۱ در دانشگاه گیزن آلمان از تلاقی آلبالو با یک گونه گیلاس حاصل شد. گیزلا-۶ هیبریدی از *P. cerasus P. canescens* است که به زود باردهی و عملکرد بالای محصول منجر می‌شود (Isikalan et al., 2011).

زمانی که پایه و پیوندک از دیگر گونه‌های جنس پرونوس باشند، ممکن است سازگاری خوبی بین آن‌ها مشاهده نشود. به‌عنوان مثال همیشه ارقام گیلاس و آلبالو با پایه محلب ترکیب سازگاری را تشکیل نمی‌دهند (Ganji moghaddam and Bouzari, 2017). طبق مطالعات (Long and Kaiser, 2010) پایه محلب-۱۶۸ با برخی از ارقام گیلاس مانند "Lapins, Chelan Tieton" ناسازگار است اما پایه‌های گیزلا با دامنه وسیعی از ارقام گیلاس سازگار است. از این‌رو پیش‌بینی اولیه و دقیق ناسازگاری بین پایه و ارقام گیلاس از اهمیت زیادی برخوردار است (Dogra et al., 2018).

روش ریزپیوندی در گیاهان چوبی به منظور بررسی سازگاری بین پایه و رقم، یکی از بهترین روش‌ها برای تهیه نهال‌های پیوندشده در زمانی کوتاه به دلیل نیاز نداشتن به بلوغ گیاهچه‌ها است (Mohamadzade and Hamidi, 2016).

با توجه به این‌که روش‌های سنتی تشخیص ناسازگاری پیوند پروسه‌ای زمانبر است استفاده از روش ریزپیوندی جهت پیش‌بینی زودهنگام ناسازگاری پیوند بسیار کارآمد است (Canan et al., 2006).

در طی اولین مرحله شکل‌گیری پیوند برخی از آنزیم‌ها نقش مهمی ایفا می‌کنند و مکانیسم ناسازگاری در برخی گونه‌ها به چند روش مورد بررسی قرار گرفته است (Pine and Errea, 2008). در سال‌های اخیر، از روش‌های متفاوتی همچون روش‌های درون شیشه‌ای (Espan et al., 2005; Errea et al., 2001)، مطالعات آناتومی (Melo et al., 2017)، آنالیز آیزوآنزیمی (Gulen et al., 2005)، آنالیز فنل‌ها (Musacchi et al., 2000; Arghavan, 2011) برای پیش‌بینی سریع ناسازگاری پیوند استفاده شده است. این تکنیک‌ها تشخیص زودهنگام ناسازگاری را تسهیل می‌کند و ممکن است یک مدل برای تحلیل دقیق‌تری از پدیده‌گیرایی پیوند را فراهم کند (Hudina et al., 2014).

مطالعات زیادی نقش فنل‌ها را در لیگنینی شدن نشان می‌دهد. برخی از این ترکیبات در مرحله اولیه رشد برای اتصال

پایه و پیوندک اهمیت دارند. سلول‌های دیواره آوند چوبی ساختاری پویا دارند که متشکل از پلی‌ساکارید، ترکیبات فنلی (مانند لیگنین)، مواد معدنی و پروتئین هستند (Herrero et al., 2014). Porika et al. (2016) نشان دادند که در شاخه‌های درختان سیب، گلابی، آلو، گیلاس، زردآلو و هلو فنول‌های متفاوتی وجود دارد که میزان آن به درجه رشد شاخه‌ها بستگی دارد. به‌علاوه وجود ترکیبات فنلی به‌عنوان نشانگر برای ارزیابی سازگاری پیوند گزارش شده است (Prabprea et al., 2018).

Rahmati et al. (2014) گزارش کردند میزان ترکیبات فنلی در بالا و پایین محل پیوند، به شکل معنی‌داری تفاوت داشت و با توجه به ارتباط معنی‌دار تجمع آربوتین در محل پیوند، می‌توان از این ترکیب برای انجام پیش غربالگری پیوندهای ناسازگار استفاده نمود. Hudina et al. (2014) گزارش کردند در فرآیند ناسازگاری پیوند در گلابی علاوه بر ترکیباتی نظیر کاتچین و پروسیانیدین بی‌۱، ترکیبات دیگری نظیر آربوتین نیز می‌تواند نقش داشته باشند.

Simon et al. (2008) در بررسی پیوندهای سازگار و ناسازگار در گیاه (*Upaca kirkiiana* L.) گزارش کردند که غلظت فنل کل در پیوندهای ناسازگار بالاتر از پیوندهای سازگار بود.

گزارش‌های بسیاری در مورد نقش پراکسیدازها در ممانعت از رشد وجود دارد (Guclu and Koyuncu, 2012) محققان گزارش کردند میزان پراکسیداز در پیوندهای ناسازگار بیشتر از پیوندهای سازگار است، که باعث لیگنینی شدن غیرنرمال در محل پیوند می‌شود (Melo et al., 2017). هدف از این پژوهش پیش‌بینی ناسازگاری پیوند گیلاس با استفاده از روش درون شیشه‌ای و مقایسه میزان فنل و پراکسیداز در پیوندهای سازگار و ناسازگار است.

مواد و روش‌ها

پایه‌هایی که برای این پژوهش در نظر گرفته شدند از باغ مادری مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی مشهد تهیه شدند. ریزپیوندی با استفاده از مرستم‌های نوک شاخه چهار رقم گیلاس شامل "عدلی"، "بینگ"، "سیاه مشهد" و "تکدانه" روی چهار پایه گیزلا-۶، گیزلا-۵، محلب (کلون پا کوتاه گزینش شده DM-168) و جی‌اف-۳۰۵ تحت شرایط استریل انجام شد. در این آزمایش پایه گیزلا-۶ شاهد سازگار و جی‌اف-۳۰۵ شاهد ناسازگار بود. جهت بررسی میزان فنل و پراکسیداز فاکتور (پیوند هر پایه روی خودش) به‌عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد.

آماده سازی ریز نمونه‌های پایه و پیوندک

قلمه‌هایی از نوک شاخساره درختان بالغ در اواخر دوره رشد تهیه شد. جوانه‌ها، به مدت ۱۰ دقیقه درون آب حاوی چند قطره

قطر ۵ میلی‌تر و به طول ۱۵ تا ۲۰ میلی‌متر رسیده بودند جهت تهیه پایه استفاده شد (شکل ۱).

جهت اندازه‌گیری ترکیبات فنل کل از معرف فولین سیکالتو به روش (Singleton et al., 1999) استفاده شد. برای تهیه عصاره به نمونه تازه از بافت گیاهی (محل پیوند) محلول متانول/آب (۷:۷) ۸۰:۲۰ اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بدون نور روی شیکر قرار داده شد. ۲۰ میکرولیتر از عصاره تهیه‌شده با آب مقطر مخلوط و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین به محلول اضافه شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. نتایج به صورت میلی‌گرم هم ارز گالیک اسید بر ۱۰۰ گرم وزن تازه محاسبه گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم از روش (Macadam et al., 1992) استفاده شد. در این روش به عصاره آنزیمی، محلول بافر فسفات سدیم، گایاکول و هیدروژن پراکسید اضافه گردید و بلافاصله تغییرات جذب نوری در طول موج ۴۳۶ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طی زمان ۳ دقیقه قرائت شد و در نهایت بر اساس ضریب خاموشی و بر حسب میکرومول بر دقیقه محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

محاسبات آماری داده‌های به دست آمده توسط نرم‌افزار SAS (نسخه ۹.۱) انجام شد و نمودار داده‌ها توسط نرم‌افزار Excel رسم گردید. میانگین تیمارها به روش آزمون ال‌اس‌دی (LSD) در سطح احتمال یک درصد مورد مقایسه قرار گرفتند.

مایع ظرفشویی قرار داده شده و ۲۰ دقیقه در زیر جریان آب روان قرار گرفتند. سپس درون محلول ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید آسکوربیک و ۱۵۰ میلی‌لیتر اسید سیتریک، به مدت ۱۰ دقیقه برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن بافت‌ها غوطه‌ور شدند. استریل سطحی توسط اتانول (الکل ۷۰٪) به مدت ۱ دقیقه و ضدعفونی کامل توسط هیپوکلریت سدیم (۱۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه) و در نهایت ریزنمونه‌ها توسط آب مقطر سه مرتبه شستشو شدند.

بعد از حذف فلس‌های برگ‌ها از جوانه‌ها ریزنمونه‌های مرستمی با ابعاد کمتر از ۰/۵ میلی‌متر زیر استریومیکروسکوپ مدل (Olympus, SZ6045TR, Japan, Tokyo, Optical Co. Ltd) جدا شده و درون محیط کشت MS تغییر یافته شامل عناصر ماکرو و میکرو، ویتامین‌ها، ۶ گرم در لیتر آگار برای جامد شدن محیط کشت، ۳۰ گرم ساکارز و تنظیم‌کننده رشد حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین (BAP) و ۱ میلی‌گرم در لیتر جیبرلین (GA) کشت شدند. نمونه‌های کاشته شده به اتاق رشد (با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۳۶ میکرو مول متر مربع بر ثانیه و دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد) منتقل شدند. بعد از سه هفته نوشاخه‌های جدید تولید شده به محیط کشت MS تغییر یافته حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، منتقل شدند و بعد از سه مرحله واگشت به عنوان پیوندک استفاده گردید. ریزنمونه پایه نیز بعد از استریل شدن درون محیط کشت MS تغییر یافته بدون تنظیم‌کننده رشد قرار گرفتند. بعد از فعال شدن جوانه (تقریباً بعد از گذشت ۳ هفته) جوانه‌های سالم و فعال شده جهت مرحله پرآوری به محیط کشت MS تغییر یافته حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشدی BAP منتقل شدند. بعد از سه مرحله واگشت، از نوشاخه‌های رشد کرده که به

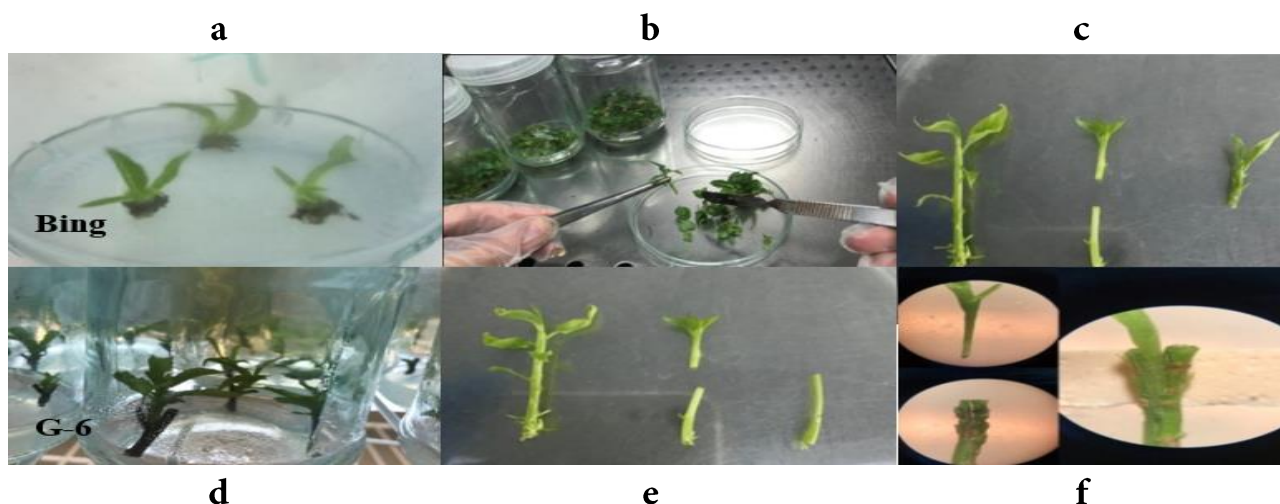


Figure 1. a, b: culture and proliferation Bing cultivar meristem. C: Preparation of scion for micro-grafting. d: culture and proliferation Gisela-6 rootstock. e: Preparation of rootstock for micro-grafting f: Perform Cleft grafting and placement in culture medium

نتایج و بحث

تجزیه واریانس اثر اصلی رقم و پایه و هم‌چنین اثرات متقابل آن‌ها بر درصد گیرایی پیوند، تعداد برگ پیوندک، رشد طولی پیوندک، تعداد ریشه و طول ریشه در جدول ۱ آمده است. بررسی نتایج حاصل از اثر رقم و پایه بر صفات ریزپیوندی نشان داد بین ترکیب پیوندی اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت.

نتایج مقایسه میانگین درصد گیرایی پیوند نشان داد بیشترین درصد گیرایی پیوند، رقم "بینگ" روی پایه گیزلا-۶ با میانگین ۶۴/۲۱ درصد و کمترین درصد گیرایی پیوند، رقم "بینگ" روی پایه جی‌اف-۳۰۵ با میانگین ۱/۱ درصد بود. پیوند هیچ‌کدام از رقم‌ها روی پایه جی‌اف-۳۰۵ (شاهد ناسازگار) موفقیت‌آمیز نبود (شکل ۲).

نتایج مقایسه میانگین صفات رویشی ریزپیوندی نشان داد بیشترین و کمترین تعداد برگ پیوندک، در رقم "بینگ" روی پایه گیزلا-۶ (شاهد سازگار) با میانگین ۶ برگ و رقم "عدلی" روی پایه جی‌اف-۳۰۵ (شاهد ناسازگار) با میانگین ۱ برگ بود.

بیشترین و کمترین رشد طولی پیوندک رقم "بینگ" روی پایه گیزلا-۶ با میانگین ۵/۶ سانتی‌متر و رقم "سیاه مشهد" روی پایه جی‌اف-۳۰۵ با میانگین ۱ سانتی‌متر بود.

بیشترین تعداد ریشه در پیوند، رقم "تکدانه" روی پایه گیزلا-۶ با میانگین ۸ ریشه و کمترین تعداد ریشه در پیوند رقم "بینگ" روی پایه جی‌اف-۳۰۵ با میانگین ۱/۳ بود. بیشترین طول ریشه در پیوند، رقم "بینگ" روی پایه گیزلا-۶ با میانگین ۵/۹ سانتی‌متر و کمترین طول ریشه در پیوند، رقم "بینگ" روی پایه جی‌اف-۳۰۵ با میانگین ۱/۳ سانتی‌متر بود (جدول ۲).

بعد از ۴۰ روز، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به منظور سازگاری به اتاق سازگاری منتقل گردیدند. در این مرحله گیاهچه‌های درون شیشه‌ای به گلدان‌های حاوی کوکوپیت و پرلیت با نسبت ۱:۱ منتقل و تحت شرایط رطوبت نسبی ۸۵ درصد، دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط نوری ۳۰۰۰ لوکس به مدت ۳۰ روز در اتاق سازگاری نگهداری شدند. از هفته دوم هوادهی و تغذیه گیاهچه‌ها آغاز شد (شکل ۳).

Table 1. The result of variance analysis of the effect rootstock and cultivar sweet cherry on indicators micro-grafting

Source of variation	df	Mean squares				
		Success rate of grafts	Number of leaves	Longitudinal growth of scion	Number of roots	Root length
Root stock (A)	3	7330.2**	22.1**	33.6**	73.4**	23.9**
Cultivar (B)	3	224.09**	5.18**	3.97**	3.28**	1.57**
B×A	9	1551.15**	6.11**	8.11**	15.99**	6.97**
Error	32	21.28	0.325	0.32	0.50	0.13
C.V. (%)	-	12.21	16.2	15	13.7	9.2

** Significant in 1% level.

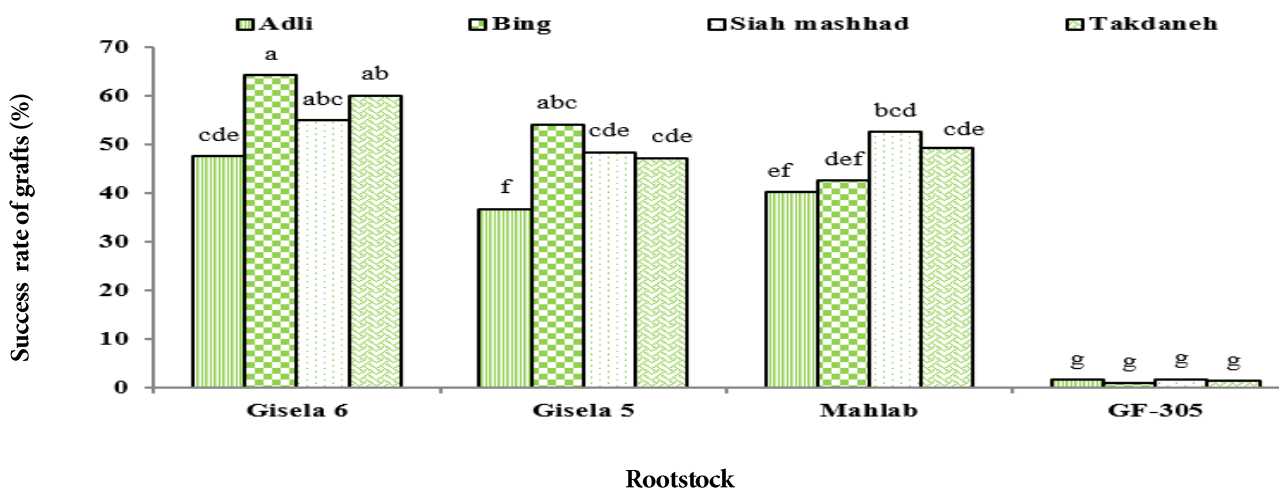


Figure 2. Interaction effects of cherry cultivars and rootstocks on the success rate of graft

Table 2. Means of the effect rootstock and cultivar sweet cherry on indicators micro-grafting

Rootstock	Cultivar	Number of leaves	Longitudinal growth of scion (cm)	Number of roots	Root length (cm)
Gisela-6	Adli	2.6de	3.2d	6cd	4.8bcd
	Bing	6a	5.6a	7.3abc	5.9a
	Siyahmashhad	4bc	4.9abc	7.6ab	5.2abc
	Takdaneh	5ab	5.4a	8a	5.5ab
Gisela-5	Adli	2.3de	4cd	4.3e	3.7ef
	Bing	4bc	4.4bcd	5.3de	4.5cd
	Siyahmashhad	2.6de	4.8abc	6.3bcd	3.5f
	Takdaneh	3.3cd	5abc	6.3bcd	4.6cd
Mahlab-168	Adli	4bc	3.2d	5.3de	4def
	Bing	4.6b	5.3de	7abc	4.9bc
	Siyahmashhad	5ab	5abc	6.3bcd	5.1abc
	Takdaneh	4bc	4cd	6cd	5.1abc
GF-305	Adli	1f	1.1e	1.6f	1.4g
	Bing	1.6ef	1.4e	1.3f	1.3g
	Siyahmashhad	1.7ef	1e	1.6f	1.8g
	Takdaneh	1.8ef	1.5e	1.6f	2g

In each column means followed by a common letters, are not significantly different at 5% of probability level with LSD test.



Figure 3. a: union graft Bing cultivar on Gisela-6 rootstock. b: no connection union graft Bing cultivar on GF-305 rootstock. c: adaptation seedling micro-grafting

نسبت به گیزلا-۵ و محلب-۱۶۸ از مقدار کمتری برخوردار بود (شکل ۵).

نتایج ضرایب همبستگی بین صفات درصد موفقیت پیوند، فنل کل و فعالیت پراکسیداز نشان داد که همبستگی منفی بین درصد موفقیت پیوند با فنل کل (-۰/۹۳۳) در سطح احتمال یک درصد وجود داشت، هم‌چنین، همبستگی منفی درصد موفقیت پیوند و میزان فعالیت پراکسیداز (-۰/۰۳۸) در سطح احتمال پنج درصد بود (جدول ۴).

پیش‌بینی امکان ناسازگاری بین پایه و پیوندک در درختان میوه در باغات ممکن است مدت‌ها به طول انجامد اما با استفاده از تکنیک ریزپیوندی در مدت زمان کوتاه‌تر می‌توان ناسازگاری پیوند را پیش‌بینی کرد.

در بررسی تکثیر درون شیشه‌ای گیزلا-۵ و گیزلا-۶ محیط MS بهترین محیط شناخته شده است. در این محیط جذب فسفر و نیتروژن توسط شاخساره‌ها بیشتر بوده است (Balapor et al., 2020).

نتایج تجزیه واریانس محتوای فنل کل و پراکسیداز در محل پیوند نشان داد بین ارقام و پایه‌ها و اثر متقابل آن‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (جدول ۳). بیشترین میزان فنل کل در محل پیوند، رقم "تکدانه" روی پایه جی‌اف-۳۰۵ (شاهد ناسازگار) با میانگین ۲۶۱/۹۶ میلی‌گرم بر گرم بود و کمترین میزان فنل کل در محل پیوند، رقم "تکدانه" روی پایه گیزلا-۵ با میانگین ۷۱/۷۳ میلی‌گرم بر گرم بود (شکل ۴).

نتایج مقایسه میانگین پراکسیداز نشان داد بیشترین میزان پراکسیداز در محل پیوند رقم "بینگ" روی پایه جی‌اف-۳۰۵ با میانگین ۰/۰۱۳ میکرومول بر دقیقه بود و کمترین میزان پراکسیداز در محل پیوند رقم "سیاه مشهد" و "بینگ" روی پایه گیزلا-۶ با میانگین ۰/۰۰۱۸ و ۰/۰۰۱۹ میکرومول بر دقیقه بود. به‌طور کلی بالاترین میزان پراکسیداز در محل پیوند ارقام روی پایه جی‌اف-۳۰۵ (شاهد ناسازگار) بود، هم‌چنین میزان پراکسیداز ارقام روی پایه گیزلا-۶ (شاهد سازگار)

Table 3. The result of variance analysis of the effect of rootstock and cultivar on the phenol and peroxidase activity

Source of variation	df	Mean squares	
		Phenol	Peroxidase
Root stock (A)	3	30527.05**	0.000047**
Cultivar (B)	4	27500.7**	0.000018**
B × A	12	14089.5**	0.000020**
Error	40	58.55	0.0000054
C.V. (%)	-	6.1	10.28

** Significant in 1% level.

Table 4. Correlation coefficients between the success rate of grafts with phenol content and peroxidase activity in sweet cherry micrografting

	Success rate of grafts	Phenol content	Peroxidase
Success rate of grafts	1	-	-
Phenol content	0.933**	1	-
Peroxidase	-0.038*	0.282*	1

* and **: significant at the 5 and 1% probability level, respectively.

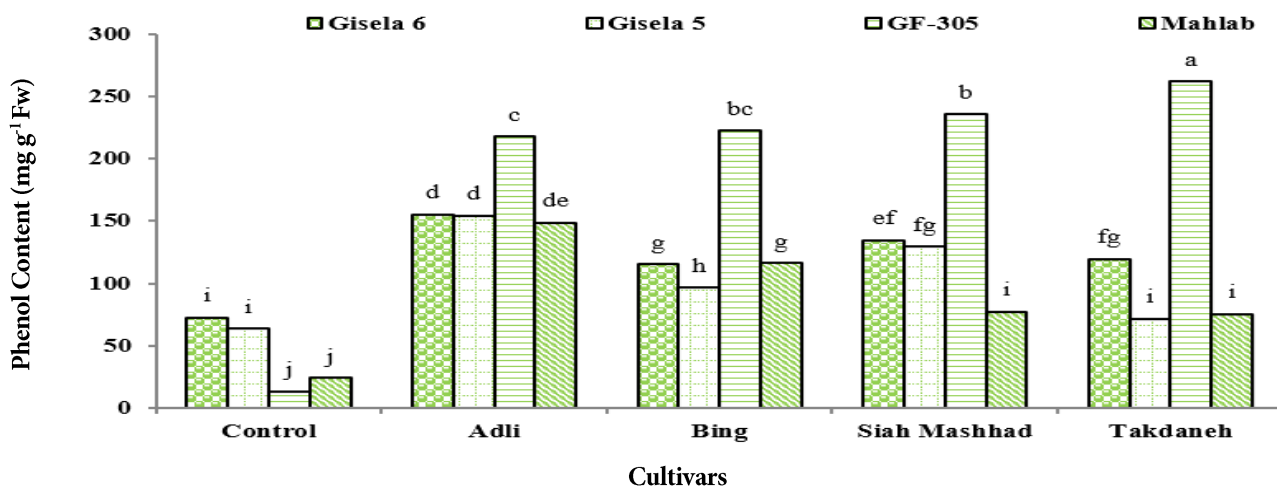


Figure 4. Interaction effects of sweet cherry cultivars and rootstocks on phenol content

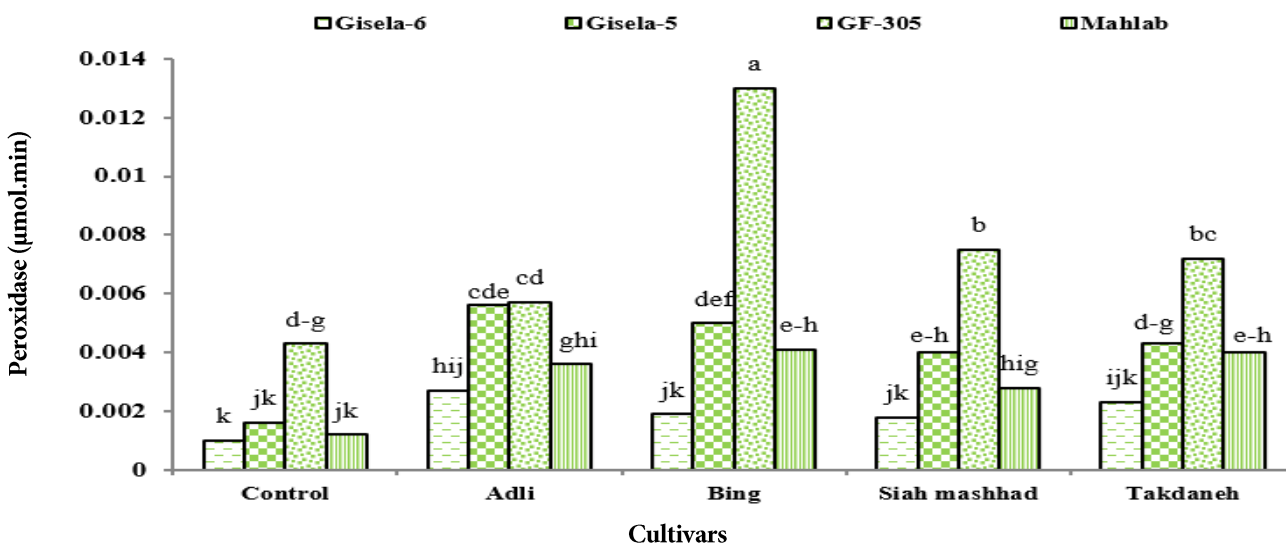


Figure 5. Interaction effects of sweet cherry cultivars and rootstocks on peroxidase activity

آنتی‌اکسیدانی است. از آنجایی که پیوند در گیاهان نیز به نوعی ایجاد تنش و استرس محسوب می‌شود در نتیجه در پیوندهای ناسازگار نسبت به پیوندهای سازگار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد تا میزان آسیب‌های اکسیداتیو را به حداقل برساند (Neuyen et al., 2003).

اگرچه مطالعات انجام شده روی ترکیبات فنلی نشان‌دهنده ارتباط این مواد با فرآیند ناسازگاری پیوند است، اما هنوز مکانیسم دقیق ناسازگاری پیوند برای پژوهشگران شناخته شده نیست (Irisarri et al., 2015).

به‌طوری کلی تجمع فنل و پراکسیداز در پایه سازگار گیزلا و محلب نسبت به پایه ناسازگار جی‌اف-۳۰۵ کمتر بود. افزایش تجمع فنل با درصد گیرایی پیوند رابطه معکوس داشت به‌طوری که رقم بینگ با بالاترین درصد گیرایی پیوند روی پایه گیزلا-۶ (شاهد سازگار) نسبت به شاهد ناسازگار میزان فنل پایین‌تری داشت. آنالیز ترکیبات فنلی به‌عنوان شاخصی در پیش‌بینی ناسازگاری پیوند در گزارش‌های زیادی اثبات شده است (Dogra et al., 2018).

طبق نتایج به‌دست آمد در این مطالعه، محتوای فنل کل به ترکیبات رقم و پایه بستگی دارد. میزان تجمع فنل کل در محل پیوند روی پایه جی‌اف-۳۰۵ (شاهد ناسازگار) با میانگین ۲۶۱/۹۶ میلی‌گرم گالیک اسید بر وزن تر بیشتر از فنل کل در محل پیوند روی پایه گیزلا-۶ (شاهد سازگار) با میانگین ۱۱۹/۴ میلی‌گرم گالیک اسید بر وزن تر بود که با نتایج (Simon et al., 2008; Errea et al., 2001) مبنی بر افزایش فنل کل در پیوندهای ناسازگار هم‌خوانی دارد. نتایج نشان داد که اختلاف کمی در محتوای فنل کل در ارقام پیوند شده روی پایه‌های گیزلا-۶، گیزلا-۵ و محلب-۱۶۸ وجود دارد که نشان می‌دهد این پایه‌ها سازگاری خوبی با ارقام گیلان دارند.

بالاترین میزان پراکسیداز در پیوند روی پایه جی‌اف-۳۰۵ (شاهد ناسازگار) بود و کمترین میزان پراکسیداز در پیوند روی پایه گیزلا-۶ (شاهد سازگار) بود تفاوت میزان پراکسیداز شاهد ناسازگار با شاهد سازگار نشان‌دهنده این است که میزان بالای پراکسیداز در پیوند باعث لیگنینی شدن غیرطبیعی و ناسازگاری در محل پیوند می‌شود. طبق گزارش (Melo et al., 2017) برای پیوند سازگار بین گیاهان و ایجاد پل آوندی در محل پیوند فعالیت آنزیم پراکسیداز پایه و پیوندک باید نزدیک به هم و شبیه باشد تا تجدید ساختار سلولی و آزاد سازی لیگنین رخ دهد.

سازگار بودن پایه‌های گیزلا با رنج گسترده‌ای از ارقام گیلان توسط (Long and Kaiser, 2010) گزارش شده است. مطالعات (Zamanipor, 2015; Nadaf et al., 2018) موفقیت ریز پیوندی ارقام "تکدانه"، "سیاه مشهد" و "بینگ" روی پایه گیزلا-۵ و گیزلا-۶ را گزارش کردند.

درگیر شدن آنزیم‌های خاصی در مراحل اولیه شکل‌گیری پیوند در گونه‌های مختلف مطالعه‌شده، هر چند نقش آن روی ناسازگاری به وضوح مشخص نشده است و نیاز به مطالعات بیشتری دارد (Pina and Errea, 2009).

پلی‌فنل‌ها از طریق لیگنینی شدن و رسوب ترکیبات پروتئینی نقش مهمی در شکل‌گیری پیوند ایفا می‌کنند. در طی بررسی نسبت بین تجمع ترکیبات فنولیک و ناسازگاری پیوند گیاه *Uapaca kirkiiana* L. گزارش شد که تجمع کوماریک اسید و فلاونوئیدها در بالای محل پیوند باعث تشکیل کالوس ضعیف و ایجاد ناسازگاری می‌شود. فنل‌ها رشد پایه یا پیوندک را سرکوب کردند این عارضه می‌تواند به زیادی بودن میزان فنل‌ها نسبت داده شود که از رشد کالوس‌ها جلوگیری می‌کند و سبب رشد نامنظم در پایه و پیوندک می‌شود. ضعیف شدن خط پیوند و انباشته شدن رسوبات فنلی در محل پیوند می‌تواند نشانه‌ای از ناسازگاری پیوند باشد (Simon et al., 2008).

بر طبق گزارش‌ها، ترکیبات فنولیک مانند کاتچین در بالای محل پیوند می‌تواند به‌عنوان نشانگر بیوشیمیایی در تشخیص ناسازگاری پیوند مورد استفاده قرار گیرد (Baron et al., 2019).

تحلیل‌های اولیه در مورد نقش پراکسیداز حاکی از آن است که این آنزیم در ساخته شدن مواد تشکیل‌دهنده دیواره سلولی دخالت داشته و در مرحله بعدی با ایجاد اتصال عرضی بین پلیمرهای فنلی دیواره سلولی، انعطاف‌پذیری دیواره سلولی را کاهش می‌دهد (Cassab & Varner, 1987).

موقعیت‌های استرس‌زا منجر به انباشته شدن فلاونول‌ها و تخریب به وسیله اکسیدازها می‌شود که می‌تواند روی رشد و متابولیسم گیاه تأثیر گذارد و از لیگنینی شدن بافت جلوگیری کند. هم‌چنین گیاهان اغلب در برابر استرس متابولیت‌های ثانویه متعددی تولید می‌کنند که می‌توان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مثل سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و پلی‌فنل‌ها را نام برد (Gilmour and Thomashow, 1991).

به این ترتیب می‌توان گفت که توانایی گیاه جهت افزایش مقاومت و تحمل هنگام هر نوع استرس، افزایش سریع ظرفیت

نتیجه‌گیری

در این مطالعه سعی شده است تا با استفاده از روش ریزپیوندی گیرایی پیوند ارقام گیلان "عدلی"، "بینگ"، "تکدانه" و "سیاه مشهد" روی پایه گیزلا-۵، گیزلا-۶، محلب-۱۶۸ و جی‌اف-۳۰۵ مشخص و میزان فنل کل و پراکسیداز در محل پیوند مقایسه شود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که بالاترین میزان فنل کل و پراکسیداز در محل پیوند، ارقام گیلان روی پایه ناسازگار جی‌اف-۳۰۵

نسبت به پایه گیزلا-۶ بیشتر بود. بنابراین به نظر می‌رسد می‌توان از سنجش ترکیبات فنلی و پراکسیداز برای انجام پیش غربالگری پیوندهای ناسازگار استفاده نمود.

سپاس‌گزاری

نگارندگان از مدیریت مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی و ایستگاه تحقیقات کشاورزی گل‌مکان که امکانات لازم برای اجرای این پژوهش را فراهم آوردند، تشکر و سپاس‌گزاری می‌کنند.

References

- Arghavan, S., Ganji moghaddam, E., & Fahadan, A. (2011). *Study of possibility early detection of graft incompatibility in some commercial plum cultivars by phenolic compounds analyses*. M.Sc. thesis of Horticulture, Pomology, Islamic Azad University of Shirvan, Shirvan. [InFarsi]
- Balapor, Z., Hosseini Moghaddam, H., Zarei, M., & Mollashahi, M. (2020). Micro propagation of penta rootstock (*Prunus domestica* L.) in the two culture media (MS and B5). *Plant Productions*, 42(4), 443-454. [In Farsi]
- Baron, D., Amaro, A., Pina, A., & Ferreira, G. (2019). An overview of grafting re-establishment in woody fruit species. *Scientia Horticulturae*, 243, 84-91.
- Canan, C., Ozalsan, M., Toremeh, H., Sarpkaya, K., & Iskender, E. (2006). *In vitro* micrografting of pistachio, *Pistacia vera* L. Var. siirt, on wild pistachio rootstocks. *Journal Cell and Molecular Biology*, 5, 25-31.
- Cassab, G. I., & Varner, J. E. (1987). Immunity localization of extension in developing soybean seed coats by immune gold silver staining and by tissue printing on nitrocellulose paper. *Journal of Cell Biotechnology*, 105(6-1), 2581-2588.
- Dogra, K., Kour, K., Kumar, R., Bakshi, P., & Kumar, V. (2018). Graft incompatibility in horticultural crop. *Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 7(2), 1805-1820.
- Errea, P., Garay, L., & Marin, J. A. (2001). Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.) using in vitro techniques. *Journal of Physiologia Plantarum*, 112(1), 135-141.
- Espen, L., Cocucci, M., & Sacchi, G. A. (2005). Differentiation and functional connection of vascular elements in compatible and incompatible pear/quince internode micrografts. *Tree Physiology*, 25(11), 1419-1425.
- Ganji moghaddam, A., & Bouzari, N. (2017). *Scientific and practical guide to cherries (planting, holding and harvesting)*. Tehran: Agricultural Education and Extension Publications. [In Farsi]
- Ganji Moghaddam, A., & Gonabadi, A. (2017). *Guide to the bases of fruit trees*. Tehran: Agricultural education and promotion. [In Farsi]
- Gilmour, S. J., & Thomashow, M. F. (1991). Cold acclimation and cold regulated gene expression in ABA mutants of (*Arabidopsis thaliana* L.). *Plant Molecular Biology*, 17(6), 1233-1240.
- Guclu, S., & Koyuncu, F. (2012). A method for prediction of graft incompatibility in sweet cherry. *Notulae Botanicae Horticulturae Agrobotanic*, 40(1), 243-246.
- Gulen, H., Kuden, A., Postman, J., & Arora, R. (2005). Total protein content and SDS-PAGE in pear scions grafted on quince and pear seedling rootstocks. *Turkish Journal of Agriculture*, 29(1), 91-96.

- Herrero, J., Carrasco, A. E., & Zapata, J. M. (2014). Arabidopsis thaliana peroxidase involved in lignin biosynthesis, in silico promoter analysis and hormonal regulation. *Plant physiology Biochemical*, 80, 192-202.
- Hudina, M., Orazem, P., Jakopic, J., & Stampar, F. (2014). The phenolic content and its involvement in the graft incompatibility process of various pear rootstocks (*Pyrus communis* L.). *Journal of Plant Physiology*, 171(5), 76-84.
- Irisarri, P., Binczycki, P., Errea, P., Martens, H. J., & Pina, A. (2015). Oxidative stress associated with rootstock scion interactions in pear/quince combinations during early stages of graft development. *Journal of Plant Physiology*, 176, 25-35.
- Isikalan, C., Namli, S., Akbas, F., & Erol, A. (2011). *In vitro* Micropropagation of almond (*Amygdalus communis*. Cv. Nonpariel). *Australian Journal of Crop Science*, 5, 61-65.
- Long, L. E., & Kaiser, C. (2010). Sweet cherry rootstocks. In Crane, E. (Ed). *A Pacific northwest extension publication* (pp: 10-17). Corvallis, Oregon: Oregon State University.
- Macadam, J. W., Nelson, C. J., & Sharp, R. E. (1992). Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. *Journal of Plant Physiology*, 99(3), 294-878.
- Melo, E. T., Pio, R., & Balbi, R. V. (2017). Anatomic compatibility of pear and quince trees grafted on *pyrus calleryana* L. & *Chaenomeles sinensis* L. rootstocks. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 52(10), 877-886.
- Mohamadzade, N., & Hamidi, H. (2016). Investigation of the effects of culture medium, disinfection and hormonal treatments on micro environment (*Mallus domestica* L. Borkh.). *Plant Productions*, 5(1), 41-54. [In Farsi]
- Musacchi, S., Masia, A., & Fachinello, J. (2000). Variation of some enzymatic activities in relationship to scion/stock compatibility in pear/quince combinations. *Acta Horticulture*, 596, 389-392
- Nadaf, M. I. (2018). *Optimization of micro-grafting conditions of terminal meristems of several cherry cultivars on Gisela-6 growing base in vitro conditions*. Ph.D. thesis of Horticulture, Physiology and Plant breeding, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. [In Farsi]
- Neuyen, T. B., Ketsa, S., & Doorn, W. (2003). Relationship between and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia-lyase in banana peel during low temperature storage. *Postharvest Biology and Technology*, 30, 187-193.
- Pina, A., & Errea, P. (2008). Influence of graft incompatibility on gene expression and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase. *Journal of Plant Science*, 174, 502-509.
- Pina, A., & Errea, P. (2009). Morphological and histochemical features of compatible and incompatible stem union. *Acta Horticulture*, 814, 453-456.
- Porika, H. K., Nimbolkar, B., Rajashekar, B., & Hussain, S. (2016). Graft compatibility- incompatibility in fruit crops, mechanism and determination technique. *Asian Journal of Horticulture*, 2(1), 252-260.
- Prabpreea, A., Sangsil, P., Nualsri, C., & Nakkanong, K. (2018). Expression profile of phenylalanine Ammonia- Lyase (PAL) and phenolic content during early stages of graft development in bud grafted *Hevea brasiliensis*. *Biocatal. Agric Journal of Biotechnol*, 14, 88-95.
- Rahmati, M., Arzani, K., Yadollahi, A., & Abdollahi, H. (2014). *Investigation of the pattern of accumulation of phenolic and flavonoid materials above and below the graft site in some European and Asian pear cultivars (Pyrus communis L.) on several different rootstocks*. 9th Congress of Horticultural Sciences. Ahvaz. [In Farsi]
- Simon, A., Mngomba, E., Toitfestus, S., & Akinnifesi, K. (2008). The relationship between graft incompatibility and phenols in (*Uapaca kirkiana* L.) Muell Arg. *Scientia Horticulturae*, 117(3), 212-218.

- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299, 152-178.
- Zamanipor, M. (2015). *The effect of plant growth regulators explants size and media culture on the multiplication of seven cultivars of sweet cherry and investigation of possibility of their micro grafting in vitro*. Ph.D. thesis of Horticulture, Physiology and Plant breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad. [In Farsi]