نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و دوم، شماره چهارم، ۱۳۹٤
http://jopp.gau.ac.ir

بررسی رشد و جذب عناصر معدنی پایه GF677 (هیبرید هلو و بادام) در واکنش به پتانسیل آب در غلظت‌های مختلف آگار در محیط کشت بافت گیاهی

***مهری مشایخی[۱]، محمد اسماعیل امیری[۲] و فریبرز حبیبی[۳]**

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، [۲]دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، [۳]کارشناس‌ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/٦ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/٦/۳۱

چکیده

سابقه و هدف: دسترسی و جذب عناصر توسط ریزنمونه به عنوان یک اصل مهم در کشت بافت گیاهی محسوب می‌شود. عامل محدود کننده حداکثر رشد بهینه گیاه، کافی نبودن دسترسی به مواد معدنی است. یک رابطه خطی بین رشد گیاه، جذب عناصر، پتاسیل آب محیط کشت و حرکت عناصر معدنی از طریق محیط کشت وجود دارد. رشد گیاهچه‌ها در شرایط محیط کشت بافت گیاهی با افزایش غلظت آگار به دلیل پتانسیل‌های گوناگون آبی که ایجاد می‌کند، کاهش می‌یابد. با وجود اهمیت جذب مواد معدنی در شرایط محیط کشت بافت گیاهی که بخش مهمی برای رشد گیاهچه‌ها است، ولی تا به امروز، کنترل جذب عناصر معدنی و جنبه‌های حمل و نقل یون‌ها و نقش پتانسیل آب محیط کشت مواد معدنی کمتر مورد توجه بوده است. اما این پژوهش می‌تواند برای شناسایی بهتر تأثیر غلظت‌های مختلف آگار بر رشد و مقدار عناصر در دسترس ریزنمونه‌ها به‌کار رود.

مواد و روش‌ها: برای تهیه ریزنمونه جوانه‌های یکساله پایه GF677 مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از پرآوری، ۳ ریزنمونه یکنواخت (حدود ۲۰ میلی‌متر طول) در همان محیط کشت پرآوری با غلظت‌های مختلف آگار [صفر (به‌عنوان محیط مایع)، ۳، ۵، ۷، ۱۰ و ۱٤ گرم بر لیتر] به‌مدت ٦ هفته واکشت شدند. این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٤ تکرار اجرا گردید. داده‌ها (صفات رشدی و عناصر معدنی) در پایان دوره آزمایش

*مسئول مکاتبه: mehri_m662004@yahoo.com

(هفته ششم) جمع‌آوری شدند. پس از جمع‌آوری داده‌ها، برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار MSTAT-C استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها به کمک آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد، صفاتی از قبیل وزن تر، وزن خشک، محتوای آب، تعداد شاخساره، ارتفاع شاخساره و تعداد برگ به‌طور معنی‌داری تا غلظت ۵ گرم آگار افزایش یافتند. شاخص کلروفیل برگ در غلظت‌های بالای آگار نسبت به شاهد کمی کاهش یافت. بیشترین غلظت عناصر پر مصرف (N, P, K, Mg, Ca) و کم مصرف (Zn, Fe, Mn, Cu) در پتانسیل آبی ۰/۱۱- و ۰/۷۷- مگاپاسکال و کمترین غلظت عناصر در پتانسیل آبی ۰/۹۸- و ۱/۱۵- مگاپاسکال به‌دست آمد. پایه GF677 یک پایه توانا در جذب روی (Zn) بود. بیشترین ارتفاع گیاهچه‌ها در تیمار مایع و بهترین شرایط رشد و پرآوری در تیمار ۳ و ۵ گرم به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: در این آزمایش غلظت بهینه آگار برای رشد و پرآوری گیاهچه‌های GF677 ۳ تا ۵ گرم بود. در غلظت ۳ گرم بیشترین سرعت پرآوری و در غلظت ۵ گرم بهترین شرایط رشدی و پرآوری نسبت به غلظت‌های بالاتر آگار به‌دست آمد. البته در غلظت ۳ گرم آگار برای جلوگیری از شیشه‌ای شدن بایستی ریزنمونه‌ها بلافاصله بعد از کشت و پرآوری به محیط جدید واکشت شوند و غلظت بالاتر از ۷ گرم آگار در لیتر برای این گیاه توصیه نمی‌شود.

واژه‌های کلیدی: پتانسیل آب، جذب عناصر، شیشه‌ای شدن، غلظت آگار، کلروفیل

مقدمه

پایه GF677 هیبرید طبیعی هلو (*Prunus persica* L.) و بادام (*Prunus amygdalus* Batsch) است که به طور گسترده در دنیا برای هسته داران مورد استفاده قرار می‌گیرد، از مزایای این پایه مقاومت به خاک‌های آهکی، رطوبت زیاد خاک، خشکی، بیماری‌های لکه آجری، لکه سیاه و بیماری ویروسی آبله‌ای است و متحمل به کمبود آهن می‌باشد (۳). دسترسی و جذب عناصر توسط ریزنمونه به عنوان یک اصل مهم در کشت بافت گیاهی محسوب می‌شود. عامل محدود کننده حداکثر رشد بهینه گیاه، کافی نبودن دسترسی به مواد معدنی است (۱). یک رابطه خطی بین رشد گیاه، جذب عناصر، پتاسیل آب محیط کشت و حرکت عناصر معدنی از طریق محیط کشت وجود دارد (۱۷). انتشار مهمترین مکانیسم جذب عناصر معدنی توسط ریزنمونه در محیط کشت است (۲۰). اگر عناصر معدنی اطراف ریزنمونه انتشار نیابد، کمبود عناصر به سرعت رخ می‌دهد و رشد متوقف می‌گردد (۱٤).

آگار معمول‌ترین ماده ژلزا است که در کشت بافت مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱). رشد گیاهچه‌ها در شرایط محیط کشت بافت گیاهی با افزایش غلظت آگار به‌دلیل پتانسیل‌های گوناگون آبی که ایجاد می‌کند کاهش می‌یابد. این امر نشان می‌دهد که غلظت بالای آگار دسترسی عناصر را کاهش داده و علائم کمبود عناصر مانند نکروز در برگ‌های ریزنمونه‌ها مشاهده گردد (۹). رشد و دسترسی عناصر در محیط کشت جدا از پتانسیل آب محیط کشت نیستند. برای مثال دسترسی آب باعث دسترسی عناصر برای ریزنمونه می‌گردد و این یک جنبه مهم برای رشد در شرایط محیط کشت بافت گیاهی ریزنمونه است. گاهی اوقات افزایش در غلظت عناصر معدنی باعث افزایش میزان جذب و رشد نمی‌شود، اما تغییر در غلظت‌های آگار اختلاف معنی‌داری بر رشد ریزنمونه‌ها دارد (۲). برای یک ریزازدیادی مؤثر باید خاطر نشان کرد که سطح بهینه عناصر در محیط کشت به‌طور قابل ملاحظه‌ای برای هر گونه یا ژنوتیپ گیاهی قابل تغییر است (۱۰). روش کشت بافت گیاهی یک ابزار مفید برای مطالعات تغذیه‌ای گیاهان است، به‌خاطر این‌که در این روش کنترل بیشتری نسبت به شرایط بیرونی وجود دارد و تعداد زیادی ژنوتیپ می‌تواند در یک فضای محدود ارزیابی شوند. به‌عنوان مثال در شرایط مزرعه، گیاه در شرایط آب و هوایی متغییر قرار می‌گیرد که نتایج ممکن است تحت شعاع آن‌ها قرار گیرد. در حالی که شرایط تغذیه‌ای و آب و هوایی در شرایط محیط کشت بافت گیاهی در تمام طول سال قابل کنترل است (۲۱). اگرچه گزارش‌های زیادی روی بهینه‌سازی محیط کشت، ترکیب تنظیم کننده‌های رشد و غلظت آن‌ها وجود دارد اما پژوهش‌های اندکی در مورد اثر پتانسیل آب بر

رشد و جذب عناصر مخصوصاً برای پایه‌های درختان میوه صورت گرفته است (۸). با وجود اهمیت جذب مواد معدنی در شرایط محیط کشت بافت گیاهی که بخش مهمی برای رشد گیاهچه‌ها است، ولی تا به امروز، کنترل جذب عناصر معدنی و جنبه‌های حمل و نقل یون‌ها و نقش پتانسیل آب محیط کشت مواد معدنی کمتر مورد توجه بوده است (۱۳). به‌نظر می‌رسد که یون‌ها ممکن است به ژل متصل شوند و یا ژل یک مانع برای انتشار فراهم می‌کند (۱۹). بنابراین، می‌توان استنباط کرد که سرعت کم انتشار مواد معدنی ممکن است یک عامل محدود کننده برای حمل و نقل یون‌ها در محیط کشت باشد. انتشار مواد معدنی در محیط کشت به غلظت عناصر معدنی، غلظت آگار و آب در دسترس بستگی دارد. بنابراین، جذب مواد معدنی از محیط کشت توسط ریزنمونه به انتشار یون‌ها بستگی دارد (۲).

انتشار کم یون‌ها از طریق محیط کشت یک عامل محدود کننده برای جذب عناصر معدنی است، هنگامی که سطوح عناصر معدنی در محیط کشت افزایش یابد بایستی جذب مواد معدنی و رشد ریزنمونه افزایش یابد، اما در بسیاری از موارد، رشد ریزنمونه و میزان جذب، تغییری نمی‌یابد به‌خاطر اینکه رشد ریزنمونه به پتانسیل آب محیط کشت بستگی دارد (۱).

جذب و انتشار عناصر در شرایط پتانسیل‌های مختلف محیط کشت بسیار پیچیده است و اطلاعات اندکی در این رابطه موجود است. همچنین غلظت بحرانی آگار برای جذب بهینه عناصر توسط ریزنمونه ضروری است. اکثر مطالعات تغذیه‌ای در شرایط محیط کشت بافت گیاهی برای رشد ریزنمونه‌ها بر پایه ترکیب محیط کشت، نوع تنظیم کننده‌های رشد و نسبت آن‌ها بوده است. اما این پژوهش می‌تواند برای شناسایی بهتر تأثیر غلظت‌های مختلف آگار بر رشد و مقدار عناصر در دسترس ریزنمونه‌ها به‌کار رود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه: برای تهیه ریزنمونه جوانه‌های یکساله پایه GF677 مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌های گیاهی پس از انتقال به آزمایشگاه با مایع ظرفشویی و آب مقطر شستشو داده شدند. سپس به قطعاتی در اندازه‌های کوچک به‌طوری که در هر قطعه یک جوانه وجود داشت، تقسیم گردیدند. قطعات گیاهی پس از شستشوی مجدد با آب مقطر استریل، به‌مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور و سپس با محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی گردیدند.

در مرحله بعد ریزنمونه‌ها سه بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. سپس ریزنمونه‌های ضدعفونی شده به محیط کشت MS با ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP انتقال داده شدند. جوانه‌های رشد یافته، به محیط پایه موراشیگ و اسکوگ (MS) واکشت شدند (۱۶). ترکیبات محیط پرآوری شامل عناصر پرمصرف، عناصر کم‌مصرف، ویتامین‌ها و آهن، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین (BA) و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید (NAA) بود. تنظیم pH محیط کشت روی ۵/۷ تا ۵/۸ با NaOH یک نرمال و HCl یک نرمال انجام شد. به محیط ۷ گرم بر لیتر آگار اضافه شد و با تکان دادن و گرمادهی پیوسته روی هیتر بطور کامل حل شد. سپس محیط در ظروف کشت ۲۵۰ میلی‌لیتری پخش شدند و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ psi به‌مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند. در هر ظرف کشت ۵۰ میلی‌لیتر محیط اضافه گردید. پس از واکشت ریزنمونه‌ها در محیط جامد (MS)، به اتاقک رشد در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی (شدت نور ۲۵۰۰ تا ۳۰۰۰ لوکس) منتقل شدند.

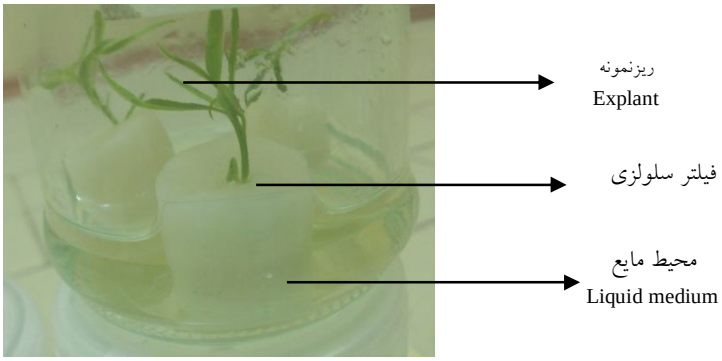
اندازه‌گیری پتانسیل آب محیط کشت: برای اندازه‌گیری پتانسیل آب از اسمومتر استفاده شد. پتانسیل آب محیط کشت با افزایش غلظت آگار به‌طور خطی کاهش یافت (جدول ۱).

جدول ۱- پتانسیل آب محیط MS با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و غلظت‌های مختلف آگار

Table 1. Water potential of MS medium with 30 gl^{-1} sucrose and different concentrations of agar

پتانسیل آب (مگاپاسگال) Water potential (MPa)	غلظت آگار (گرم بر لیتر) Agar concentration (gl^{-1})
-0.11	0
-0.35	3
-0.77	5
-0.84	7
-0.98	10
-1.15	14

اعمال تیمار: بعد از پرآوری، ۳ ریزنمونه یکنواخت (حدود ۲۰ میلی‌متر طول) در همان محیط کشت پرآوری با غلظت‌های مختلف آگار [صفر (به‌عنوان محیط مایع)، ۳، ۵، ۷، ۱۰ و ۱۴ گرم بر لیتر] واکشت شدند. برای کشت در محیط مایع و جلوگیری از غرق شدن ریزنمونه‌ها از فیلتر سلولزی (سوربورول) استفاده گردید و ریزنمونه‌ها در وسط فیلتر مستقر شدند (شکل ۱).



شکل ۱- کشت ریزنمونه در محیط مایع.

Figure 1. Explant culture in liquid medium

طرح آزمایشی: این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه زنجان، در سال ۱۳۹۲-۱۳۹۱ اجرا گردید. هر تیمار در ٤ تکرار (ظرف کشت)، که در هر ظرف کشت سه ریزنمونه یکنواخت (به اندازه ۲ سانتی‌متر) به‌مدت شش هفته به‌منظور بررسی واکنش رشدی و پتانسیل جذب عناصر معدنی توسط پایه GF677 واکشت شدند.

جمع‌آوری داده‌ها: داده‌ها در پایان دوره آزمایش (هفته ششم) جمع‌آوری شدند. پارامترهای رشد از قبیل وزن تر، وزن خشک، تعداد شاخساره، ارتفاع شاخساره، تعداد برگ، درصد شیشه‌ای شدن و شاخص کلروفیل برگ اندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری وزن تر، گیاهچه‌های پایه GF677 از ظروف کشت خارج شدند و با آب مقطر شسته شدند (به منظور حذف محیط کشت MS از انتهای گیاهچه‌ها). وزن تر آن‌ها با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ اندازه‌گیری شد. سپس، گیاهچه‌ها درون پاکت کاغذی گذاشته و در آون با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۸ ساعت قرار گرفتند و پس از این مدت از آون خارج شدند و وزن خشک آن‌ها با همان ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. محتوای آب (WC) توسط رابطه زیر اندازه‌گیری شد (۱۵).

$$\text{محتوای آب } [\%] = \frac{\text{وزن خشک} - \text{وزن تر}}{\text{وزن تر}} \times ۱۰۰$$

طول شاخساره گیاهچه‌ها توسط خط‌کش (با دقت ۰/۱) بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شدند. تعداد شاخساره نیز از شمارش شاخساره‌های تولید شده در هفته ششم به‌دست آمد. تعداد برگ نیز در

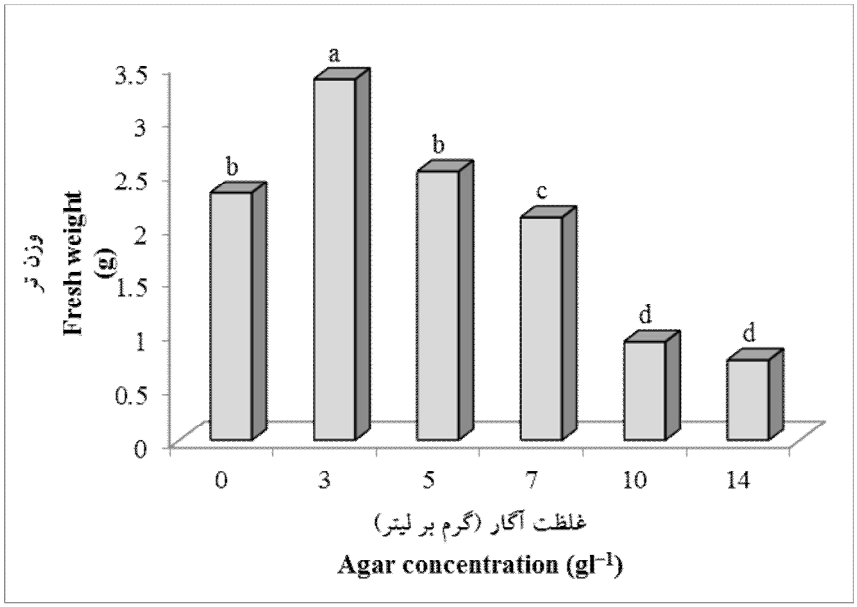
هر گیاهچه شمارش شد. شاخص کلروفیل برگ با دستگاه *SPAD* مدل (Konica Minolta 502, Japan)، قرائت شد و چندین نقطه در برگ وسط هر گیاهچه برای اندازه‌گیری انتخاب شدند.

برای اندازه‌گیری عناصر معدنی، از گیاهچه‌های خشک شده در آون به روش هضم‌تر با اسید سولفوریک- اسیدسالیسیلیک و آب اکسیژنه عصاره‌گیری شدند. بعد از عصاره‌گیری، نیتروژن (N) با روش کجلدال، فسفر (P) با روش کالریمتری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Cecil.Series 2, England)، پتاسیم (K) توسط فلیم فتومتر (Jenway PFP7, England)، کلسیم (Ca)، منیزیم (Mg)، آهن (Fe)، روی (Zn)، منگنز (Mn) و مس (Cu) توسط دستگاه جذب اتمی (Varian-Specter AA 20, Australia) اندازه‌گیری شدند (۷).

تجزیه تحلیل آماری داده‌ها: پس از جمع‌آوری داده‌ها، برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار MSTAT-C استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها به کمک آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت و نمودارها توسط نرم‌افزار Excel رسم گردیدند.

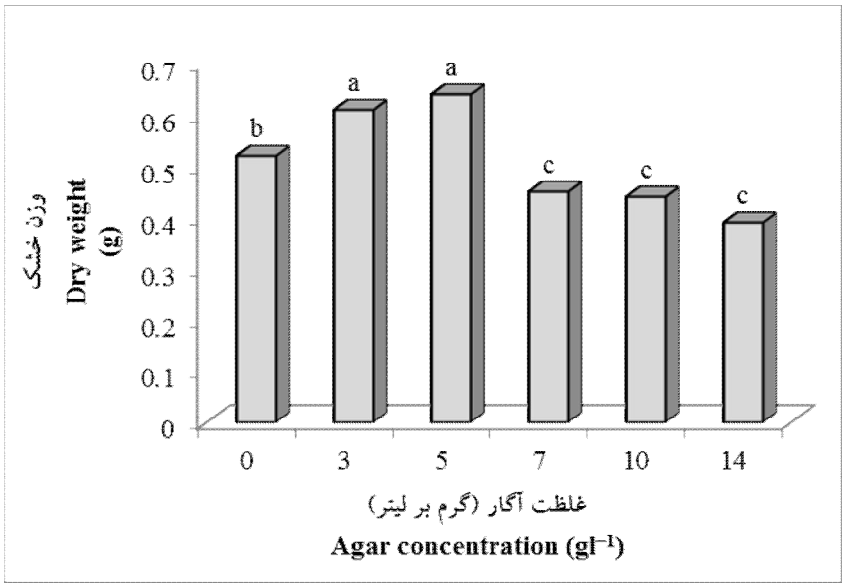
نتایج و بحث

صفات رشد: نتایج حاصله این آزمایش نشان داد که غلظت‌های مختلف آگار اختلاف معنی‌داری روی صفات رشد (وزن تر، وزن خشک، محتوای آب، تعداد شاخساره، ارتفاع شاخساره، تعداد برگ، درصد شیشه‌ای شدن و شاخص کلروفیل برگ) و جذب عناصر معدنی پایه GF677 داشت. یک رابطه خطی بین صفات رشدی گیاهچه‌های GF677 و دسترسی آب و غلظت آگار وجود داشت. وزن تر و خشک گیاهچه‌ها با افزایش غلظت آگار کاهش یافتند. همان‌طور که در شکل ۲ و ۳ مشاهده می‌شود بیشترین وزن تر و خشک در غلظت کم آگار (صفر تا ۵ گرم) به‌دست آمد.



شکل ۲- اثر سطوح مختلف آگار بر وزن تر گیاهچه‌های GF677.

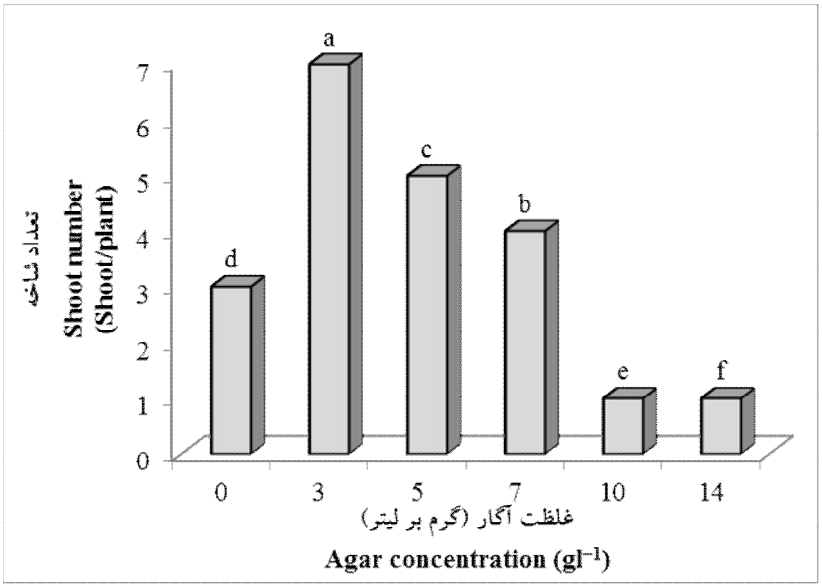
Figure 2. Effect of different agar levels on fresh weight of GF677 plantlets



شکل ۳- اثر سطوح مختلف آگار بر وزن خشک گیاهچه‌های GF677

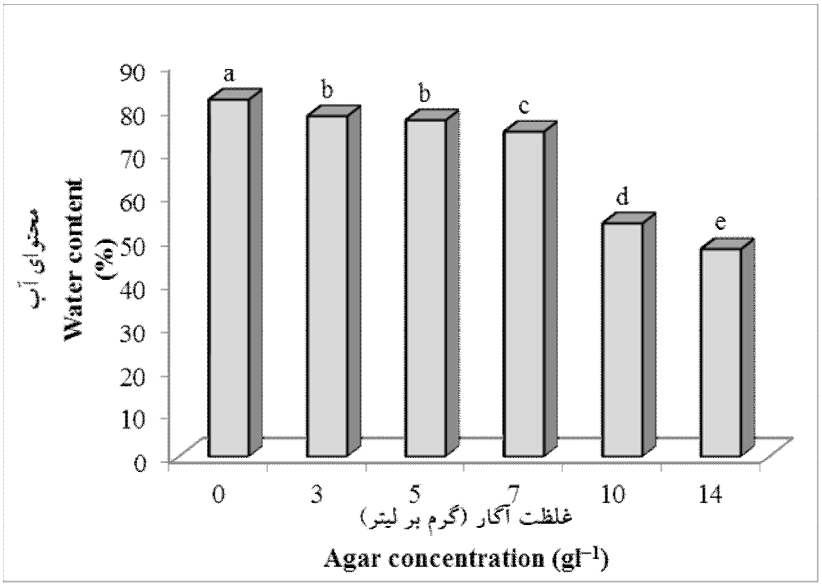
Figure 3. Effect of different agar levels on dry weight of GF677 plantlets

در غلظت بالای آگار، محتوای آب، تعداد شاخساره، طول شاخساره و تعـداد بـرگ در مقایسـه بـا غلظت صفر تا ۵ کاهش یافتند. کمترین محتوای آب گیاه در غلظت‌های بـالای آگـار (۱۰ و ١٤ گـرم) مشاهده شد (شکل ۵). بیشترین تعداد شاخساره و تعداد برگ در غلظت ۳ و ۵ گرم آگار بدسـت آمـد (شکل ٤ و ٦). به عبارت دیگر پرآوری پایه GF677 با افزایش غلظت آگار در محیط کـاهش یافـت. بیشترین تعداد شاخساره بطور معنی‌داری در غلظت‌های کم آگار (۳ تا ۵ گرم) مشاهده شد. دلیـل ایـن موضوع می‌تواند بخاطر اثر آنتاگونیستی سیتوکنین (BA) و آگار روی طویل شدن شاخساره باشد (۹). به دلیل اینکه یکی از موادی که به شدت توسط آگار جذب می‌شود، سـیتوکنین اسـت بنـابراین آگـار می‌تواند جذب سیتوکنین از محیط کشت را برای بافت مشکل سازد (۵). شاخساره‌های بدست آمده در محیط مایع بیشترین ارتفاع را داشتند و در حالی که اختلاف معنی‌داری بین غلظت ۳، ۵ و ۷ گرم آگار مشاهده نشد (شکل ۷).



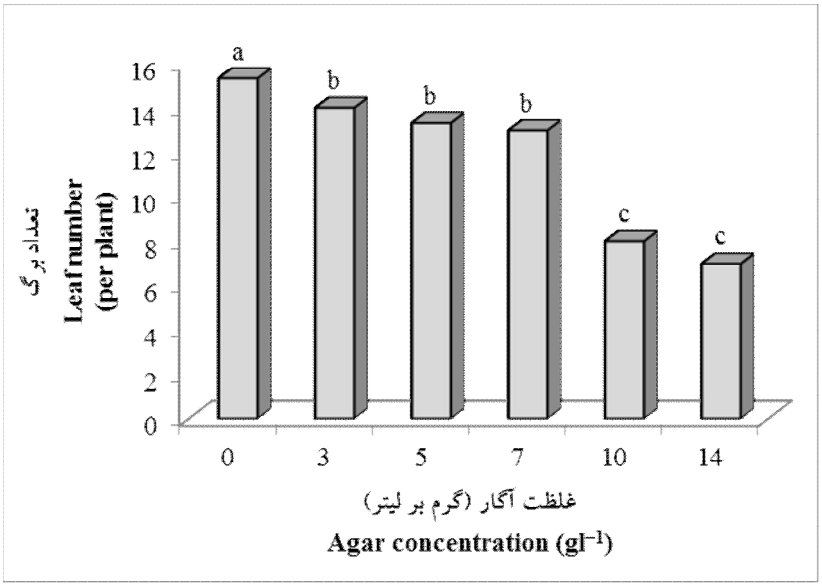
شکل ٤- اثر سطوح مختلف آگار بر تعداد شاخه گیاهچه‌های GF677.

Figure 4. Effect of different agar levels on shoot number of GF677 plantlets .



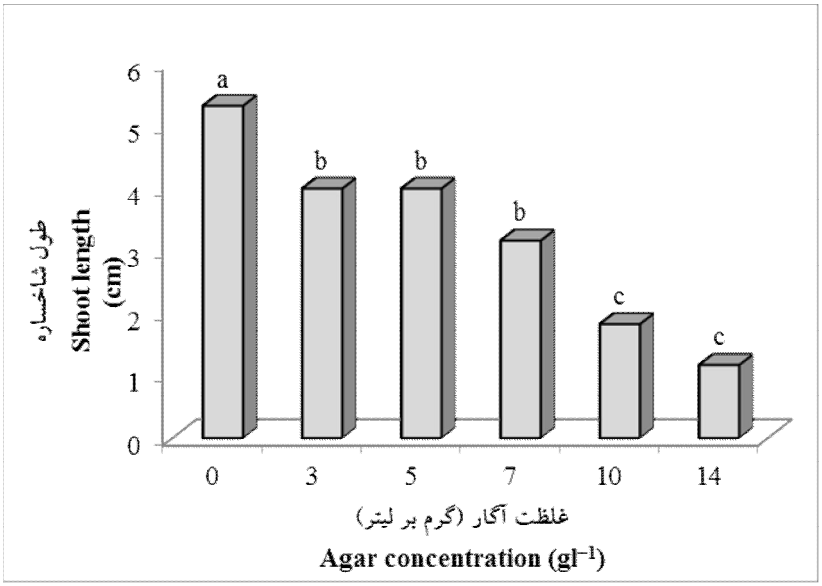
شکل ٥- اثر سطوح مختلف آگار بر محتوای آب گیاهچه‌های GF677.

Figure 5. Effect of different agar levels on water content of GF677 plantlets.



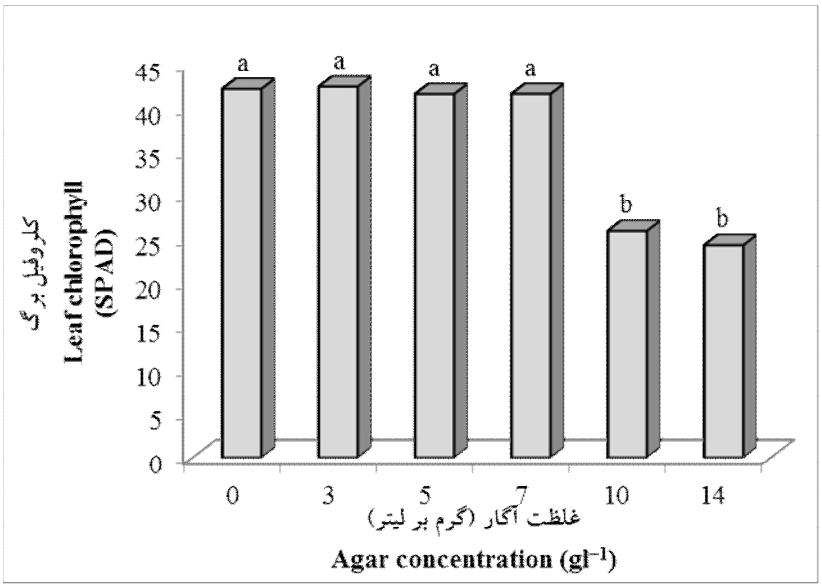
شکل ٦- اثر سطوح مختلف آگار بر تعداد برگ گیاهچه‌های GF677.

Figure 6. Effect of different agar levels on leaf number of GF677 plantlet.



شکل ۷- اثر سطوح مختلف آگار بر طول شاخساره گیاهچه‌های GF677.

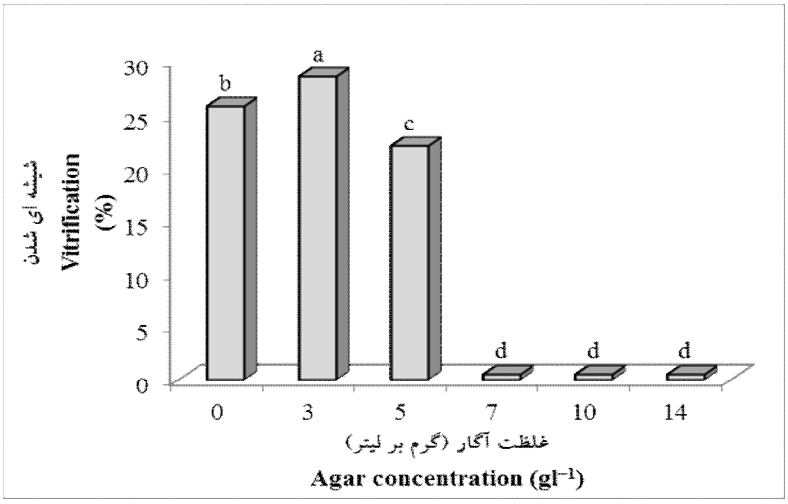
Figure 7. Effect of different agar levels on shoot length of GF677 plantlets.



شکل ۸- اثر سطوح مختلف آگار بر کلروفیل برگ گیاهچه‌های GF677.

Figure 8. Effect of different agar levels on leaf chlorophyll of GF677 plantlets

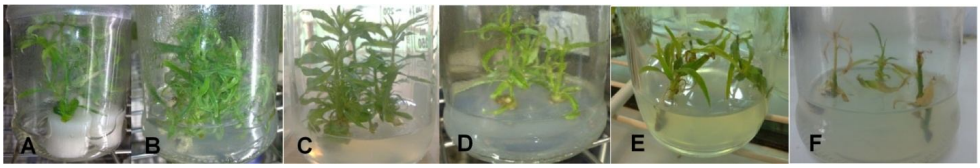
بیشترین سرعت پرآوری و درصد شیشه‌ای شدن در غلظت ۳ گرم مشاهده شد. در محیط مایع سرعت پرآوری کم بود (نسبت به سطوح ۳ و ۵ گرم آگار). شیشه‌ای شدن در غلظت ۷ تا ١٤ گرم آگار مشاهده نشد (شکل ۹). بنابراین شیشه‌ای شدن کمتر را می‌توان به افزایش عامل ژلزا و کاهش آب قابل دسترس نسبت داد. شاخص سبزینگی برگ (*SPAD* units) تحت تأثیر سطوح بالای آگار قرار گرفت. همچنین بین غلظت صفر، ۳، ۵ و ۷ گرم آگار اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۸).



شکل ۹- اثر سطوح مختلف آگار بر درصد شیشه‌ای شدن گیاهچه‌های GF677.

Figure 9. Effect of different agar levels on percent of vitrification of GF677 plantlets.

کاهش میزان پارامترهای رشد به خاطر کاهش آب قابل دسترس توسط گیاه است. زیرا در غلظت‌های بالای آگار، کاهش رشد به دلیل اثر بازدارندگی آگار روی پتانسیل ماتریک محیط کشت و اختلال در جذب عناصر معدنی می‌باشد (۱). همچنین افزایش پتانسیل آبی، توانایی گیاه را برای جذب آب کاهش می‌دهد که این امر موجب کاهش رشد گیاه می‌گردد، زیرا گیاه برای جذب باید انرژی بیشتری صرف کند و به جای اینکه این انرژی صرف رشد گردد، صرف جذب می‌شود (٦). همچنین غلظت‌های بالای آگار باعث نامتعادل شدن پتانسیل آب در سیمپلاست و آپوپلاست می‌گردد که منجر به کاهش رشد می‌گردد (۱۲). برای مثال گوپال و ایواما (۲۰۰۷) گزارش کردند که رشد ریزغده‌های سیب‌زمینی به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تنش آبی القا شده توسط غلظت‌های بالای آگار کاهش یافت (۱۲).



شکل ۱۰- رشد گیاهچه‌های GF677 (*Prunus amygdalus* × *P. persica*) در محیط کشت پرآوری MS طی شش هفته کشت در غلظت‌های مختلف آگار [A (صفر)، B (۳)، C (۵)، D (۷)، E (۱۰) و F (۱٤) گرم بر لیتر].

Figure 10. Growth of GF677 (*Prunus amygdalus* × *P. persica*) plantlets on MS proliferation medium during six weeks culture under different agar concentration [A (0); B (3); C (5); D (7); E (10) and F (14) g l^{-1}].

جذب عناصر معدنی: غلظت‌های بالای آگار نه تنها روی پارامترهای رشد پایه GF677 طی شش هفته کشت اثر گذاشت، بلکه روی جذب عناصر معدنی نیز تأثیر گذار بود (جدول ۲). به‌عنوان مثال بالاترین غلظت عناصر بافت در غلظت‌های صفر تا ۵ گرم آگار به‌دست آمد. در محیط جامد افزایش غلظت آگار یک اثر منفی در میزان عناصر داشت در حالی‌که بیشترین جذب عناصر در محیط مایع بدست آمد (جدول ۲). بیشترین غلظت عناصر نیتروژن (N)، فسفر (P)، پتاسیم (K)، کلسیم (Ca) و منیزیم (Mg) در محیط مایع به‌دست آمد. در حالی‌که در سطوح ۷ تا ١٤ کمترین غلظت این عناصر مشاهده شد. جذب عناصر تحت تاثیر سطوح بالای آگار قرار گرفت، در حالی‌که جذب مس (Cu) تحت تأثیر غلظت‌های بالای آگار قرار نگرفت. پایه GF677 یک پایه توانا در جذب روی در شرایط افزایش پتانسیل آبی بود (جدول ۲).

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف آگار بر جذب عناصر معدنی پایه GF677 (*Prunus amygdalus* × *P. persica*) در محیط پرآوری MS طی شش هفته کشت.

Table 2. Effect of different agar concentration on mineral uptake of GF667 (*Prunus amygdalus* × *P. persica*) in MS proliferation medium culture during six weeks.

غلظت آگار (گرم بر لیتر) Agar concentration (gl^{-1})	پتانسیل آب (مگاپاسگال) Water potential (MPa)	غلظت عناصر Mineral concentration (ppm)								
		نیتروژن (N)	فسفر (P)	پتاسیم (K)	کلسیم (Ca)	منیزیم (Mg)	آهن (Fe)	روی (Zn)	منگنز (Mn)	مس (Cu)
0	-0.11	17830^{a}	1333^{a}	941.1^{a}	1402^{a}	823.3	344^{a}	386.7 ^{a}	130.5 ^{a}	10 ^{a}
3	-0.35	17480^{b}	1316^{a}	725.6^{b}	1340^{ab}	776.7^{b}	306.7^{b}	343.3^{a}	121.7^{ab}	11.67^{a}
5	-0.77	17130^{c}	1092^{b}	709.3^{c}	1328^{b}	763.6^{b}	295.3^{c}	301.7^{b}	115.2 ^{b}	13.33^{a}
7	-0.84	14330^{d}	885.9^{c}	709.1^{c}	1198^{c}	523.3^{c}	295^{c}	263.3^{ab}	101.7^{c}	10^{a}
10	-0.98	8730^{e}	823.5^{c}	725.7^{d}	975^{d}	503.6^{d}	225.5^{d}	170.3^{b}	90.3 ^{c}	8.33 ^{a}
14	-1.15	8380^{f}	695^{d}	332.4^{e}	945^{d}	489.4^{d}	155^{d}	161.7^{b}	70.2 ^{d}	10 ^{a}

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه می‌باشند، در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌داری ندارند.

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

دسترسی عناصر یکی از عوامل مهم رشد در شرایط محیط کشت بافت گیاهی، ریزنمونه می‌باشد. رشد به جذب عناصر محلول توسط ریزنمونه ارتباط دارد (۱). آب قابل دسترس در محیط کشت اثر مهمی در میزان دسترسی عناصر دارد. به عبارت دیگر جذب عناصر با کاهش میزان آب قابل دسترس کاهش می‌یابد. آب قابل دسترس در محیط کشت عناصر معدنی را برای ریزنمونه فراهم می‌کند و منجر به رشد بهینه آن می‌گردد (٤). در این پژوهش، انتقال عناصر معدنی از محیط ژل با کاهش مقدار آب در دسترس محدود گردید. دسترسی آب ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی از قبیل هدایت هیدرولیکی را تعیین می‌کند. بنابراین کاهش رشد گیاه در نتیجه کاهش دسترسی عناصر می‌باشد. در غلظت بالای آگار (بالای ۱۰ گرم)، هدایت هیدرولیکی و دسترسی آب کم می‌باشد، بنابراین جذب و دسترسی عناصر کاهش می‌یابد (۱۷). به عبارت دیگر، انتشار با افزایش میزان آب قابل دسترس در محیط کشت افزایش می‌یابد. همچنین با افزایش غلظت ماده ژل‌زا در محیط کشت، انتشار عناصر خیلی کم می‌شود. ضریب انتشار مؤثر عناصر معدنی در محیط ژل در هدایت هیدرولیکی بالاتر مشاهده می‌شود (۱۱). به خاطر اینکه عناصر تحت تأثیر آب قابل دسترس در محیط کشت انتشار می‌یابند و این انتشار عناصر با محتوای آب قابل دسترسی، بیشتر می‌شود. برای مثال امیری و ارزانی (۲۰۰٦) گزارش کردند که محدود شدن انتشار عناصر در محیط کشت به‌طور قابل ملاحظه‌ای رشد گیاهچه موز را کاهش داد. آن‌ها بیان کردند کمتر بودن آب قابل دسترس باعث جذب کمتری از عناصر توسط ریزنمونه می‌گردد (۱).

نتیجه‌گیری کلی

تأمین عناصر معدنی در محیط کشت بخش ضروری در کشت بافت گیاهی محسوب می‌شود. همچنین تعیین غلظت بهینه آگار بین ژنوتیپ گیاهی و سیستم کشت تغییر می‌کند. این تفاوت‌ها در جذب عناصر توسط ریزنمونه در محیط نشان می‌دهد که اثر متقابلی بین عناصر و غلظت آگار وجود دارد که دسترسی و جذب عناصر را تحت تأثیر قرار می‌دهد. با توجه به این‌که انتشار عناصر و پتانسیل آب فرآیندی غالب در محیط کشت بافت گیاهی است و نقش مهمی در دسترسی عناصر توسط ریزنمونه گیاهی دارد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که غلظت بحرانی آگار برای رشد بهینه و جذب بیشتر عناصر معدنی بایستی برای هر ژنوتیپ تعیین گردد. همچنین غلظت ۷ گرم آگار بر لیتر که در تمام آزمایش‌های کشت بافت گیاهی برای تمام ژنوتیپ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرید نمی‌تواند صحیح

باشد. به عنوان مثال در آزمایش ما غلظت بهینه آگار برای رشد و پرآوری گیاهچه‌های GF677 ۳ تا ۵ گرم بود. که در غلظت ۳ گرم بیشترین سرعت پرآوری و در غلظت ۵ گرم بهترین شرایط رشدی و پرآوری نسبت به غلظت‌های بالاتر آگار بدست آمد. البته در غلظت ۳ گرم آگار برای جلوگیری از شیشه ای شدن بایستی ریزنمونه‌ها بلافاصله بعد از کشت و پرآوری به محیط جدید واکشت شوند و غلظت بالاتر از ۷ گرم آگار در لیتر برای این گیاه توصیه نمی‌شود.

منابع

1. Amiri, M.E., and Arzani, K. 2006. Mineral availability and growth of banana (*Musa acuminate* var. Dwarf Cavendish) explant under various relative matric potential *in vitro*. J. Food Agri. Environ. 4: 105-109.
2. Amiri, M.E. 2010. Control of mineral uptake *in vitro*: mineral solubility and mineral movement *in vitro*. LAP Lambert Academic. 345p.
3. Antonopoulou, C., Dimassi, K., Therios, I., Chatzissavvidis. C., and Tsirakoglou, V. 2005. Inhibitory effects of riboflavin on *in vitro* rooting and nutrient concentration of explants of peach rootstock GF677. Sci Hort. 106: 268-272.
4. Aranda-Peres, A.N., and Martinelli, A.P. 2009. Adjustment of mineral elements in the culture medium for the micropropagation of three *Vriesea* Bromeliads from the Brazilian Atlantic Forest: the importance of calcium. Hort Science. 44: 106-112.
5. Bagheri, A., and Saffari M. 1998. Principal of plant tissue culture. Ferdowsi university press. Mashhad. 422p. (In Persian)
6. Casanova, E., Moysset, L., and Trillas, M.I. 2008. Effects of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots. Bio. Plant. 52: 1-8.
7. Emami, A. 1997. Methods of plant analysis. Agriculture research and promotion organization. Jahad Agriculture Ministry. 128p. (In Persian)
8. Ghashghaie, J., Brenckmann, F., and Saugier, B. 1991. Effects of agar concentration on water status and growth of rose plants cultured *in vitro*. Physiol Plant. 82: 73-78.
9. Ghashghaie, J., Brenckmann, F., and Saugier, B. 1992. Water relations and growth of rose plants cultured *in vitro* under various relative humidity. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 30: 51-57.
10. Goncxalves, S., Correia, P.J., Martins-Loucxao, M.A., and Romano, A. 2005. A new formulation for *in vitro* rooting of carob tree based on leaf macronutrients concentrations. Biol Plant. 49: 277-280.

11. Gopal, J., Iwama, K., and Jitsuyama, Y. 2008. Effect of water stress mediated through agar on *in vitro* growth of potato. *In Vitro* Cell Dev. Biol. Plant. 44: 221-228.
12. Gopal, J., and Iwama, K. 2007. *In vitro* screening against water-stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol. Plant Cell Rep. 26: 93-700.
13. Gribble, K., Conroy, J.P., Holford, P., and Milham, P.J. 2002. *In vitro* uptake of minerals by *Gypsophila paniculata* and hybrid eucalypts, and relevance to media mineral formulation. Aust. J. Bot. 50: 713-723.
14. Mezzetti, B., Rosati, P., and Casalicchio, G. 1991. *Actinidia aeliciosa* C.F. liong *in vitro*: growth and mineral uptake by explants. Plant Cell Tiss Org Cult. 25: 91-98.
15. Molassiotis, A.N., Sotiropoulos, T., Tanou, G., kofidis, G., Diamantidis, C., and Therios, I. 2006. Antioxidant and anatomical responses in shoot culture of the apple rootstock MM106 treated with NaCl, KCI, manitol or sorbitol. Biol Plant. 50: 331-338.
16. Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Plant Physiol. 15: 473-497.
17. Niedz, R.P., and Evens, T.J. 2007. Regulation of plant tissue growth by mineral nutrition. *In Vitro* Cell Dev. Biol. Plant. 43: 370-381.
18. Owens, A., Lowell, D., Chris, A., and Wozniak, E. 1991. Measurement and effects of gel Matric Potential and expressibility on production of morphogenic callus by cultured *sugarba*g leaf discs. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 26: 127-133.
19. Romberger, J.A., and Tabor, C.A. 1971. The *Piece abies* shoot apical meristem in culture: Agar and autoclaving effects. American J Botany. 58: 131-140.
20. Williams, R.R. 1991. Factors determining mineral uptake *in vitro*. Acta Hortic. 289: 165-169.
21. Zhang, Y.J., Qian, Y.Q., Mu, X., Cai, Q.G., Zhou, Y.L., and Wei, X.P. 1998. Plant regeneration from *in vitro*-cultured seedling leaf protoplasts of *Actinidia eriantha* Benth. Plant Cell Rep. 17: 819-821.