مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۱۷ شماره ۲ صفحه‌های ۱۳۵ تا ۱۴۶ (۱۳۹۵)

بررسی رشد، جذب عنصرهای معدنی و فتوسنتز پایه GF677 (دورگه هلو و بادام) در پاسخ به منبع آهن در شرایط درون شیشه‌ای[1]

Study of Growth, Mineral Uptake and Photosynthesis of GF677 (Peach and Almond Hybrid) Rootstock in Response to Iron Source under *In Vitro* Conditions

محمد اسماعیل امیری* و فریبرز حبیبی[2]

چکیده

اثر آهن آلی (Fe-EDTA) و آهن معدنی ($FeCl_3$) بر رشد، جذب عنصرهای معدنی و ویژگی‌های فتوسنتزی پایه GF677 (*Prunus persica* × *P. amygdalus*) در شرایط درون شیشه‌ای بررسی شد. گیاهچه‌های پایه GF677 به محیط کشت پرآوری جامد موراشیگ و اسکوگ (MS) تغییر یافته، شامل ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل-آدنین (BA) و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید (NAA) با غلظت‌های صفر، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌مولار Fe-EDTA و $FeCl_3$ واکشت شدند. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با پنج تکرار به مدت هشت هفته انجام شد. نتیجه‌ها نشان داد، تیمارهای ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌مولار Fe-EDTA و ۰/۲ میلی‌مولار $FeCl_3$ اثر معنی‌داری بر ویژگی‌های اندازه‌گیری شده داشتند. بیشترین وزن تر، وزن خشک، سرعت پرآوری، ارتفاع شاخساره، شاخص کلروفیل برگ، سرعت فتوسنتز و هدایت روزنه‌ای گیاهچه‌ها در تیمار ۰/۲ میلی‌مولار Fe-EDTA مشاهده شد، در حالی که تیمار شاهد (بدون آهن) و تیمار ۰/۰۵ میلی‌مولار $FeCl_3$، بیشترین کم‌سبزینگی برگی و کمترین سرعت رشد، شاخص کلروفیل برگ، سرعت فتوسنتز و هدایت روزنه‌ای گیاهچه‌ها را داشتند. هر دو منبع آهن سبب افزایش جذب آهن توسط گیاهچه‌ها شد ولی غلظت ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌مولار Fe-EDTA اثر معنی‌داری در مقایسه با $FeCl_3$ بر جذب آهن داشت. تیمار $FeCl_3$ سبب کاهش جذب فسفر، روی و منگنز توسط گیاهچه‌ها شد. با افزایش غلظت Fe-EDTA در محیط کشت، جذب منگنز افزایش و جذب فسفر و روی کاهش یافت. طبق نتیجه‌های به‌دست آمده می‌توان بیان کرد، جایگزینی آهن آلی Fe-EDTA با آهن معدنی $FeCl_3$ در کشت درون شیشه‌ای پایه GF677 سبب بهبود واکنش رشدی و ویژگی‌های فتوسنتزی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پرآوری، فتوسنتز، کلروفیل، کم‌سبزینگی، هدایت روزنه‌ای.

مقدمه

پایه GF677، دورگه طبیعی هلو (*Prunus persica* L.) و بادام (*P. amygdalus* Batsch) است که به طور گسترده در دنیا استفاده می‌شود. از ویژگی‌های این پایه مقاومت به خاک‌های آهکی، رطوبت زیاد خاک، بیماری-های لکه آجری، لکه سیاه، فوزیکوکوم و بیماری ویروسی آبله‌ای و تحمل به کمبود آهن می‌باشد (۴). افزایش این پایه به صورت غیرجنسی است و با توجه به سخت ریشه‌زا بودن قلمه‌ها، سیستم ریزازدیادی می‌تواند به عنوان یک روش موفقیت‌آمیز برای افزایش این پایه استفاده شود (۳). کشت درون شیشه‌ای GF677 توسط کستر (۱۳)، دیماسی (۷) و تاباکنیک و همکاران (۲۳) انجام شده است، اما با این حال دیماسی (۷) خاطر نشان کرد که افزایش و رشد گیاهان درون شیشه‌ای از روش اصلاح ترکیب‌های محیط کشت می‌تواند بهبود یابد. در این میان انتخاب

۱- تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۴

۲- به ترتیب استاد و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (m-amiri@znu.ac.ir)

ترکیب‌های آلی و معدنی محیط کشت بیشتر جهت موفقیت در روش‌های گفته شده اهمیت بسیاری پیدا می‌کند. شناخت ارتباط بین محیط کشت و ریزنمونه در مرحله‌های مختلف دوره رشد ضروری می‌باشد، زیرا در جذب، انتقال، توزیع و تجمع عنصرهای معدنی در قسمت‌های مختلف مربوط به ریزنمونه نقش اساسی دارند (۹). بیشتر ترکیب‌های غذایی که موجب رشد بافت و یاخته‌های گیاهی در کشت درون شیشه‌ای شده‌اند، از روش تجربی شناخته شده‌اند (آزمون و خطا). سرعت رشد به وسیله اندازه‌گیری رشد بافت‌ها و یاخته‌های گیاهی (به طور معمول به عنوان مقدار افزایش وزن تر یا خشک) در یک دوره زمانی معین ارزیابی می‌شود (۱۴). باید گفت در جایی که کیفیت رشد مد نظر است و رشد مطلوب (بالا بودن توان رشد طولی، شاخه‌زایی، شدت سبزینگی و ...) اهمیت بالایی دارد، وزن تر و خشک معیار مناسبی نیست و فقط نشان دهنده مقدار جذب است. وقتی یک روش کشت بافت برای یک گونه خاص توسعه می‌یابد، بیشتر آزمایش‌ها فقط روی مقایسه ترکیب‌های عنصرهای غذایی و تفاوت در حلال‌های این ترکیب‌ها صورت می‌پذیرد (۱۰).

روش کشت بافت جهت مطالعه‌های تغذیه‌ای، زیست‌شیمیایی و فیزیولوژیکی، کنترل بیشتری نسبت به شرایط بیرون دارد و تعداد زیادی نژادگان می‌توانند در یک فضای محدود ارزیابی شوند. در شرایط مزرعه، گیاهان در شرایط آب و هوایی متغیری هستند که انجام پژوهش‌ها را دشوار می‌سازد. روش کشت بافت بر این محدودیت‌ها غلبه می‌کند و اجازه رشد گیاه در شرایط تغذیه‌ای و آب و هوایی کنترل شده را می‌دهد و انجام آزمایش‌ها در شرایط یکسان در تمام طول سال را امکان پذیر می‌نماید (۲).

وضعیت تغذیه‌ای گیاه در شرایط درون شیشه‌ای به شدت بر رشد و نمو گیاه اثر می‌گذارد. گونه‌های گیاهی مختلف که در شرایط یکسانی رشد می‌کنند در استفاده از عنصرهای معدنی متفاوت می‌باشند (۱۴). آهن با توجه به نقشی که در ساخت DNA، تقسیم یاخته‌ای و تشکیل کلروفیل دارد، مهم‌ترین عنصر کم‌مصرف و یک عنصر بسیار مهم در رشد و نمو محسوب می‌شود (۱۶). در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) (۱۷) که به عنوان یک محیط مناسب برای کشت پایه GF677 معرفی شده است، نزدیک به نیمی از آهن موجود در محیط کشت به شکل فسفات آهن رسوب می‌کند (۶)، با این حال، غلظت فسفات محلول به اندازه کافی زیاد است و به همین دلیل نمونه‌ها از این رسوب‌گذاری اثر نمی‌گیرند (۲۱). در بررسی انجام شده روی گیاهچه‌های گلابی و بِه، اهمیت حضور، مقدار و نوع منبع تأمین کننده آهن در شرایط درون شیشه‌ای ثابت شده است (۸). در مطالعه‌ای، واکنش پایه گلابی OH×F333 به منبع‌های آهن آلی و معدنی بررسی و نشان داده شد که بیشترین طول ساقه در پاسخ به کاربرد غلظت ۰/۲ میلی‌مولار آهن معدنی حاصل شد، در حالی که بیشترین وزن تر و پرآوری شاخه مربوط به غلظت ۰/۴ میلی‌مولار آهن آلی در محیط کشت بود (۲۲). اثر آهن در کشت درون شیشه‌ای هندوانه سه‌گان (۲۴)، بادام و نارنج (*Citrus aurantium* L.) (۲۱) و پایه گلابی OH×F333 (۲۲) نیز بررسی شده است.

پایه GF677 در سراسر جهان به عنوان یک پایه مقاوم به خشکی معروف است. با توجه به استفاده وسیع آن، افزایش انبوه این پایه از روش کشت بافت و بهینه‌سازی ریزافزایی این پایه اهمیت زیادی دارد. بنابراین، هدف از انجام این پژوهش، بررسی اثر غلظت‌های مختلف آهن آلی و معدنی بر رشد، جذب عنصرهای معدنی و ویژگی‌های فتوسنتزی گیاهچه‌های GF677 در شرایط درون شیشه‌ای بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه زنجان در سال ۱۳۹۰ انجام شد. در این آزمایش گیاهچه‌های GF677 (ریزنمونه‌های رشد یافته از جوانه‌های شاخه یک‌ساله) در محیط کشت MS با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین (BAP) به مدت چهار هفته در شرایط درون شیشه‌ای در محیط کشت MS کامل، رشد کردند، در زیر هود لامینار از هم جدا شدند و گیاهچه‌های با طول ۱/۵ سانتی‌متر

در محیط کشت تیمارها واکشت شدند. محیط کشت تیمارها عبارت بود از: محیط کشت MS، با غلظت‌های صفر (شاهد)، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌مولار در لیتر آهن آلی (Fe-EDTA) و آهن معدنی ($FeCl_3$)، همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین (BA) و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید (NAA) که در پنج تکرار (ظرف کشت) و در هر ظرف کشت سه ریزنمونه یکنواخت (به اندازه ۱/۵ سانتی‌متر) به مدت هشت هفته واکشت شدند. ظرف‌های کشت (تکرارها) در این آزمایش ظرف‌های شیشه‌ای با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر بود که در هر کدام ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت ریخته شد. قبل از اعمال تیمار، pH محیط تیمار قبل از اتوکلاو روی ۵/۷ تنظیم و ۰/۷٪ آگار به محیط کشت اضافه و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. پس از کشت، ریزنمونه‌ها به اتاقک رشد با دمای ۲±۲۳ درجه سلسیوس و شدت نور ۲۵۰۰ تا ۳۰۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند.

در پایان دوره آزمایش (هفته هشتم)، طول شاخساره توسط خط‌کش (با دقت ۰/۱) بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. سرعت پرآوری نیز از شمارش تعداد شاخساره‌های تولید شده در هفته هشتم به دست آمد. برای اندازه‌گیری وزن تر، گیاهچه‌ها از ظرف‌های کشت خارج و به منظور حذف محیط کشت MS از انتهای گیاهچه‌ها، با آب مقطر شسته شدند. سپس وزن تر گیاهچه‌ها با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، گیاهچه‌ها درون پاکت کاغذی گذاشته شدند و در خشک‌کن با دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند، سپس از خشک‌کن خارج شدند و با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد. شاخص کلروفیل برگ با دستگاه کلروفیل‌متر (SPAD مدل Konica Minolta 502, Japan) اندازه‌گیری و عدد حاصل از میانگین پنج خوانده، ثبت شد. سرعت فتوسنتز و هدایت روزنه‌ای با دستگاه فتوسنتزمتر (مدل LCI-ADC.CO.UK, England) اندازه‌گیری شد. در میانه دوره روشنایی اتاقک رشد (ساعت هشتم) ویژگی‌های گفته شده اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری عنصرهای معدنی، ۰/۳ گرم از گیاهچه‌های خشک شده در خشک‌کن به روش هضم مرطوب با سولفوریک اسید–سالیسیلیک اسید و پراکسید هیدروژن عصاره‌گیری شد (۱). بعد از عصاره‌گیری، فسفر (P) با روش رنگ سنجی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Cecil.Series 2, England) و آهن (Fe)، روی (Zn) و منگنز (Mn) توسط دستگاه جذب اتمی (Varian-Specter AA 20, Australia) اندازه‌گیری شدند (۱).

داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار آماری MSTAT-C واکاوی، مقایسه میانگین‌ها به کمک آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام و نمودارها توسط نرم افزار Excel 2007 رسم شدند.

نتایج و بحث

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، با گذشت هشت هفته کشت، مقدار وزن تر و خشک گیاهچه‌های GF677 افزایش پیدا کرد. اثر غلظت‌های مختلف Fe-EDTA و $FeCl_3$ نشان داد که بیشترین افزایش وزن تر و خشک در تیمار ۰/۲ میلی‌مولار Fe-EDTA بود، در حالی که کمترین مقدار وزن تر و خشک در تیمارهای شاهد، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌مولار $FeCl_3$ بود. در کل، واکنش پایه GF677 به جایگزینی آهن معدنی با آهن آلی در محیط کشت، افزایش به صورت وزن تر و خشک بود. همان‌طور که مشاهده می‌شود غلظت‌های Fe-EDTA اثر بیشتری از $FeCl_3$ داشت (شکل ۱). این نتیجه در کشت گلابی و بِه نیز گزارش شده است (۸، ۹). نتیجه‌های حاصل منطبق بر یافته‌های پژوهشگرها بود که گزارش کردند با افزایش غلظت آهن در محیط کشت MS به مقدار ۰/۲ میلی‌مولار نسبت به محیط کشت استاندارد، وزن تر و خشک گیاهچه‌های هندوانه سه‌گان به مقدار ۲۵٪ افزایش یافت (۲۴). همچنین افزایش غلظت آهن در محیط کشت MS وزن تر و خشک گیاهچه‌های پایه گلابی OH×F333 در شرایط درون شیشه‌ای را افزایش داد (۲۲). از طرفی نتیجه‌های آن‌ها نیز افزایش بیشتر وزن تر و خشک گیاهچه پس از استفاده از آهن منبع آلی در محیط کشت نسبت به آهن منبع معدنی را نشان داد، که می‌تواند به علت پایداری

بیشتر منبع آلی در محیط کشت نسبت به منبع معدنی باشد (۱۸). همچنین دلیل افزایش وزن تر و خشک در تیمار Fe-EDTA این است که این ترکیب آلی اجازه می‌دهد که آهن به صورت آرام و پیوسته در محیط کشت آزاد شود، در حالی‌که $FeCl_3$ در محیط کشت به سرعت رسوب می‌کند (۲۱). این نتیجه‌ها به وسیله گزارش‌هایی که بر رسوب آهن در محیط کشت MS دلالت دارد، تأیید می‌شود (۶، ۱۱، ۱۲، ۱۸).

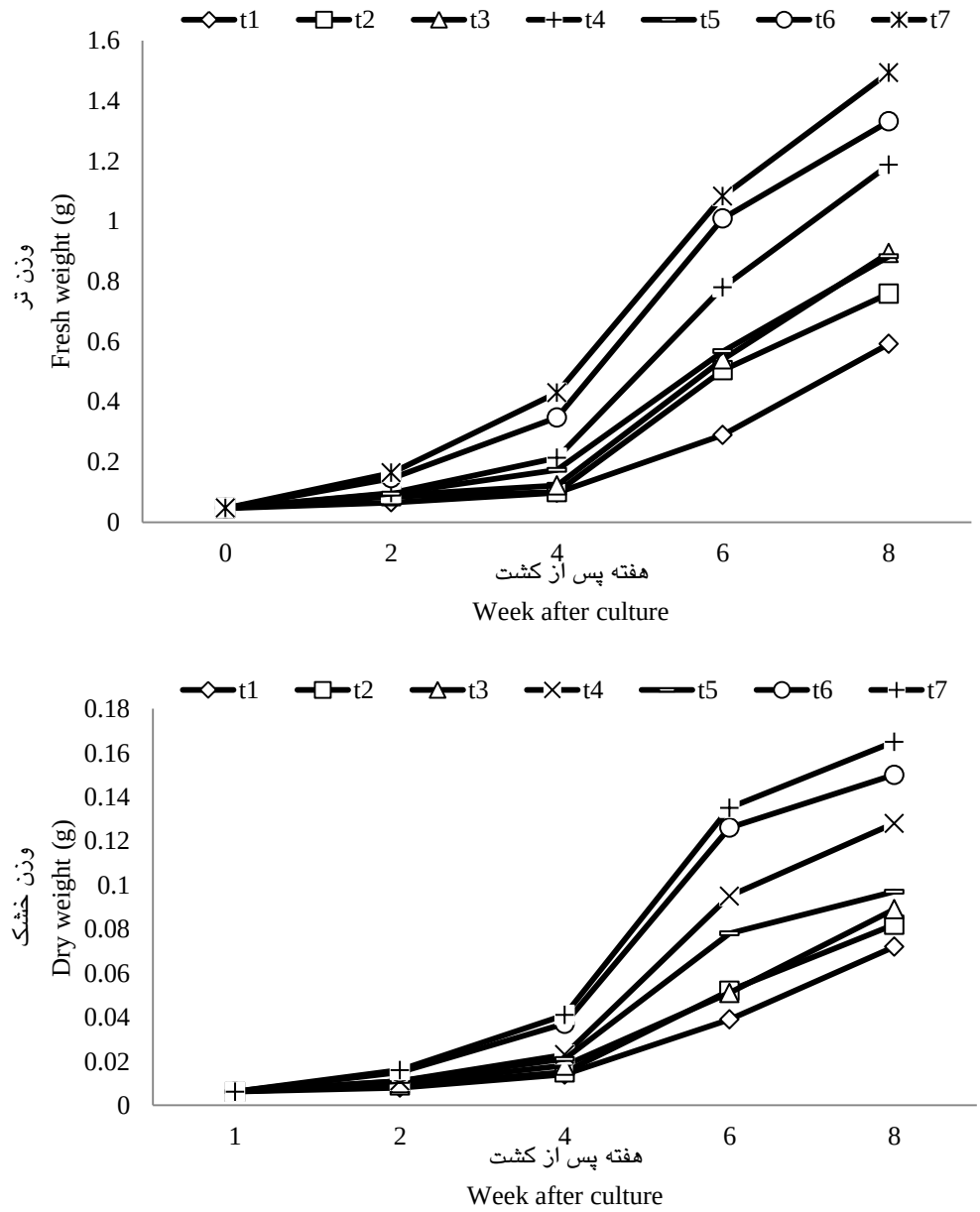

Fig. 1. Influence of different concentrations of organic iron (Fe-EDTA) and inorganic iron ($FeCl_3$) on fresh weight and dry weight of GF677 plantlet during eight weeks culture under *in vitro* conditions [T1: Fe free medium (control), T2: 0.05 mM $FeCl_3$ T3: 0.1 mM $FeCl_3$, T4: 0.2 mM $FeCl_3$, T5: 0.05 mM Fe-EDTA, T6: 0.1 mM Fe-EDTA, T7: 0.2 mM Fe-EDTA].

شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف آهن آلی (Fe-EDTA) و آهن معدنی ($FeCl_3$) بر وزن تر و وزن خشک گیاهچه‌های GF677 طی هشت هفته کشت در شرایط درون شیشه‌ای [T1: محیط کشت بدون آهن (شاهد)، T2: ۰/۰۵ میلی‌مولار $FeCl_3$، T3: ۰/۱ میلی‌مولار $FeCl_3$، T4: ۰/۲ میلی‌مولار $FeCl_3$، T5: ۰/۰۵ میلی‌مولار Fe-EDTA، T6: ۰/۱ میلی‌مولار Fe-EDTA، T7: ۰/۲ میلی‌مولار Fe-EDTA].

بیشترین سرعت پرآوری (۵/۹ شاخه در گیاه) در تیمار ۰/۲ میلی‌مولار Fe-EDTA به‌دست آمد، در حالی‌که کمترین سرعت پرآوری با ۱/۸۶ شاخه در تیمار شاهد (بدون آهن) مشاهده شد (شکل ۲). بین تیمار ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌مولار Fe-EDTA اختلاف معنی‌داری از نظر سرعت پرآوری مشاهده نشد. در این تیمار ۴/۶۶ شاخه تولید شد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، $FeCl_3$ نقش کمتری در افزایش سرعت پرآوری داشت؛ به‌طوری که بین غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌مولار $FeCl_3$ اختلاف معنی‌داری در سرعت پرآوری مشاهده نشد. در این تیمارها سرعت پرآوری به ترتیب ۲/۸۶، ۲/۷۶ و ۳/۵۳ (شاخه در گیاه) بود (شکل ۲).

در شکل‌های ۳ و ۵ مشاهده می‌شود، بیشترین ارتفاع شاخساره (با ۳/۲۲ سانتی‌متر) در تیمار ۰/۲ میلی‌مولار $FeCl_3$ مشاهده شد. تیمارهای ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌مولار Fe-EDTA اختلاف معنی‌داری با تیمار ۰/۲ میلی‌مولار $FeCl_3$ نداشتند (شکل ۳). در این غلظت‌ها ارتفاع شاخساره به ترتیب، ۲/۹۲ و ۲/۸۶ سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. کمترین ارتفاع شاخساره با ۱/۱۶ سانتی‌متر در تیمار شاهد به‌دست آمد و مشاهده می‌شود با کاهش غلظت آهن آلی و معدنی از ارتفاع شاخساره کم شد؛ به‌طوری که بین تیمارهای ۰/۰۵ میلی‌مولار Fe-EDTA، $FeCl_3$ و شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۳). همسو با نتیجه‌های گفته شده، قرار دادن پایه‌های مرکبات در شرایط کمبود آهن یا بدون آهن منجر به کاهش ارتفاع گیاهچه‌ها و نمو کمتر برگ‌ها شد (۱۹). همچنین پژوهشگرها گزارش کردند بلند شدن ساقه گیاهچه در اثر نژادگان است و کمبود آهن بر بلند شدن گیاهچه‌های نژادگان‌های مختلف در شرایط درون شیشه‌ای اثر دارد (۹، ۲۰). می‌توان بیان کرد یکی از اثرهای اصلی کمبود آهن کاهش تولید شاخه‌ها و برگ‌های جدید می‌باشد که به علت نقش آهن در ساخت DNA و تقسیم یاخته‌ای اتفاق می‌افتد (۲۱). همچنین با توجه به اینکه نزدیک به نیمی از آهن موجود در محیط کشت MS به شکل فسفات آهن رسوب می‌کند، کمبود آهن می‌تواند به عاملی محدود کننده برای رشد گیاهچه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای تبدیل شود (۶).

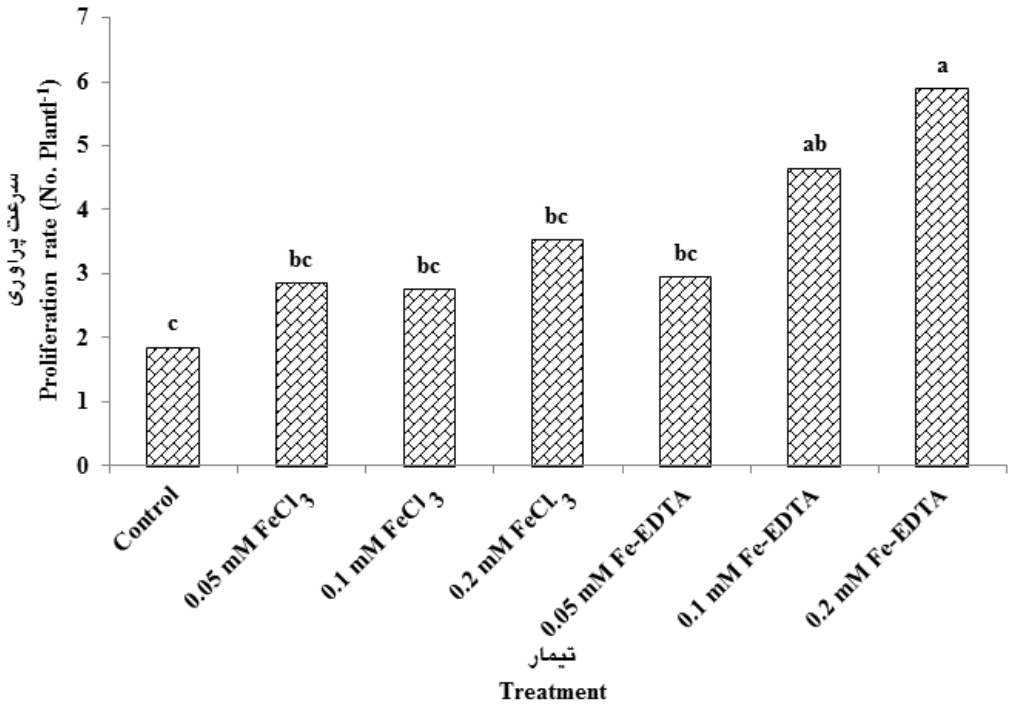

Fig. 2. Influence of different concentrations of organic iron (Fe-EDTA) and inorganic iron ($FeCl_3$) on proliferation rate of GF677 plantlets.

شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف آهن آلی (Fe-EDTA) و آهن معدنی ($FeCl_3$) بر سرعت پرآوری گیاهچه‌های GF677.

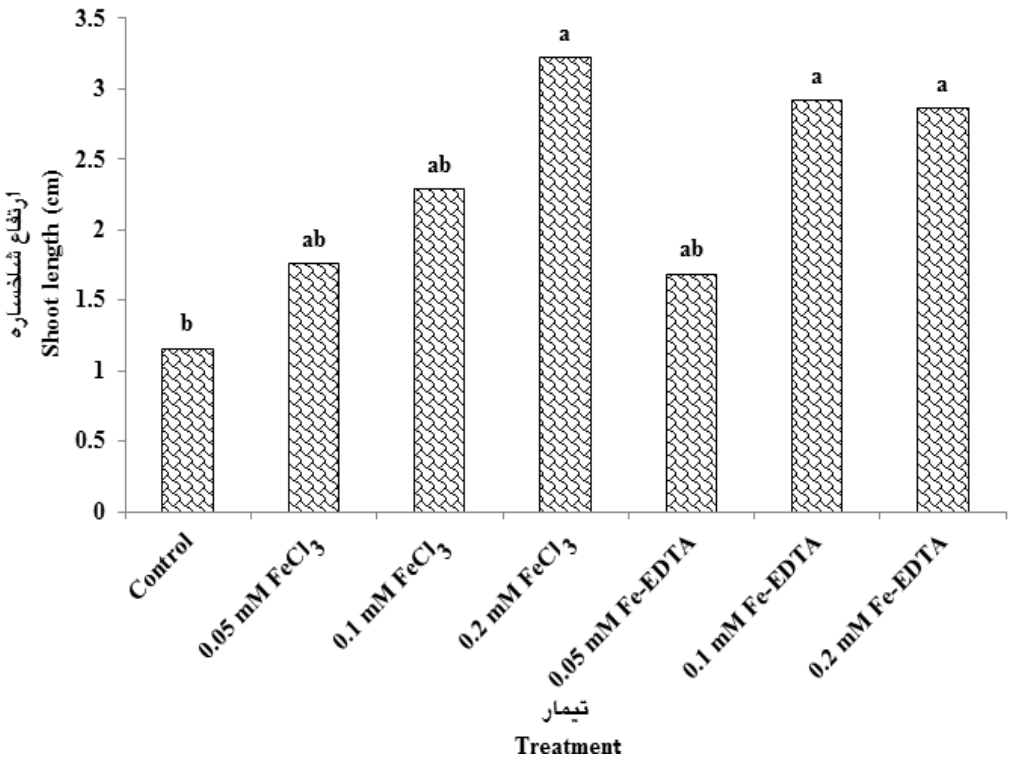

Fig. 3. Influence of different concentrations of organic iron (Fe-EDTA) and inorganic iron ($FeCl_3$) on shoot length of GF677 plantlets.

شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف آهن آلی (Fe-EDTA) و آهن معدنی ($FeCl_3$) بر ارتفاع شاخساره گیاهچه‌های GF677.

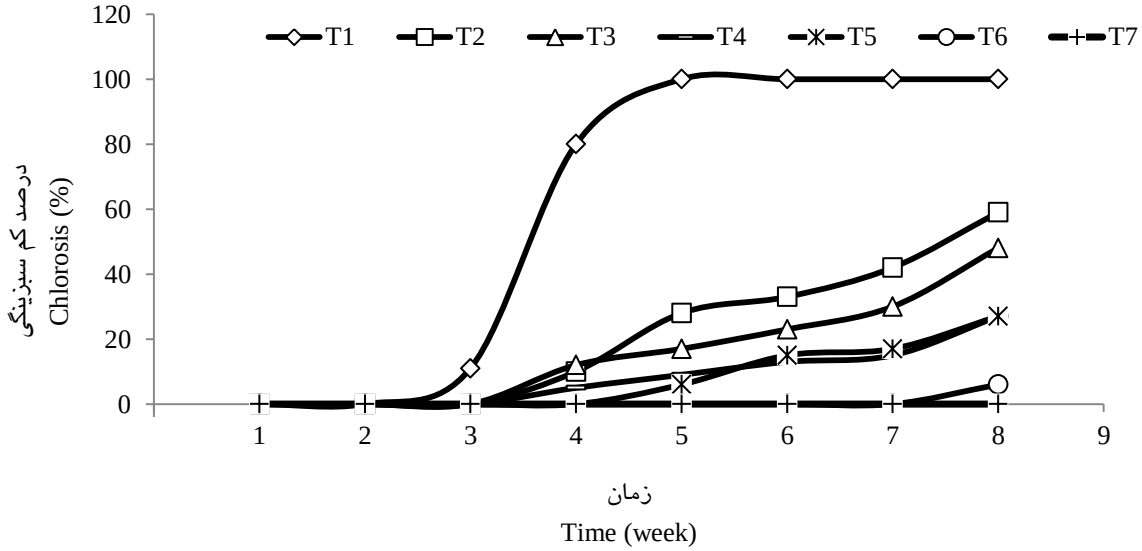

Fig. 4. Influence of different concentrations of organic iron (Fe-EDTA) and inorganic iron ($FeCl_3$) on leaf chlorosis of GF677 plantlets during eight weeks culture under *in vitro* conditions [T1: Fe free medium (control), T2: 0.05 mM $FeCl_3$ T3: 0.1 mM $FeCl_3$, T4: 0.2 mM $FeCl_3$, T5: 0.05 mM Fe-EDTA, T6: 0.1 mM Fe-EDTA, T7: 0.2 mM Fe-EDTA].

شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف آهن آلی (Fe-EDTA) و آهن معدنی ($FeCl_3$) بر کم‌سبزینگی برگی گیاهچه‌های GF677 طی هشت هفته کشت در شرایط درون شیشه‌ای [T1: محیط کشت بدون آهن (شاهد)، T2: ۰/۰۵ میلی‌مولار $FeCl_3$، T3: ۰/۱ میلی‌مولار $FeCl_3$، T4: ۰/۲ میلی‌مولار $FeCl_3$، T5: ۰/۰۵ میلی‌مولار Fe-EDTA، T6: ۰/۱ میلی‌مولار Fe-EDTA، T7: ۰/۲ میلی‌مولار Fe-EDTA].

همان‌طور که در شکل‌های ۴ و ۵ مشاهده می‌شود، غلظت‌های مختلف Fe-EDTA و $FeCl_3$ بر وقوع کم-سبزینگی برگی گیاهچه‌های GF677 طی هشت هفته کشت تأثیرگذار بودند. به‌طوری که کمترین کم‌سبزینگی برگی در تیمار ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌مولار Fe-EDTA بود که به ترتیب تا روز هفتم و هشتم کشت کم‌سبزینگی برگی مشاهده نشد و بیشترین مقدار سبزینگی را داشتند (شکل ۴). تیمار شاهد بیشترین مقدار کم‌سبزینگی را نشان داد. اولین وقوع کم‌سبزینگی برگی در تیمار شاهد در هفته سوم کشت مشاهده شد و بیشترین مقدار آن در هفته پنجم تا هشتم کشت بود (شکل ۴). غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌مولار $FeCl_3$ کم‌سبزینگی را در هفته چهارم نشان دادند و به تدریج با یک شیب ملایم تا هفته هشتم ادامه پیدا کرد (شکل ۴). در شکل ۵ مشاهده می‌شود، گیاهچه‌های GF677 که در محیط دارای Fe-EDTA کشت شدند کم‌سبزینگی کمتری نسبت به گیاهچه‌های کشت شده در $FeCl_3$ داشتند. با توجه به اینکه آهن به عنوان بخشی از آنزیم مربوط به تولید زیستی پورفیرین که جزیی اصلی در ساختار کلروفیل می‌باشد شناخته شده است (۵) و با توجه به نقش آهن در ساخت کلروفیل، علت کم‌سبزینگی برگی در گیاهچه‌ها، ناشی از رسوب آهن و در نهایت کاهش آهن در دسترس برای گیاه می‌باشد (۲۱).

Fig. 5. Influence of different concentrations of organic iron (Fe-EDTA) and inorganic iron ($FeCl_3$) on leaf chlorosis and growth parameters of GF677 plantlets MS solid medium during eight weeks culture under *in vitro* conditions [T1: Fe free medium (control), T2: 0.05 mM $FeCl_3$, T3: 0.1 mM $FeCl_3$, T4: 0.2 mM $FeCl_3$, T5: 0.05 mM Fe-EDTA, T6: 0.1 mM Fe-EDTA and T7: 0.2 mM Fe-EDTA].

شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف آهن آلی (Fe-EDTA) و آهن معدنی ($FeCl_3$) بر کم‌سبزینگی برگی و ویژگی‌های رویشی پایه GF677 در محیط جامد MS پس از هشت هفته کشت در شرایط درون شیشه‌ای [T1: محیط کشت بدون آهن (شاهد)، T2: ۰/۰۵ میلی‌مولار $FeCl_3$، T3: ۰/۱ میلی‌مولار $FeCl_3$، T4: ۰/۲ میلی‌مولار $FeCl_3$، T5: ۰/۰۵ میلی‌مولار Fe-EDTA، T6: ۰/۱ میلی‌مولار Fe-EDTA و T7: ۰/۲ میلی‌مولار Fe-EDTA].

در جدول ۱ مشاهده می‌شود افزایش غلظت هر دو منبع آهن (Fe-EDTA و $FeCl_3$) سبب کاهش غلظت P توسط گیاهچه‌ها شد. بیشترین غلظت P با ۰/۷۸٪ در تیمار شاهد (بدون آهن) مشاهده شد (جدول ۱). کمترین مقدار غلظت P در تیمار ۰/۲ میلی‌مولار Fe-EDTA و $FeCl_3$ به ترتیب با ۰/۳۵ و ۰/۳۶٪ به‌دست آمد. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های Fe-EDTA و $FeCl_3$ (غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۲ میلی‌مولار هر دو منبع)؛ در جذب P مشاهده می‌شود می‌توان بیان کرد با توجه به اینکه رسوب آهن در محیط کشت به صورت فسفات‌آهن اتفاق می‌افتد، نبود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای با غلظت یکسان آهن آلی و معدنی می‌تواند ناشی از غلظت بالای P در محیط کشت MS باشد (۲۲). همچنین بین P و Fe رابطه هم‌کاهی وجود دارد (۲۱). مطالعه‌های مختلف نشان داده است که یکی از دلیل‌های کاهش جذب P می‌تواند تشکیل فسفات آهن و یا فسفات هیدروکسید آهن در گره‌های بخش هوایی باشد که سبب کاهش انتقال P به بخش‌های مختلف گیاه می‌شود (۶). برهمکنش P و Fe پیچیده است و از رابطه ساده‌ای پیروی نمی‌کند و تابع عامل‌های مختلفی از جمله رقم کشت شده و pH محیط رشد گیاه می‌باشد (۶).

افزایش غلظت Fe-EDTA و $FeCl_3$ سبب افزایش جذب Fe توسط گیاهچه‌ها شد (جدول ۱). منبع آهن آلی Fe-EDTA اثر معنی‌داری در مقایسه با $FeCl_3$ بر جذب Fe داشت، به‌طوری که بیشترین جذب آهن در غلظت ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌مولار Fe-EDTA به ترتیب با ۲۶۵/۷ و ۳۱۷/۵ پی‌پی‌ام به‌دست آمد (جدول ۱). این نتیجه در کشت درون شیشه‌ای هندوانه سه‌گان (۲۴)، بادام و نارنج (۲۱) و پایه گلابی OH×F333 (۲۲) نیز به‌دست آمد که با افزایش غلظت آهن در محیط کشت مقدار آهن در بافت گیاهچه‌ها نیز افزایش یافت. در رابطه با افزایش غلظت Fe-EDTA هیچ گونه اثرهای سمی در این آزمایش مشاهده نشد، که با نتیجه‌های بر روی هندوانه سه‌گان که با افزایش غلظت Fe-EDTA به مقدار ۰/۲ (و ۱۰ بار تکرار آزمایش) هیچ گونه اثری مبنی بر سمیت Fe-EDTA مشاهده نشد، مطابقت دارد (۲۴). همان‌طور که گفته شد دلیل جذب بیشتر آهن توسط گیاهچه‌ها در تیمار با آهن آلی این است که Fe-EDTA اجازه می‌دهد که آهن به صورت آرام و پیوسته در محیط کشت آزاد شود، در حالی‌که $FeCl_3$ در محیط کشت به سرعت رسوب می‌کند (۲۱).

در جدول ۱ مشاهده می‌شود، افزایش غلظت Fe-EDTA و $FeCl_3$ سبب کاهش غلظت Zn توسط گیاهچه‌ها شد. به طوری که بیشترین جذب Zn با ۵۹۴/۷ پی‌پی‌ام در تیمار شاهد (بدون آهن) به دست آمد (جدول ۱). غلظت‌های مختلف $FeCl_3$ جذب Zn را بیشتر از Fe-EDTA کاهش دادند. با افزایش غلظت هر دو منبع آهن (Fe-EDTA و $FeCl_3$) جذب Zn بیشتر کاهش پیدا کرد (جدول ۱). کاهش غلظت Zn با افزایش غلظت آهن در گیاهچه‌های بادام و نارنج نیز در شرایط درون شیشه‌ای گزارش شده است (۲۱).

افزایش غلظت Fe-EDTA منجر به افزایش جذب Mn شد (جدول ۱). به طوری که بیشترین جذب Mn با ۲۵۶/۹ پی‌پی‌ام، در تیمار ۰/۲ میلی‌مولار Fe-EDTA مشاهده شد. اما جذب این عنصر با افزایش غلظت $FeCl_3$ در محیط کشت کاهش یافت. به طوری که بیشترین جذب Mn بین غلظت‌های مختلف آهن معدنی در تیمار ۰/۱ میلی‌مولار $FeCl_3$ مشاهده شد. در کشت درون شیشه‌ای گیاهچه‌های بادام نیز با افزایش غلظت Fe-EDTA در محیط کشت MS، جذب Mn افزایش یافت (۲۱). تفاوت در روند جذب Mn توسط گیاهچه‌ها در تیمارهای منبع آهن آلی و معدنی می‌تواند ناشی از کلاته شدن یون منگنز توسط EDTA موجود در محیط کشت دارای منبع آلی و در نتیجه افزایش غلظت Mn گیاهچه‌ها با افزایش غلظت Fe-EDTA در محیط کشت باشد (۲۲).

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف آهن آلی (Fe-EDTA) و آهن معدنی ($FeCl_3$) بر غلظت عنصرهای معدنی گیاهچه‌های پایه GF677 پس از هشت هفته کشت در شرایط درون شیشه‌ای.

Table 1. Influence of different concentrations of organic iron (Fe-EDTA) and inorganic iron ($FeCl_3$) on mineral concentration of GF677 plantlets during eight weeks culture under *in vitro* conditions.

منبع آهن Iron source	غلظت Concentration (mM)	فسفر P (%)	آهن Fe (ppm)	روی Zn (ppm)	منگنز Mn (ppm)
شاهد Control	0	0.78 a†	35.39 e	594.7 a	213.6 e
$FeCl_3$	0.05	0.53 b	128.8 d	328.2 c	218.9 d
$FeCl_3$	0.1	0.43 bc	143.1 d	241 d	240.2 b
$FeCl_3$	0.2	0.36 c	178 c	218.4 d	215.2 e
Fe-EDTA	0.05	0.51 b	136.5 d	438.5 b	221.9 c
Fe-EDTA	0.1	0.41 bc	265.7 b	375.5 bc	240.2 b
Fe-EDTA	0.2	0.35 c	317.5 a	273.2 cd	256.9 a

† Means in each column with similar letters are not significantly different at 5% level of probability using DMRT.

† در هر ستون میانگین‌هایی که حرف‌های مشابه دارند، در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

نتیجه‌های این پژوهش نشان داد با افزایش سطح‌های Fe-EDTA و $FeCl_3$ شاخص کلروفیل برگ در گیاهچه-های پایه GF677 افزایش یافت (جدول ۲). همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود بیشترین مقدار کلروفیل با ۳۸/۳ (SPAD) در تیمار ۰/۲ میلی‌مولار Fe-EDTA به‌دست آمد (جدول ۲). در این تیمار گیاهچه‌ها بیشترین مقدار سبزینگی را داشتند (شکل ۵). کمترین مقدار شاخص برگ با ۱۳ (SPAD) در تیمار شاهد (بدون آهن) مشاهده شد. در این تیمار در هفته هشتم رنگ گیاهچه‌ها به سفید متمایل گشت (شکل ۵). بین غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ $FeCl_3$ و Fe-EDTA اختلاف معنی‌داری در شاخص کلروفیل برگ مشاهده نشد (جدول ۲). پورفیرین جزیی اصلی در ساختار کلروفیل می‌باشد که عنصر آهن به عنوان بخشی از آنزیم مربوط به تولید زیستی آن شناخته شده است (۵). با توجه به نقش آهن در ساخت کلروفیل، علت رشد کم و زردی برگ‌ها در گیاهچه‌ها، ناشی از رسوب آهن و در نهایت کاهش آهن در دسترس برای گیاه می‌باشد. به طوری که مقدار کلروفیل برگ‌ها رابطه مثبتی با افزایش سطح‌های آهن در محیط کشت دارند (۲۴). در این آزمایش محیط کشت بدون آهن باعث ایجاد ظاهری سفید رنگ در گیاهچه‌ها شد (شکل ۵) و این گیاهچه‌ها توانستند تا پایان هفته هشتم در محیط کشت زنده بمانند که می‌تواند به علت در دسترس قرار گرفتن کربوهیدرات (ساکاروز) از راه محیط کشت و کاهش نقش معمول کلروپلاست به عنوان منبع انرژی گیاه باشد (۲۲).

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود سرعت فتوسنتز و هدایت روزنه‌ای نیز از غلظت‌های مختلف Fe-EDTA و $FeCl_3$ اثر گرفت. بیشترین سرعت فتوسنتز و هدایت روزنه‌ای به ترتیب با ۶/۴۷ (میکرومول در مترمربع در ثانیه) و ۰/۲۲۶ (مول در مترمربع در ثانیه) در غلظت ۰/۲ میلی‌مولار Fe-EDTA مشاهده شد. در تیمار شاهد (بدون آهن) کمترین سرعت فتوسنتز و هدایت روزنه‌ای به ترتیب با ۰/۶ (میکرومول در مترمربع در ثانیه) و ۰/۰۵۳ (مول در مترمربع در ثانیه) به‌دست آمد. آهن به علت توانایی در تغییر ظرفیت خود می‌تواند به عنوان یک جزو اساسی در سیستم اکسید و احیای یاخته، انتقال الکترون‌ها را در فتوسنتز تسهیل نماید و به عنوان کوآنزیم در آنزیم‌های منتقل کننده الکترون و ترکیب ماده‌هایی که پیش ماده ساخت کلروفیل هستند شرکت کند و به همین دلیل در فتوسنتز گیاه مؤثر باشد (۱۵). با توجه به اینکه بیشترین مقدار آهن برگ‌ها (حدود ۸۰٪) در کلروپلاست قرار دارد (۱۵)، نتیجه‌های این آزمایش نشان داد که با افزایش آهن آلی در محیط کشت MS به غلظت

۰/۲ میلی‌مولار می‌توان مقدار کلروفیل و سرعت فتوسنتز و در نتیجه ریزافزایی پایهGF677 را در شرایط درون شیشه‌ای بهبود بخشید.

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف آهن آلی (Fe-EDTA) و آهن معدنی ($FeCl_3$) بر شاخص کلروفیل، سرعت فتوسنتز و هدایت روزنه‌ای گیاهچه‌های GF677 پس از هشت هفته کشت در شرایط درون شیشه‌ای.

Table 2. Influence of different concentrations of organic iron (Fe-EDTA) and inorganic iron ($FeCl_3$) on chlorophyll index, photosynthesis rate and stomatal conductance of GF677 plantlets during eight weeks culture under *in vitro* conditions.

منبع آهن Iron source	غلظت Concentration (mM)	شاخص کلروفیل Chlorophyll index (SPAD)	سرعت فتوسنتز Photosynthesis rate ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)	هدایت روزنه‌ای Stomatal conductance ($mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)
شاهد Control	0	13 c†	0.61 e	0.053 d
$FeCl_3$	0.05	23.6 bc	1.52 d	0.106 c
$FeCl_3$	0.1	29.8 ab	1.75 d	0.116 c
$FeCl_3$	0.2	31.63 ab	3.19 c	0.183 b
Fe-EDTA	0.05	29.3 ab	1.82 d	0.101 c
Fe-EDTA	0.1	35.07 ab	4.86 b	0.211 ab
Fe-EDTA	0.2	38.3 a	6.47 a	0.226 a

† Means in each column with similar letters are not significantly different at 5% level of probability using DNMRT.

† در هر ستون میانگین‌هایی که حرف‌های مشابه دارند، در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

نتیجه‌گیری

از نتیجه‌های به‌دست آمده مشخص می‌شود که نوع منبع آهن آلی نسبت به آهن معدنی تأثیر معنی‌داری ($P \leq 0.05$) بر شاخص‌های رشد، جذب عنصرهای معدنی و ویژگی‌های فتوسنتزی گیاهچه‌های GF677 در شرایط درون شیشه‌ای دارد. همچنین نتیجه‌های این آزمایش نشان داد که با افزایش Fe-EDTA در محیط کشت MS به غلظت ۰/۲ میلی‌مولار می‌توان ریزافزایی و سرعت پرآوری پایه GF677 را در شرایط درون شیشه‌ای بهبود بخشید. بنابراین توصیه می‌شود در افزایش درون شیشه‌ای پایه GF677، آهن آلی جایگزین آهن معدنی شود.

منابع References

۱. امامی، ع. ۱۳۷۵. روش‌های تجزیه گیاه. جلد اول. انتشارات سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی. وزارت کشاورزی. ۱۲۸ ص.

۲. حبیبی، ف. و م.ا. امیری. ۱۳۹۳. اثر تنش شوری بر رشد و جذب عنصرهای معدنی توسط دو پایه مرکبات در شرایط درون شیشه‌ای. مجله علوم و فنون باغبانی. ۸۴-۱۵:۷۳

3. Ahmad, T., H.U. Rahman, M.S. Ahmad and M.H. Leghari. 2003. Effect of culture media and growth regulators on micropropagation of peach rootstock GF677. Pakistan J. Bot. 35:331-338.

4. Antonopoulou, C., K. Dimassi, I. Therios, C. Chatzissavvidis and V. Tsirakoglou. 2005. Inhibitory effects of riboflavin on *in vitro* rooting and nutrient concentration of explants of peach rootstock GF677. Sci. Hortic. 106:268-272.
5. Clarkson, D.T. and J.B. Hanson. 1980. The mineral nutrition of higher plants. Ann. Rev. Plant. Physiol. 31:239-298.
6. Dalton, C.C., K. Iqbal and D.A. Turner. 1983. Iron phosphate precipitation in Murashige and Skoog media. Physiol. Plantarum 57:472-476.
7. Dimassi, T.K. 1995. *In vitro* rooting of rootstock GF677 (*Prunus amygdalus* × *Prunus persica*) as influenced by mineral concentration of the nutrient medium and type of culture tube sealing material. HortScience 70:105-108.
8. Dolcet-Sanjuan, R., W.S. David and C. Machteld. 1990. Micropropagation of *Pyrus* and *Cydonia* and their responses to Fe-limiting conditions. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 21:191-199.
9. Donnini, S., A. Castagna, A. Ranier and G. Zocchi. 2009. Differential responses in pear and quince genotypes induced by Fe deficiency and bicarbonate. J. Plant Physiol. 166:1181-1193.
10. Fernandez, A.A., A. Garate, M. Juarez and I. Lucena. 1996. Tomato acquisition from iron and iron chclatcs in a calcareous sandy substrate. J. Plant. Nutr. 19:1279-1293.
11. Hangarter, R.P. and T.C. Stasinopoulos. 1991. Effect of Fe-catalysed photo-oxidation of EDTA on root growth in plant tissue culture media. Plant Physiol. 96:843-847.
12. Hangarter R.P. and T.C. Stasinopoulos. 1991. Repression of plant tissue culture growth by light is caused by photochemical change in the culture medium. Plant Sci. 79:253-257.
13. Kester, D.E. 1970. Growth *in vitro* of tissue of almond, almond hybrid and some other Prunus. HortScience 59:349-356.
14. Leifert, C. and P.J. Lumsden. 1995. Mineral and carbohydrate nutrition of plant tissue and cell cultures. Critical Rev. Plant Sci. 14:83-90.
15. Merchant, S. and B.W. Dreyfuss. 1998. Post-translational assembly of photosynthetic metalloproteinase. Ann. Rev. Plant. Physiol. 49:25-51.
16. Molassiotis, A.N., K. Dimassi, I. Theriosand and G. Dimantidis. 2003. Fe-EDDHA promotes rooting of rootstock GF677 (*Prunus amygdalus* × *Prunus persica*) explants *in vitro*. Biol. Plantarum 47:141-147.
17. Murashige, T. and F. Skooge. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plantarum 15:473-497.

18. Papathanasiou, F., C. Selby and B.M.R. Harvey. 1996. Soluble iron is lost from MS medium pre-exposed to light but growth of potato plants is not affected. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 46:117-121.
19. Pestana, M., A. Varennes, J. Abadia and E.A. Faria. 2005. Differential tolerance to iron deficiency of citrus rootstocks grown in nutrient solution. Sci. Hortic. 104:25-36.
20. Seripl, G., G. Tangolar, S. Tangolar, Y. Dasgan and N. Yilmaz. 2008. Use of *in vitro* method to evaluation some grapevine varieties for tolerance and susceptibility to sodium bicarbonate-induced chlorosis. *In Vitro* Cell Develop. Biol. 44:233-237.
21. Shibli, R.A., M.J. Mohammad and Z.I. Ajlouni. 2002. Growth and micronutrient acquisition of *in vitro* grown bitter almond and sour orange in response to iron concentration from different iron chelates. J. Plant Nutr. 25:1599-1606
22. Sotiropoulos, T.E., D.I. Almaliotis, K.N. Papadakis, I. Dimassi and N. Therios. 2006. Effects of different iron sources and concentrations on *in vitro* multiplication, rooting and nutritional status of the pear rootstock 'OH×F333'. Europ. J. Hortic. Sci. 71:222-226.
23. Tabachnik, L. and D.E. Kester. 1977. Shoot culture for almond and almond-peach hybrid clones *in vitro*. HortScience 12:545-547.
24. Thomas, P., J.B. Mythili and K.S. Shivashankara. 2000. Effects of photo-oxidative loss of $FeNa_2EDTA$ and of higher iron supply on chlorophyll content, growth and propagation rate in triploid watermelon cultures. *In Vitro* Cell Develop. Biol. Plant. 36:537-542.

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 17 (2): 135-146 (2016)

Study of Growth, Mineral Uptake and Photosynthesis of GF677 (Peach and Almond Hybrid) Rootstock in Response to Iron Source under *In Vitro* Conditions

M.E. Amiri* and F. Habibi [1]

Influence of organic iron (Fe-EDTA) and inorganic iron ($FeCl_3$) on growth, mineral uptake and photosynthesis parameters of GF677 (*Prunus persica* × *Prunus amygdalus*) rootstock were studied under *in vitro* conditions. Plantlets of GF677 rootstock were subcultured to modified Murashige and Skoog (MS) medium containing 1 mg l^{-1} 6-Benzyladenine (BA) and 0.1 mg l^{-1} naphthaline acetic acid (NAA) 0, 0.05, 0.1 and 0.2 mM concentrations of Fe-EDTA and $FeCl_3$. The experiment was containing on a completely randomized design with five replicates in eight weeks. Results showed that, treatments of 0.1 and 0.2 mM Fe-EDTA and 0.2 $FeCl_3$ had a significant effect on measured parameters. The highest fresh weight, dry weight, proliferation rate, shoot length, leaf chlorophyll index, photosynthesis rate and stomatal conductance of plantlets were observed in 0.2 mM Fe-EDTA, Meanwhile, control (iron free) and 0.05 mM $FeCl_3$ treatment had the, highest leaf chlorosis and lowest growth rate, leaf chlorophyll index, photosynthesis rate and stomatal conductance. Both iron sources caused increasing Fe uptake by plantlets, but 0.1 and 0.2 mM Fe-EDTA had a significant effect on Fe uptake in comparison to $FeCl_3$. Treatment of $FeCl_3$ decreased P, Zn and Mn uptake by plantlets. Increasing Fe-EDTA concentration in the medium increased Mn uptake and decreased P and Zn uptake. So, according these results, replacing Fe-EDTA instead of $FeCl_3$ in *in vitro* culture of GF677 rootstock, improve growth response and photosynthesis parameters.

Key Words: Proliferation rate, Photosynthesis, Chlorophyll, Chlorosis, Stomatal conductance.

1. Professor and Former M.Sc. Student of Horticulture, College of Agriculture, University of Zanjan. I.R.Iran, respectively.
* Corresponding author, Email: (m-amiri@znu.ac.ir)