

فعالیت آنزیم فریک کیلیت ردوکتاز ریشه روشی برای ارزیابی تحمل به سبزی ناشی از کمبود آهن در پایه‌های سیب (*Malus domestica* Borkh.)

محسن پیرمادیان^۱، لطفعلی ناصری^{۲*}، حمید عبداللهی^۳ و علی اصغر شهابی^۴
۱. دانشجوی سابق دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه و مربی، بخش تحقیقات گیاهان زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان
۲. دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۳. دانشیار، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، کرج
۴. استادیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۴/۸)

چکیده

به منظور ارزیابی دقیق تحمل به تنش کمبود آهن برخی از پایه‌های رویشی سیب، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با هجده تیمار و سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل پایه در شش سطح (M9، M26، M7، M25، MM106، MM111) و آهن در سه سطح (محلول غذایی نصف غلظت هوگلند به‌عنوان شاهد، هوگلند بدون آهن، هوگلند افزون بر بی‌کربنات) انتخاب شدند. پایه‌های رویشی سیب در گلدان‌های ۲۰ لیتری حاوی پرلیت کشت شدند. به مدت دو ماه و نیم با محلول غذایی نصف غلظت هوگلند تغذیه شدند سپس تیمارهای بالا به مدت ۸ هفته روی نهال‌ها اعمال شد. pH زهکش، فعالیت آنزیم فریک کیلیت ردوکتاز ریشه، رشد شاخه، وزن تر و خشک برگ و ریشه، تورم ریشه‌های موئین، سبزینه (کلروفیل) کل برگ، غلظت آهن برگ و ریشه اندازه‌گیری شد. بنابر نتایج به‌دست آمده پایه‌های M9، M7 و M25 در مقایسه با پایه‌های M26، MM106 و MM111 میزان سبزی (کلروزیس) برگ کمتری نشان دادند. میزان فعالیت آنزیم فریک کیلیت ردوکتاز تحت تأثیر تیمار ۲ میکرو مول در لیتر آهن در پایه‌های M9، M7 و M25 از دیگر پایه‌ها بیشتر بود، افزون بر فعالیت بیشتر FCR پایه‌های M9، M7 و M25، آن‌ها تأثیر بیشتری در کاهش pH در محیط فراریشه (ریزوسفر) نسبت به سه پایه دیگر داشته‌اند. شاخص زیست‌توده (بیوماس) یعنی نسبت وزن خشک ریشه به وزن خشک شاخه در پایه‌های M9، M7 و M25 میزان‌های بیشتری را نشان دادند. بنابر نتایج این آزمایش به دلیل وجود همبستگی معنی‌دار بین روش اندازه‌گیری FCR با ریشه‌های جداشده و شاخص‌های سبزیگی برگ، کاهش pH ریزوسفر و زیست‌توده این روش، روش مناسبی برای غربالگری پایه‌های سیب متحمل به سبزی ناشی از کمبود آهن نسبت به روش اندازه‌گیری FCR با ریشه‌های متصل به گیاه کامل است.

واژه‌های کلیدی: غربالگری پایه، کلروز آهن، pH ریزوسفر.

Ferric chelate reductase activity as screening index for selecting iron chlorosis resistance of Apple rootstocks

Moshen Pirmoradian¹, Lotfali Naseri^{2*}, Hamid Abdollahi³ and Ali Asghar Shahabi⁴

1. Former Ph.D. Student, Urmieh University and Instructor, Department of Horticultural Crop Research, Isfshan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Isfahan, Iran
2. Associate Professor, Faculty of Agriculture, Urmieh University, Iran
3. Associate Professor, Horticultural Sciences Institute, AREEO, Iran
4. Assistant Professor, Isfshan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Isfahan, Iran

(Received: May 1, 2016 - Accepted: Jun. 28, 2016)

ABSTRACT

For precise evaluation of the sensitivity of some apple rootstocks to iron stress, a study with a factorial approach was established based on a complete randomized design with 18 treatments and three replications. Experimental treatments included rootstocks in 6 levels (M9, M26, M7, M25, MM106, MM111) and iron was chosen in three levels (Half strength Hoagland solution as control, Half strength Hoagland without iron, Half strength Hoagland with Bicarbonate). Apple rootstocks were planted in 20 liter pots containing Perlite. Before beginning the experiment, the pots were supplied with half strength Hoagland solution for 2.5 months. After this period, the abovementioned treatments were applied on the rootstocks. Drainage pH was measured 5 times during the experiment. Root ferric chelate reductase activity (FCR) in separated roots and in the intact plant with connected roots was calculated. Then, plants were separated into shoots and roots in the laboratory. Ferric chelate reductase activity, shoot growth, dry and fresh weight of leaf and root, swelling of root tip, leaf chlorophyll (Chl) concentration and iron concentration of leaf and root were also measured. According to the achieved results, M9, M7 and M25 rootstocks in comparison with M26, MM106 and MM111, showed lower leaf chlorosis. Root Ferric chelate reductase activity for M9, M7 and M25 rootstocks treated with 2 μ M Fe was higher than other rootstocks. The rootstock M9 in this treatment increased 4.3 times in comparison to the control and the MM106 rootstock in 10 mM sodium bicarbonate treatment had the lowest FCR activity compared to the control. In addition to the FCR increase in M9, M7 and M25 rootstocks, they had more effect in the rhizosphere pH decrease than other rootstocks. Biomass indicator (root/shoot dry weight) in rootstocks of M9, M7 and M25 showed larger values. According to the result of this experiment, due to meaningful correlation between the measurement method of FCR with excised roots and chlorophyll index, this method is a suitable approach for screening of apple rootstocks with iron chlorosis in comparison with FCR measurement with intact plant.

Keywords: Iron Chlorosis, rootstocks screening, rhizospher pH.

* Corresponding author E-mail: Inaseri@chmail.ir

مقدمه

کمبود آهن یک مشکل تغذیه‌ای در سراسر جهان برای تولید محصولات مختلف است که عملکرد کیفی و کمی آن‌ها را تحت تأثیر فرار می‌دهد. در این شرایط گیاهان نمی‌توانند به ظرفیت و قابلیت رشد خود برسند و ارزش غذایی آن‌ها افت کرده آسیب و زیان اقتصادی وارد می‌شود. در موارد شدید، کمبود آهن ممکن است باعث از دست رفتن کامل محصول شود (Schenkeveld, 2010). برآورد شده است که ۲۰ تا ۵۰ درصد از درختان میوه پرورش‌یافته در حوزه مدیریتانه از کمبود آهن رنج می‌برند، این عارضه تغذیه‌ای به‌طور معمول در خاک‌های قلیایی و آهکی که دست‌کم یک سوم خاک‌های جهان را تشکیل می‌دهند، رخ می‌دهد (Chen *et al.*, 1982). حضور سطوح بالای بی‌کربنات، pH محلول خاک را در محدوده ۷/۵ تا ۸/۵ بافر کرده و حلالیت و قابلیت استفاده از آهن را به‌شدت کاهش می‌دهد (Hell & Stephan, 2003; Lindsay & Schwab, 1982). در چنین شرایطی کاربرد کلات‌های آهن (III) می‌تواند مشکل را حل کند، ولی این مواد خیلی گران هستند و هزینه زیادی را به باغدار تحمیل می‌کند. استفاده از پایه‌های متحمل به کمبود آهن از مناسب‌ترین راهکارهای مؤثر برای حل این مسئله است (Donnini *et al.*, 2009; Tagliavini & Rombola, 2001).

ارزیابی میزان تحمل نژادگان (ژنوتیپ)‌ها و رقم‌های گیاهان زراعی و پایه‌های درختان میوه به‌طور معمول پس از اعمال تنش کمبود آهن بر پایه شاخص‌هایی مانند ویژگی‌های رشدی، شاخص سبزی‌نگی، میزان سبزینه (کلروفیل) و سبزی (کلروزیس) برگ و در نهایت اندازه‌گیری مقادیر عنصرهای غذایی انجام می‌شود (Mohammadi, 2014; Kucukyumuk & Erdal, 2011; Mirabdolbagi, 2007; Chunhui, 2005). Asadi *et al.* (2015) با بررسی مقاومت پایه‌های مرکبات به آهک در بستر خاک بر پایه درجه زردی برگ، آهن فعال برگ و ریشه و ماده خشک گیاه، پایه‌های حساس و متحمل به آهک را متمایز ساخت.

کمبود آهن سازوکارهایی را در گیاه برمی‌انگیزد، این سازوکارها باعث تغییرپذیری سوخت‌وسازی (متابولیسم) و در نهایت منجر به پایداری و افزایش ظرفیت جذب آهن در گیاه تحت تنش می‌شود (Sergi *et al.*, 2009). گیاهان در پاسخ به کمبود آهن در محیط ریشه به دو دسته تقسیم می‌شوند یک دسته شامل گیاهان دولپه‌ای و گیاهان غیر گرامینه‌ای (استراتژی I) و دسته دوم شامل گیاهان گرامینه‌ای (استراتژی II) هستند (Schmidt, 1999). گیاهان استراتژی I که سبب از این دسته است، واکنش‌هایی به تنش کمبود آهن در محیط ریشه نشان می‌دهند که طیفی از واکنش‌های فیزیولوژیک و ریخت‌شناختی (مرفولوژیک) را شامل می‌شود. از مهم‌ترین واکنش‌های فیزیولوژیک می‌توان افزایش ظرفیت احیاء آهن سه ظرفیتی به دو ظرفیتی یعنی افزایش فعالیت آنزیم فریک کیلیت ردوکتاز^۱ ریشه و افزایش تراوش یون H^+ توسط ریشه و در پی آن کاهش pH در محیط فراریشه (ریزوسفر) را نام برد. کاهش pH در محیط ریشه سبب افزایش حلالیت آهن و احیاء Fe^{3+} به Fe^{2+} می‌شود. تغییرپذیری ریخت‌شناختی معمول شامل تقسیم یاخته‌ای اضافی در یاخته‌های ریزودرمی، تسریع تشکیل ریشه‌های مؤین و ریشه‌های کوتاه جانبی با انتهای متورم است. این تغییرپذیری‌ها باعث می‌شود که آب و مواد غذایی از محیط ریشه با افزایش سطح ریشه بیشتر جذب شوند (Tanimoto *et al.*, 1995; Masucci & Schiefelbein, 1994).

به‌طور کلی مقاومت پایه به سبزی آهن مربوط به توانایی آن در احیاء Fe^{3+} است در این زمینه آزمایش‌هایی به‌منظور بررسی ظرفیت احیاء آهن توسط ریشه و تعیین میزان فعالیت آنزیم FCR در ریشه‌های انگور (Tagliavini, 2001)، کیوی (Rombola, *et al.*, 2002)، مرکبات (Pestana, 2005) و هلو (Gonzalo & Gogorcena, 2011 Molassiotis *et al.*, 2006) انجام گرفته است. مشخص شده که فعالیت FCR پایه‌های حساس به سبزی آهن در مرکبات و هلو پایین‌تر از پایه‌های کارآمد و

یک همبستگی خطی مثبت پیروی می‌کند. ولی باین حال محققان توصیه می‌کنند که این ارتباط باید برای هر آزمایش مشخص شود (Campbel et al., 1990).

در این آزمایش سعی بر این است که در غربالگری پایه‌ها از نظر حساسیت یا تحمل به سبزی، افزون بر نشانگرهای یادشده، بر پایه روش آنزیمی و تعیین pH در محیط فراریشه و واکنش‌های ریخت‌شناختی گیاه که مبتنی بر سازوکارهای طبیعی سازشی گیاه هستند، ارزیابی دقیق‌تری صورت گرفته و پایه‌های حساس و متحمل، به‌درستی از همدیگر جداسازی شوند تا هم بتوان در بین پایه‌های رویشی موجود پایه متحمل به سبزی را توصیه کرد و هم روش دقیق و سریعی را برای غربالگری پایه‌های در دست اصلاح ارائه کرد.

مواد و روش‌ها

نهال‌های رویشی سالم و یکنواخت سیب از پایه‌های M9، M26، M7، M25، MM106 و MM111 تهیه شد این پایه‌ها در سه گروه پایه‌های پاکوتاه (M9 و M26)، نیمه پاکوتاه (M7 و MM106) و پر رشد (MM106) و MM111 سیب انتخاب و در گلدان‌های ۲۰ لیتری که در قسمت کف آن‌ها لوله مخصوص برای کنترل خروجی زهکش تعبیه شده بود در بستر پرلیت کشت شدند. نهال‌ها با محلول غذایی نصف غلظت هوگلند استاندارد با آهن به‌صورت Fe(III)-EDTA و غلظت ۹۰ میکرومول در لیتر تغذیه شدند. تیمارها شامل: ۱- محلول غذایی نصف غلظت هوگلند با آهن به غلظت ۹۰ میکرومول در لیتر به‌عنوان شاهد ۲- محلول غذایی نصف غلظت هوگلند با آهن به غلظت ۲ میکرومول در لیتر ۳- محلول غذایی نصف غلظت هوگلند افزون بر ۱۰ میلی مول در لیتر بی‌کربنات سدیم بودند. این تیمارها به مدت ۸ هفته اعمال شدند. pH محلول غذایی در تیمار شاهد و بدون آهن برابر ۶/۵ و برای همانندسازی شرایط خاک‌های آهکی و بررسی تأثیر pH بالا در پاسخ‌های گیاه در تیمار بی‌کربنات pH محلول روی ۸ تنظیم شد، کاهش و افزایش pH به ترتیب به‌وسیله اسیدسولفوریک و

مقاوم است. درحالی‌که مشاهده‌شده کمبود آهن، فعالیت FCR در گلابی (*Pyrus communis*) را افزایش می‌دهد ولی این افزایش در به (*Cydonia oblonga*) رخ نمی‌دهد. وجود بی‌کربنات از فعالیت FCR تا حدی جلوگیری می‌کند. در این شرایط به بیشتر از گلابی تحت تأثیر قرار می‌گیرد، بنابراین مقاومت بیشتر گلابی احتمال دارد به این دلیل باشد که ریشه گلابی توانایی بیشتری در کاهش pH در محیط فراریشه در مقایسه با به دارد (Tagliavini et al., 1995).

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم فریک کیلیت ردوکتاز ریشه، در پایه‌های سیب یکی از شاخص‌های دقیق و مؤثر در تعیین حساسیت یا تحمل ژنوتیپ‌ها به کمبود آهن است (Zhang, 2002; Ting, 2011). نقش آنزیم فریک کیلیت ردوکتاز و پمپ پروتونی در افزایش جذب آهن و امکان استفاده از آن‌ها به‌عنوان روشی برای غربالگری و انتخاب پایه‌های مقاوم به سبزی آهن تأکید شده است (Gogorcena et al., 2000; Tagliavini, 2001).

بروز سبزی در اندام‌های گیاهی، منجر به از دست رفتن رنگدانه سبز می‌شود. آهن به‌طور مستقیم در زیست‌ساخت (بیوسنتز) سبزینه نقش دارد و مقادیر ناکافی یا غیرفعال آهن، تأثیر زیانباری بر نورساخت (فتوسنتز) خواهد داشت (Miller et al., 1984). سبزی می‌تواند در نتیجه کمبود عنصرهای غذایی آهن، پتاسیم، منگنز، منیزیم، روی، نیتروژن یا در نتیجه تنش آبی یا آفات، بیماری‌های قارچی، باکتریایی یا ویروسی بروز کند. هرگونه کاهش در میزان سبزینه در فرآیند دوره رویش، رشد گیاه را کاهش داده و باعث افزایش مقاومت گیاه به تنش می‌شود (Fichtner & Elkins, 2012).

ارتباط خطی مثبت بین شاخص SPAD و سبزینه کل قابل‌استخراج برگ وجود دارد. این رابطه در مورد شمار زیادی از گونه‌ها تعیین شده است (Yadava, 1986; Marquard & Tipton, 1987). ارتباط بین خواندن دستگاه سبزینه‌سنج دستی SPAD و سبزینه کل در سیب رد دلشس در گلخانه و باغ بررسی شده است مدل رگرسیون بین این دو فراسنجه (پارامتر) از

فراوانی ریشه‌های موئین متورم) ارزیابی شد (Landsberg, 1996).

اندازه‌گیری ظرفیت احیاء ریشه

ظرفیت احیاء Fe-EDTA توسط ریشه، به صورت کمی در پایان آزمایش بر پایه روش Ting *et al.* (2011)، Moog *et al.* (1995) با اندازه‌گیری میزان ظرفیت احیاء ریشه در احیاء Fe^{3+} به Fe^{2+} انجام گرفت. ظرفیت احیاء ریشه به دو روش اندازه‌گیری شد. در روش اول با ریشه‌های جداشده^۲ انجام شد، بدین منظور ۲ گرم از ریشه‌های موئین سالم و شفاف به طول ۱۰ تا ۱۵ میلی‌متر با آب مقطر شستشو داده شد و برای حذف یون‌های سطحی ریشه، به مدت ۵ دقیقه در محلول EDTA-Na₂ قرار داده شده پس از گذشت این مدت ریشه‌ها به لوله^۱ آزمایش حاوی محلول غذایی شامل عنصرهای اصلی (ماکرو) افزون بر Fe-EDTA به غلظت ۱۰۰ میکرو مول در لیتر و 2,2'-Bipyridine به غلظت ۴۰۰ میکرو مول در لیتر در pH ۵/۵ منتقل شدند برای جلوگیری از ورود نور، لوله‌های آزمایش با فویل آلومینیم پوشانده شده و به مدت دو ساعت روی دستگاه لرزا (شیکر) قرار گرفتند. میزان جذب کمپلکس Dipyridyl-Fe²⁺ تشکیل شده در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکتروفوتومتر، مدل JENWAY 6310) خوانده شد. در روش دوم آزمایش با ریشه‌های متصل به گیاه^۳ به این صورت که نهال کامل پس از خروج از بستر کاشت، در آغاز ریشه‌ها شستشو داده شد و آنگاه به مدت ۵ دقیقه در محلول حاوی EDTA-Na₂ قرار داده شدند و پس از آن به ظرف‌های ۲ لیتری حاوی عنصرهای اصلی افزون بر Fe-EDTA به غلظت ۱۰۰ میکرو مول در لیتر و 2,2'-Bipyridine به غلظت ۴۰۰ میکرو مول در لیتر، منتقل شده سطح ظرف‌ها برای جلوگیری از ورود نور توسط فویل آلومینیم پوشانده و همزمان توسط پمپ هوادهی شدند. پس از گذشت دو ساعت (Albano & William, 1996) یک نمونه از محلول موجود در ظرف حاوی ریشه‌ها برداشت و به آزمایشگاه منتقل شد. میزان جذب

بی‌کربنات سدیم انجام شد (Chouliaras *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2011).

این آزمایش در محل مرکز تحقیقات کشاورزی اصفهان در محیط گلخانه با پوشش توری پلاستیکی^۱ اجرا شد. بیشترین دما در این ایستگاه ۳۹، و کمترین دما ۹- درجه سلسیوس با اقلیم خشک و معتدل است.

اندازه‌گیری ویژگی‌های رشدی، عنصرهای غذایی برگ و ریشه و تورم ریشه

در پایان آزمایش نهال‌ها به شاخه، ریشه و برگ تقسیم‌شده و طول، وزن و شمار شاخه‌ها، شمار و وزن برگ در هر یک از آن‌ها اندازه‌گیری شد. وزن خشک هرکدام از بخش‌های گیاه پس از خشک کردن در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت تعیین شد. نسبت وزن خشک ریشه به وزن خشک شاخه برای هر یک از پایه‌ها و تیمارها به‌عنوان شاخصی برای تعیین تأثیر سبزی روی آهن بر تخصیص زیست‌توده (بیوماس) محاسبه شد (Pestana, 2005). برای تعیین عنصرهای غذایی، پنج برگ انتهایی شاخه، و قسمتی از ریشه‌های فرعی و موئین جداشده، در آب خیس شدند آنگاه با استفاده از محلول اسیدکلریدریک ۱۰ میلی مول در لیتر و پس از آن با آب مقطر شستشو داده شدند. سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۲ درجه سلسیوس خشک شدند. پس از آسیاب نمونه‌های برگ و ریشه برای اندازه‌گیری غلظت آهن در برگ و ریشه، یک گرم نمونه خشک آسیاب‌شده درون بوتله‌های چینی قرار داده شد. نمونه‌های گیاهی به مدت دو ساعت در دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس کوره الکتریکی به خاکستر تبدیل شده و با استفاده از اسیدکلریدریک نرمال عصاره‌گیری شدند. غلظت آهن در عصاره برگ و ریشه با استفاده از دستگاه جذب اتمی Shimadzu مدل ۶۷۰ اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری تورم انتهایی ریشه‌های موئین به‌عنوان یکی از واکنش‌های ریخت‌شناختی گیاه نسبت به تنش آهن با تخمین در مقیاس ۱-۱۰ (۱ بدون ریشه متورم و ۱۰ بیشترین

2. Excised Roots

3. Intact Roots

1. Shade

طرح آماری مورد استفاده

پایه‌های مورد آزمایش در گلدان‌های ۲۰ لیتری و بر پایه‌ی طرح کامل تصادفی با سه تکرار آرایش یافته و داده‌های به‌دست‌آمده بر پایه‌ی طرح بلوک‌های کامل تصادفی و به‌صورت فاکتوریل با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS تجزیه‌واریناس شدند. برای تعیین اختلاف آماری بین دو روش اندازه‌گیری FCR از آزمون t استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه‌واریناس داده‌ها بیانگر معنی‌دار بودن تأثیر نوع پایه روی همه‌ی صفات به‌استثنا طول شاخه است. همچنین همه‌ی صفات تحت تأثیر تیمارهای تنش آهن در سطح ۱ درصد معنی‌دار شدند (جدول ۱). اثر متقابل آن‌ها روی همه‌ی صفات در سطح ۱ درصد و نسبت وزن خشک ریشه به وزن خشک شاخه در سطح ۵ درصد معنی‌دار بوده است.

تغییر فعالیت آنزیم فریک کیلیت ردوکتاز ریشه

میانگین داده‌های دو روش اندازه‌گیری فعالیت FCR با آزمون t در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد روش اندازه‌گیری فعالیت FCR در آزمایش ریشه‌های جدا شده با صفات مرتبط با تنش آهن مانند شاخص SPAD، سبزی‌روی برگ و pH در محیط فراریشه با ضریب همبستگی به ترتیب برابر با ۰/۹۵۵ و ۰/۹۵۸ و ۰/۹۵۱- در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. (جدول ۲) درحالی‌که روش اندازه‌گیری FCR با گیاه کامل ارتباط معنی‌داری با هیچ‌یک از صفات بیان‌شده نشان نداد. از دلایل این همبستگی به‌احتمال استفاده از ریشه‌های موئین سالم و شفاف در روش اندازه‌گیری ریشه‌های جدا شده است، درحالی‌که در روش اندازه‌گیری ریشه‌های متصل به گیاه، برخی از ریشه‌ها چوب‌پنبه‌ای بوده و حجم ریشه‌های موئین شفاف نسبت به کل حجم ریشه کمتر بود. بنابراین در این آزمایش با توجه به اینکه میزان فعالیت FCR اندازه‌گیری شده در گیاه کامل هیچ‌گونه همبستگی با دیگر شاخص‌ها مانند میزان سبزینه و زیست‌توده گیاه ندارد بنابراین روش مناسبی برای ارزیابی مقاومت پایه‌های سیب به نظر نمی‌رسد.

کمپلکس Dipyridyl-Fe^{2+} تشکیل شده در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه طیف‌سنج نوری خوانده شد. عدد حاصل از دستگاه در ضریب خاموشی 2,2'-Bipyridine- Fe^{3+} ضرب شد (Snell *et al.*, 1959) میزان احیاء Fe^{2+} به‌صورت نانومول Fe^{2+} در گرم وزن تر ریشه در ساعت تعیین شد.

اسیدی شدن در محیط فراریشه

تغییرپذیری pH محلول موجود در بستر ریشه به‌عنوان pH در محیط فراریشه بر پایه‌ی روش Chouliaras *et al.* (2004) برای نشان دادن توانایی ریشه‌ها در اسیدی کردن آن محیط برآورد شد. در آزمایش از زهکش گلدان‌ها به‌وسیله‌ی لوله‌هایی که پیشتر بدین منظور تعبیه شده بود نمونه‌برداری برای تعیین pH انجام شد به‌این‌ترتیب که در زمان محلول‌دهی گلدان‌ها، لوله‌های تخلیه بسته می‌شدند پس از گذشت دو ساعت یک نمونه از محلول خروجی در ظرف‌های پلاستیکی ۱۰۰ میلی‌لیتری برداشت و pH آن‌ها تعیین می‌شد. با تهیه‌ی نمونه‌های همسان از گلدان‌های بدون گیاه به‌عنوان شاهد و مقایسه‌ی نمونه‌ها با آن میزان کاهش pH محلول زهکش به‌وسیله‌ی pH متر مدل Metrom744 مشخص شد.

اندازه‌گیری سبزی‌نگی

سبزی‌نگی برگ به دو روش، با برآورد میزان سبزدی یا زردی ظاهری برگ‌ها (کلروزیس) با درجه‌بندی بین ۰ تا ۵، همچنین به‌وسیله‌ی دستگاه سبزینه‌سنج دیجیتال اندازه‌گیری شد. در ارزیابی میزان سبزدی برگ، به برگ‌های بسیار سبز امتیاز ۰ و برگ‌های زرد همراه با سوختگی حاشیه‌ای امتیاز ۵ داده شد (Romera *et al.*, 1991). میزان سبزینه با استفاده از دستگاه سبزینه‌سنج مدل SPAD-502 (Minolta, Osaka, Japan) در چهار برگ به‌کلی توسعه‌یافته جوان انتهایی خوانده شد. برای تعیین همبستگی بین میزان سبزینه کل و شاخص SPAD برگ، یک منحنی واسنجی (کالیبراسیون) رسم شد، با اندازه‌گیری میزان سبزینه a و b به روش (Porra, 1989) میزان سبزینه کل محاسبه شد.

جدول ۱. تجزیه واریانس صفات مورد اندازه‌گیری در شرایط تیمارهای تنش کمبود آهن روی پایه‌های رویشی سیب

Table 1. Analysis of variance of measured traits in Fe deficit stress treatments on apple rootstocks

Source of Variation	df	Mean of Square								
		Excised FCR	Intact FCR	pH Rhizospher	SPAD Index	Leaf Chlorosis	Root Hair Swelling	Leaf Fe	Root Fe	Root /Shoot Dry Weight
Replication	2	334	14979	0.19	2.29	0.129	2.16	113	5633	0.007
Rootstock (a)	5	1393**	2225**	0.56**	237**	8.86**	13.28**	958**	3583**	0.055**
Fe Stress (b)	2	2455**	5005**	10.6**	714**	35.7**	54.88**	4314**	7609**	0.299**
a*b	10	5522**	2298**	0.08**	28.94**	2.33**	3.31**	486**	5013**	0.019*
Error	53	351	253	0.01	14.37	0.16	0.833	140	180	0.005
C.V. (%)		7.30	10.03	7.44	11.7	11.9	21	14.61	12.63	8.9

ns, **, *: Non-significant and significant at 5 and 1% probability levels, respectively.

ns, **, *: Non-significant and significant at 5 and 1% probability levels, respectively.

جدول ۲. ضریب همبستگی بین صفات اندازه‌گیری شده در پایه‌های رویشی سیب

Table 2. Correlation coefficient between measured traits in apple rootstocks

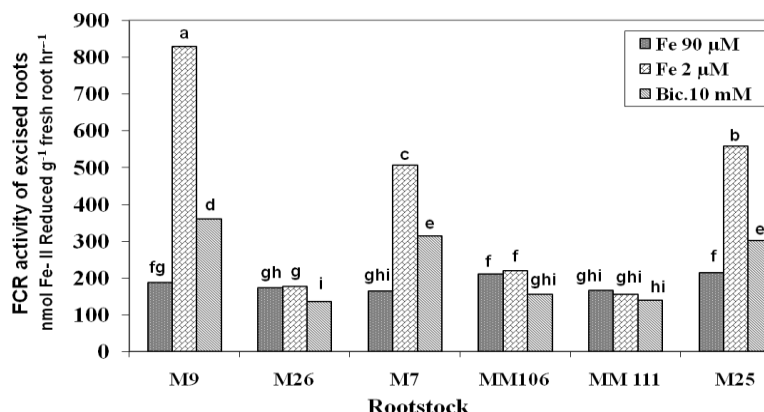
	Excised FCR	Intact FCR	Leaf Fe	Root Fe	Leaf chlorosis	Spad Index	Root DW/ Shoot DW	Root Hair Swelling	Rhizospher pH
Excised FCR									
Intact FCR	-0.407								
Leaf Fe	0.167	-0.401							
Root Fe	0.235	-0.589	0.836*						
Leaf chlorosis	-0.958**	0.375	-0.674*	-0.413					
Spad Index	0.955**	-0.534	0.596*	0.205	-0.884**				
Root /Shoot Dry Weight	0.765*	-0.175	0.079	0.254	-0.867*	0.659			
Root Hair Swelling	0.596	-0.509	-0.383	0.056	-0.565	0.770	0.544		
Rhizospher pH	-0.951**	0.436	-0.118	-0.097	0.830*	-0.937*	-0.549	-0.531	

*, **: Significantly different at 5 and 1% probability levels, respectively.

*, **: Significantly different at 5 and 1% probability levels, respectively.

انگور (Tagliavini, 2001)، کیوی (Rombola *et al.*, 2002)، مرکبات (Pestana, 2005)، و هلو (Gonzalo & Gogorcena, 2011; Molassiotis *et al.*, 2006) چنین روندی گزارش شده است. در چغندر قند مشخص شده است فعالیت FCR در pH های کمتر از ۶، ۱۰ تا ۲۰ برابر، و در pH های ۶ و بالاتر ۲ تا ۴ برابر نسبت به شاهد است (Susin *et al.*, 1996). افزایش فعالیت FCR با تنش کمبود آهن در گیاهان چوبی توسط محققان مختلف گزارش شده است (Welch *et al.*, 1993; Vizzotto *et al.*, 1997; Schmidt, 2003) در این بررسی مشخص شد که فعالیت FCR به وسیله همه پایه‌ها در شرایط کمبود Fe تحریک شده است، در حالی که در پایه‌های M26، MM106 و MM111، در تیمار بی‌کربنات این فعالیت اندک بوده است. حضور بی‌کربنات در محلول غذایی pH آن را تا حدود ۸ افزایش می‌دهد از این رو بی‌کربنات باعث کاهش فعالیت FCR می‌شود زیرا pH مناسب برای بیشینه فعالیت FCR در شرایط زنده حدود ۵/۵ است (Moog & Bruggemann, 1994).

مقایسه میانگین‌های اثر متقابل نوع پایه با تیمارهای سطوح مختلف آهن (شکل ۱) نشان می‌دهد، میزان فعالیت آنزیم فریک کیلیت ردوکتاز تحت تأثیر تیمار ۲ میکرومول در لیتر آهن در پایه‌های M9، M7 و M25 از دیگر پایه‌ها بیشتر بود، پایه M9 در تیمار ۲ میکرومول در لیتر آهن با ۴/۴ برابر نسبت به شاهد بیشترین فعالیت FCR و پایه MM106 در تیمار ۱۰ میلی مولار بی‌کربنات کمترین میزان فعالیت FCR نسبت به شاهد (۰/۷۳) را داشته است. در این آزمایش پایه‌های M9، M7 و M25 در مقایسه با سه پایه دیگر فعالیت FCR بیشتری نسبت به شاهد داشته‌اند، افزایش فعالیت FCR یکی از پیش‌نیازهای لازم برای جذب و استفاده بیشتر آهن توسط گیاه است. با وجود اینکه به‌طور معمول با افزایش pH فعالیت FCR به‌سختی انجام می‌گیرد، ولی پایه‌هایی که تحت تأثیر تیمار ۲ میکرومول در لیتر آهن، فعالیت FCR بیشتری داشتند، در تیمار بی‌کربنات ۱۰ میلی مول در لیتر نیز، فعالیت FCR بیشتری نسبت به شاهد نشان دادند. فعالیت FCR در پایه‌های MM111، MM106 و M26 در سطح شاهد بوده و یا متوقف شد. در مورد



شکل ۱. میزان فعالیت آنزیم فریک کیلیت ردوکتاز (FCR) در پایه‌های رویشی سیب تحت تنش آهن. میانگین‌هایی که در هر ستون و برای هر صفت حرف‌های همسان دارند بر پایه آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معناداری با یکدیگر ندارند.

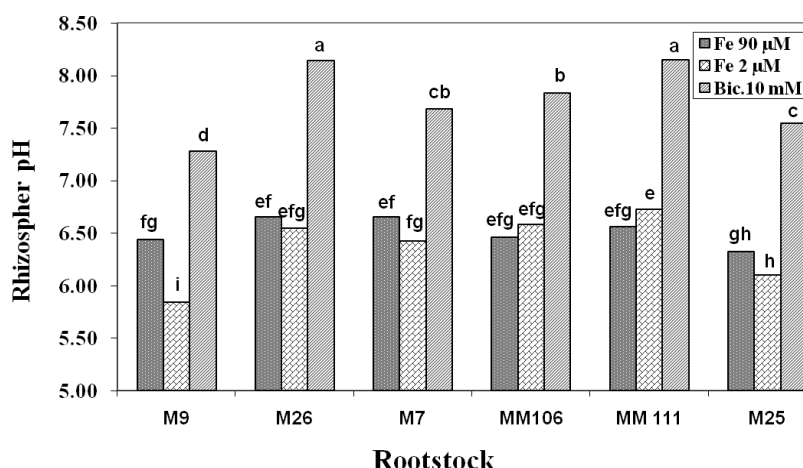
Figure 1. Root FCR activity of apple rootstocks on Fe stress conditions
Same letter were not significantly different using Duncan's multiple range test at $P \leq 0.05$

شاخص‌ها مانند زیست‌توده و کاهش pH در محیط فراریشه گیاه (جدول ۲) روش مناسبی برای غربالگری پایه‌های سیب متحمل به سبزروی آهن ارزیابی می‌شود.

تغییرپذیری pH

pH اعمال شده در محلول غذایی در تیمار شاهد و ۲ میکرو مول در لیتر آهن، ۶/۵ و در تیمار ۱۰ میلی مول در لیتر بی‌کربنات ۸ بود (شکل ۳)، کاهش pH در محیط فراریشه پس از ۲ ساعت از اعمال تیمار، پایه‌های M9، M7 و M25 در تیمار ۲ میکرو مول در لیتر آهن به ترتیب با ۰/۸۶، ۰/۲۲ و ۰/۴۰ واحد نسبت به شاهد، کمترین pH ها، و در تیمار ۱۰ میلی مول در لیتر بی‌کربنات همان پایه‌ها به ترتیب با ۰/۷۲، ۰/۳۲ و ۰/۴۵ واحد، pH در محیط فراریشه را کاهش دادند. سه پایه دیگر بدون این توانایی بودند. کاهش pH در نتیجه تنش کمبود آهن یکی از سازوکارهای سازشی برای جذب بیشتر Fe توسط ریشه گیاه است اگرچه این الگو در این آزمایش با فعالیت FCR در پایه‌ها همخوانی دارد ولی بنابر بررسی‌های انجام شده این دو فراسنجه می‌توانند مستقل از یکدیگر عمل کنند (Yi, 1996). این واکنش با نتایج Han *et al.* (1996) همخوانی دارد که در pH های بالا تنفس ریشه نژادگان‌های آهن کارا افزایش یافته، باعث افزایش تراوش H^+ می‌شود.

با وجود اینکه بی‌کربنات سدیم و در پی آن افزایش pH محیط ریشه سبب کاهش فعالیت این آنزیم می‌شود سه پایه M9، M7 و M25 حتی در چنین شرایطی هم سطح فعالیت آنزیم فریک کیلیت ردوکتاز در آن‌ها نسبت به شاهد، افزایش یافت. تجمع Fe در یاخته‌های ریشه و انتقال نیافتن آن به قسمت‌های هوایی گیاهان حساس به سبزروی (Mengel, 1994) در نتیجه بازداشتن ظرفیت احیاء Fe(III) ریشه است (Romheld, 2000). در گیاهان استراتژی I احیاء آهن سه ظرفیتی به آهن دو ظرفیتی توسط FCR یک مرحله الزامی در جذب Fe است (Welch *et al.*, 1993; Schmidt, 2003). این نتایج با یافته‌های دیگر محققان همخوانی دارد (Romera *et al.*, 1991; Gogorcena *et al.*, 2004). فعالیت FCR ریشه پایه‌های M9، M7 و M25 در مقایسه با سه پایه دیگر کمتر تحت تأثیر بی‌کربنات قرار گرفته که نشان می‌دهد در حضور بی‌کربنات نیز این پایه‌ها قادر به احیاء (در سطح محدود) و جذب بیشتر Fe هستند. یکی از دلایل این افزایش را می‌توان به اثر این پایه‌ها در کاهش pH در محیط فراریشه و افزایش حلالیت Fe(III) در شرایط تنش Fe نسبت داد (Schmidt, 2003; Han *et al.*, 1991). در این آزمایش با توجه به همبستگی بین روش اندازه‌گیری فعالیت FCR با ریشه‌های جدا شده با وضعیت سبزینگی و دیگر



شکل ۲. تغییر میانگین pH در محیط فراریشه در پایه‌های مختلف در تیمارهای مختلف Fe میانگین‌هایی که در هر ستون و برای هر صفت حرف‌های همسان دارند بر پایه آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معناداری با یکدیگر ندارند.

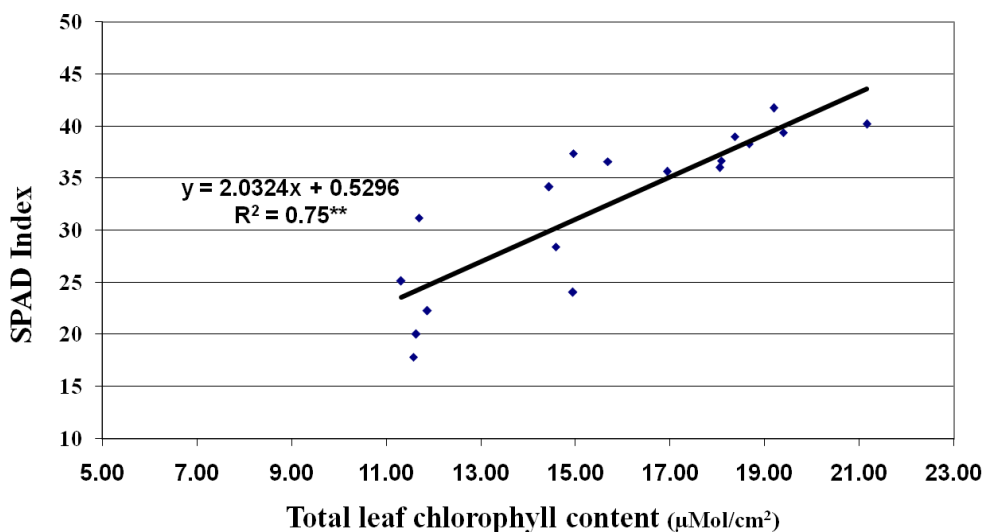
Figure 2. Rhizosphere pH variations of apple rootstocks on Fe stress conditions
Same letter were not significantly different using Duncan's multiple range test at $P \leq 0.05$

با pH مترهای مجهز به میکروالکتروود نیز امکان‌پذیر است (Ting, 2011).

شاخص سبزینه (SPAD)

شاخص سبزینه اندازه‌گیری شده در آغاز آزمایش تنها از نوع پایه در سطح ۵ درصد اثر پذیرفت و تحت تأثیر سطوح مختلف آهن و اثر متقابل آن با نوع پایه قرار نگرفت. میزان شاخص سبزینه در انتهای آزمایش، شدت سبزی روی برگ و Fe اندازه‌گیری شده در برگ و ریشه تحت تأثیر نوع پایه و تیمارهای تنش آهن و اثر متقابل آن دو در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). به‌طور معمول مدل رگرسیون بین سبزینه کل برگ و شاخص SPAD از یک همبستگی خطی مثبت تبعیت می‌کند. ولی باین حال محققان توصیه می‌کنند که این ارتباط برای هر آزمایشی به‌طور جداگانه مشخص شود (Campbel *et al.*, 1990). ضریب همبستگی بین این دو فراسنجه در این تحقیق ۰/۷۵ و معنی‌دار بود (شکل ۳). همچنین همبستگی بین شاخص SPAD و سبزی روی ظاهری برگ با ضریب ۰/۷۳ و همبستگی منفی نشان داد. Chunhui *et al.* (2005) روی سیب رقم رد دلشس ضریب همبستگی بین سبزینه کل برگ و شاخص SPAD را ۰/۷۱ بیان کرده است.

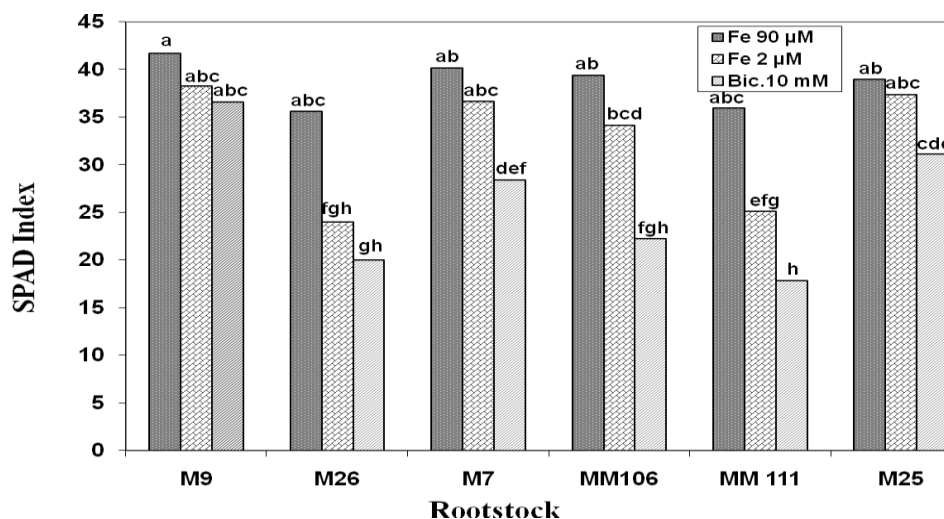
اختلاف pH توده خاک با در محیط فراریشه بسته به نوع گیاه و عامل‌های مربوط به خاک تا ۲ واحد نیز گزارش شده است (Marchner, 2012). Chouliaras *et al.* (2004) کاهش pH در *C. volkammeriana* را ۰/۸ تا ۱/۲۵ واحد گزارش کردند. با وجود فراوان بودن توانایی پایه M9 (۰/۸۶ و ۰/۷ واحد به ترتیب در تیمارهای ۲ میکرومول در لیتر آهن و تیمار بی‌کربنات) و پایه M25 (۰/۴۵ واحد) در کاهش pH در محیط فراریشه، کمی تأثیر تیمارها روی pH در محیط فراریشه، احتمال دارد به خاطر حجم زیاد زهکش نمونه‌برداری، زمان محدود نمونه‌گیری (۲ ساعت) پس از اعمال تیمار، و اختلاف روش نمونه‌گیری باشد. همچنین در محیط فراریشه به فضای محدود اطراف ریشه اطلاق می‌شود بافاصله گرفتن از این فضا از تأثیر کاهش pH کاسته می‌شود. باین حال به ازای هر واحد کاهش pH، غلظت آهن در محلول خاک ۱۰۰۰ برابر افزایش می‌یابد (Marchner, 2012). pH و پتانسیل احیاء در محیط فراریشه به‌وسیله pH محلول تا فاصله ۴-۰ میلی‌متر از سطح ریشه یا ۱۰-۵ میلی‌متر از انتهای ریشه در بستر تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Han *et al.*, 1996). تعیین pH با روش‌های دقیق‌تر مانند اندازه‌گیری pH اپوپلاست ریشه و همچنین تعیین pH دقیق در محیط فراریشه



شکل ۳. رگرسیون بین شاخص SPAD و میزان سبزینه کل برگ پایه‌های رویشی سیب
Figure 3. Regression between SPAD Index and leaf chlorophyll content of apple rootstocks

M25 در هر دو تیمار تنش کمبود آهن کمترین میزان افت سبزروی برگ را به خود اختصاص دادند. میزان سبزروی کمتر یا نبود آن در پایه‌های M9، M7 و M25 تحت تیمار ۲ میکرو مول در لیتر آهن و بی‌کربنات نشان‌دهنده تحمل بیشتر آن پایه‌ها به تنش آهن است. کمبود آهن باعث تغییر فیزیولوژیک مختلف در برگ می‌شود زیرا Fe به‌عنوان عامل کمکی (کوفاکتور) بسیاری از آنزیم‌ها عمل می‌کند (Marschner, 1995).

کمترین افت شاخص SPAD برگ در پایه M9، M7 و M25 در تیمار ۲ میکرو مول در لیتر آهن رخ داد و بیشترین افت سبزینگی مربوط به برگ پایه‌های MM111 و M26 در هر دو تیمار ۲ میکرو مول در لیتر آهن و ۱۰ میلی‌مول در لیتر بی‌کربنات و پایه MM106 در تیمار ۱۰ mM Bic بوده است (شکل ۵). سبزروی برگ در پایه‌های MM111، MM106 و M26 به ترتیب با ۴، ۴ و ۳/۶۶ بیشترین میزان و در پایه‌های M9، M7



شکل ۴. تغییر شاخص SPAD برگ تحت تأثیر نوع پایه و تیمار تنش آهن میانگین‌هایی که در هر ستون و برای هر صفت حرف‌های همسان دارند بر پایه آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معناداری با یکدیگر ندارند.

Figure 4. Leaf SPAD value variations of apple rootstocks at Fe stress conditions
Same letter were not significantly different using Duncan's multiple range test at $P \leq 0.05$

نظر فیزیولوژیک غیرفعال است و در ارزیابی خطا ایجاد می‌کند (Prado & Alcantara, 2011) و در برخی موارد غلظت آهن در برگ‌های سبزی و سبز یکسان یا بیشتر باشد (Chouliaras, 2004) این مسئله پارادوکس سبزی آهن نامیده می‌شود (Iron chlorosis paradox) ولی در این آزمایش سبزی و شاخص SPAD با Fe برگ همبستگی خطی معنی‌دار داشتند و ضریب همبستگی آن‌ها به ترتیب برابر با ۰/۶۷ و ۰/۵۹ بود.

به‌طورمعمول پارادوکس سبزی آهن در آزمایش‌های صحرایی رخ می‌دهد (Morales, 1998; Lucena, 2000). Fe ریشه در پایه‌های M7, M9 و M25 در تیمار ۲ میکرو مول در لیتر آهن و بی‌کربنات ۱۰ میلی مول در لیتر به یک نسبت کاهش داشت اما در سه پایه دیگر میزان کاهش در تیمار ۲ میکرو مول در لیتر آهن بیشتر از تیمار بی‌کربنات ۱۰ میلی مول در لیتر بود. این روند نشان می‌دهد که انتقال Fe از ریشه به برگ در این سه پایه (متحمل) در حضور بی‌کربنات با کاهش شدید روبه‌رو نبود و برعکس در پایه‌های M26, MM111, MM106 و تیمار بی‌کربنات ۱۰ میلی مول در لیتر تجمع Fe در ریشه رخ داده و انتقال آن به برگ دچار اختلال شده است زیرا افزایش pH اپوپلاست توسط بی‌کربنات، باعث بی‌تحرك آهن و کاهش انتقال Fe به برگ شده است (Mengel, 1994).

شاخص‌های رشد

هرچه نسبت وزن خشک ریشه به وزن خشک شاخه بیشتر باشد (جدول ۳) مؤید زیست‌توده بیشتر، و در نتیجه تخصیص بیشتر Fe به آن نژادگان است، این شاخص رابطه معکوس با سبزی برگ دارد (Pestana, 2005). بررسی این صفت نشان می‌دهد که پایه‌های M9, M7 و در هر دو تیمار تنش آهن، و M25 در تیمار ۲ میکرو مول در لیتر آهن افت کمتری از سه پایه دیگر نشان دادند، همچنین تیمار بی‌کربنات ۱۰ میلی مول در لیتر. تأثیر محسوس‌تری روی کاهش این شاخص در پایه‌های M26, MM106 و MM111 داشت.

نشانه‌های ظاهری کمبود Fe را سبزی آهن می‌نامند، که به خاطر کاهش سبزینه برگ است (Iturbe-Ormaeche et al., 1995; Ranieri et al., 2001; Gogorcena et al., 2004). کاهش سبزینه کل و شاخص SPAD در همه پایه‌ها در تیمارهای تنش آهن دیده شد، اما این شاخص‌ها در پایه‌های M26, MM106 و MM111 و به‌ویژه در تیمار بی‌کربنات بیشتر تحت تأثیر قرار گرفت. چنین کاهش در میزان سبزینه برگ توصیفی برای نقش Fe در تشکیل *d-aminolevulinic acid* و *protochlorophyllide* پیش‌ماده‌های زیست‌ساخت (بیوسنتز) سبزینه (Marschner, 1995) است.

میران آهن برگ و ریشه

نشانه‌های ظاهری کمبود آهن، با کاهش غلظت Fe برگ در تیمار بی‌کربنات مشهود بود (جدول ۳). میران Fe برگ در همه پایه‌ها و تحت تأثیر تیمارهای تنش، کاهش یافت، این کاهش در پایه‌های M9 و M7 و در تیمار ۲ میکرو مول در لیتر آهن شدیدتر بود زیرا گیاه از Fe جذب‌شده برای حفظ سبزینه و افزایش زیست‌توده خود استفاده کرده است. در تیمار بی‌کربنات غلظت Fe برگ در پایه‌های M26, MM106 و MM111 بیشتر از تیمار ۲ میکرو مول در لیتر آهن تحت تأثیر قرار گرفت زیرا افزون بر جذب، انتقال آهن نیز دچار اختلال شده است. درحالی‌که در ریشه این سه پایه، Fe بیشتری نسبت به تیمار ۲ میکرو مول در لیتر آهن تجمع پیدا کرده بود، Kosegarten & Koyro (2001) نشان دادند، در نتیجه کمبود آهن ناشی از حضور بی‌کربنات، میران زیادی Fe در اپوپلاست یاخته‌های روپوستی (اپیدرمی) ریشه تجمع می‌یابد احتمال دارد به خاطر pH بالای اپوپلاست، انتقال Fe به سوی اندام‌های هوایی محدود شود همچنین این افزایش pH، قابلیت استفاده از Fe را در بافت برگ کاهش می‌دهد (Mengel, 1994).

اندازه‌گیری Fe کل برگ به‌طورمعمول معیار خوبی برای ارزیابی وضعیت آهن گیاه نیست زیرا آهن کل برگ ممکن است با رسوب در اپوپلاست برگ، که از

جدول ۳. مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده در پایه‌های مختلف سیب تحت تیمارهای مختلف آهن

Table 3. Mean comparisons of measured traits of apple rootstocks at Fe stress conditions

Rootstock	Fe treatment	Root Fe (mg/kg)	Leaf Fe (mg/kg)	Root Hair Swelling (0-10)	Root /Shoot Dry Weight	Leaf chlorosis (0-5)
M9	90 μ mol/l Fe-EDTA	415 a	131 a	2.00 d	1.1 a	0.00 e
	2 μ mol/l Fe-EDTA	286 g	98 bc	5.00 bc	0.95 bc	0.00 e
	10 mmol/l NaHCO ₃	211 j	82 c-g	6.33 ab	0.93 bc	0.33 e
M26	90 μ mol/l Fe-EDTA	385 b	92 b-e	2.33 d	1.06 ab	0.00 e
	2 μ mol/l Fe-EDTA	233 hij	62 gh	2.67d	0.90 cde	3.33 ab
	10 mmol/l NaHCO ₃	312 ef	56 h	2.33 d	0.73 f	3.67 a
M7	90 μ mol/l Fe-EDTA	319 de	107 b-f	2.67d	1.06 ab	0.00 e
	2 μ mol/l Fe-EDTA	276 g	89 d-h	7.67 a	1.18 a	0.67 de
	10 mmol/l NaHCO ₃	215 ij	95 bcd	7.33 a	0.90 cde	1.67 c
MM106	90 μ mol/l Fe-EDTA	336 bc	86 b-f	2.33 d	0.92 cd	0.00 e
	2 μ mol/l Fe-EDTA	249 h	72 d-h	6.33ab	0.90 cdef	3.33 ab
	10 mmol/l NaHCO ₃	278 g	70 e-h	6.00 ab	0.76 ef	4.00 a
MM 111	90 μ mol/l Fe-EDTA	378 b	98 bc	2.33 d	1.07 ab	0.00 e
	2 μ mol/l Fe-EDTA	236 hi	74 d-h	3.00 d	0.84 cdef	3.33 ab
	10 mmol/l NaHCO ₃	294 fg	52 h	3.67 cd	0.77 ef	4.00 a
M25	90 μ mol/l Fe-EDTA	352 c	80 c-g	2.33 d	1.20 a	0.00 e
	2 μ mol/l Fe-EDTA	252 h	74 d-h	6.00 ab	0.94 bc	1.33 cd
	10 mmol/l NaHCO ₃	180 k	60 gh	6.67 ab	0.78 def	2.67 b

میانگین‌هایی که در هر ستون و برای هر صفت حرف‌های همسان دارند بر پایه آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معناداری با یکدیگر ندارند. Same letter were not significantly different, using Duncan's multiple range test at $P \leq 0.05$.

نتیجه‌گیری

مقاومت به سبزی آهن یک معیار انتخاب مهم، برای گزینش پایه‌های درختان میوه در شرایط ایران (آهک بالا) است. روش‌های رایج در تعیین تحمل یا حساسیت پایه‌ها به تنش آهن، ارزیابی یکسان و قابل‌اعتمادی را برای گزینش پایه‌های متحمل به سبزی آهن فراهم نمی‌سازند. در این آزمایش از مقایسه میانگین‌های تأثیر سطح آهن برگ در تیمار ۲ میکرو مول در لیتر آهن و ۱۰ میلی مول در لیتر بی‌کربنات در همه پایه‌ها ملاحظه می‌شود که مقادیر آهن کل برگ آن‌ها کمتر از تیمار شاهد است از سوی دیگر وجود همبستگی معنی‌دار بین میزان آهن کل برگ با نشانه‌های ظاهری سبزی برگ و شاخص SPAD (به ترتیب با ضرایب -0.67 و 0.54) نشان می‌دهد که مسئله پارادوکس آهن (بالا تر بودن میزان آهن برگ در گیاهان با نشانه‌های سبزی نسبت به گیاهان سالم) مطرح نیست و پایه‌های M9، M7 و M25 در شرایط کمبود آهن یا افزایش pH محلول غذایی، یا سبزی نشان نداده‌اند و یا افت سبزی کمتری را نسبت به شاهد داشته‌اند بنابراین شاخص spad بالاتری داشته‌اند و پایه‌های MM111، M26 و MM106 بیشترین افت سبزی، به‌ویژه در تیمار

در این آزمایش میزان متورم شدن انتهای ریشه‌های موئن (جدول ۳) نشان داد که بیشترین ریشه‌های متورم مربوط به پایه M7 در هر دو تیمار ۲ میکرو مول در لیتر آهن و بی‌کربنات ۱۰ میلی مول در لیتر (به ترتیب $7/67$ و $7/33$) و پس از آن پایه‌های M9 و M25 در تیمار بی‌کربنات ۱۰ میلی مول در لیتر و کمترین مقادیر تورم ریشه در تیمار شاهد همه پایه‌ها و در پایه‌های M26 و MM111 بوده است. یکی از واکنش‌های گیاهان استراتژی I به کمبود آهن تغییرپذیری ریخت‌شناختی است این تغییرپذیری‌ها باعث می‌شود که آب و مواد غذایی از محیط ریشه با افزایش سطح ریشه بیشتر جذب شوند (Tanimoto *et al.*, 1995; Masucci & Schiefelbein, 1994). معمول شامل تقسیم یاخته‌ای اضافی در یاخته‌های ریزودرمی، تسریع تشکیل ریشه‌های موئن و ریشه‌های کوتاه جانبی با انتهای متورم است و به طبع چنین واکنشی در نژادگان‌های متحمل به سبزی رخ می‌دهد (Socias *et al.*, 1995). ازدیاد قطر ریشه در اثر بزرگ شدن یاخته‌های کورتکس و تقسیم در ریزودرم و هیپودرم است که منجر به افزایش شمار یاخته‌ها در این لایه می‌شود (Romheld & Marschner, 1981; Landsberg, 1996).

به سبزی آهن هستند به شمار آید. پاسخ زود هنگام گیاه (فعالیت FCR) در چند هفته اولیه این امکان را فراهم می‌سازد نژادگان‌های متحمل را از نژادگان‌های حساس با دقت بیشتری از روش‌های رایج که زمان بیشتری را می‌طلبد جداسازی کرد. بر پایه یافته‌های این تحقیق پایه‌های M7، M9 و M25 به‌عنوان پایه‌های متحمل و پایه‌های MM106، MM111 و M26 در گروه پایه‌های حساس قرار می‌گیرند. با توجه نقش بسیار مهم آنزیم فریک کیلیت ردوکتاز در تنظیم فرآیند جذب و انتقال آهن در گیاه و با توجه به اینکه بر پایه اطلاعات موجود در ایران تحقیقی در این زمینه روی درختان میوه صورت نگرفته است توصیه می‌شود تحقیقات بیشتری روی ابعاد مختلف فعالیت این آنزیم در درختان میوه صورت گیرد، به‌ویژه پایه‌های جدید درختان میوه که درون کشور اصلاح می‌شوند و یا از خارج از کشور وارد می‌شوند از نظر فعالیت این آنزیم آزمایش شوند.

بیکربنات سدیم را داشته‌اند از سوی دیگر در واکنش به اعمال تیمارها، پایه‌های M7، M9 و M25 و به‌ویژه پایه M9، و در تیمار ۲ میکرو مول در لیتر آهن، افزایش فعالیت FCR، کاهش محسوس pH در محیط فراریشه همچنین تورم بیشتر انتهای ریشه‌های مویین، یعنی سه نشانه مثبتی که یک پایه یا نژادگان در واکنش به کمبود آهن از خود بروز می‌دهند را داشته و در مقابل سه پایه M26، MM111 و MM106 چنین نشانه‌هایی را نشان نداده‌اند. با توجه به اینکه افزایش فعالیت FCR ریشه در پاسخ به تنش کمبود آهن در گیاهان چوبی امری قطعی است، همچنین احیاء Fe(III) به Fe(II) در گیاهان استراتژی I توسط FCR یک مرحله الزامی در جذب Fe توسط گیاه است بنابراین از نقطه نظر کاربردی اندازه‌گیری فعالیت FCR می‌تواند به‌عنوان روشی مناسب، با حساسیت بالا برای تشخیص‌های اولیه و غربالگری نژادگان‌هایی که حساس

REFERENCES

- Alcantara, E., Romera, F. J., Canete, M. & Guardia, M. D. (2000). Effects of bicarbonate and iron supply on Fe(III) reducing capacity of roots and leaf chlorosis of Fe susceptible peach rootstock 'Nemaguard'. *Journal of Plant Nutrition*, 23, 1607-1617.
- Asadi, K., Akhlaghi, A. N. & Samar, M. (2015) Chlorosis index and active iron for evaluating of citrus rootstocks resistance to soil limes. *Iranian Journal of Soil Research*, 3, 269-284.
- Campbell, R. J. Mobley, K.N. Marini, R. P. & Pfeiffer, D. G. (1990). Growing Conditions Alter the Relationship between SPAD-501 Values and Apple Leaf Chlorophyll. *HortScience*, 25(3), 330-331.
- Chouliaras, V., Dimassi, K., Therios, I., Molassiotis, A. & Diamantidis, G. (2004). Root-reducing capacity, rhizosphere acidification, peroxidase and catalase activities and nutrient levels of *Citrus taiwanica* and *C. volkameriana* seedlings, under Fe deprivation conditions. *Agronomie*, 24, 1-61.
- Chunhui, Ma., Tanabe, K., Itai, A., Tamura, F., Pil, C. J. & Teng, Y. (2005). Tolerance to lime-induced of Asian pear rootstocks (*Pyrus* spp.) *Journal of Japan Society for Horticultural Science*, 74(6), 419-423.
- Crowley, D. E., Wang, Y. C., Reid, C. P. & Szanislo, P. J. (1991). Siderophore-iron uptake mechanisms by microorganisms and plants. *Plant Soil*, 130, 179-198.
- Donnini, S., Castagna, A., Ranieri, A. & Zocchi, G. (2009). Differential responses in pear and quince genotypes induced by Fe deficiency and bicarbonate. *Journal of Plant Physiology*, 166, 1181-1193.
- Elena, B., Gonzalez, G., Morales, F., Cistue, L., Abadia, A. & Abadia, A. (2000). Iron deficiency decreases the Fe(III)-chelate reducing activity of leaf protoplasts. *Plant Physiology*, 122, 337-344.
- Fox, T. C. & Guerinot, M. L. (1998). Molecular biology of cation transport in plants. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology*, 49, 669-696.
- Gogorcena, Y., Abadia, J. & Abadia, A. (2000). Induction of in vivo root ferric chelate reductase activity in fruit tree rootstock. *Journal of Plant Nutrition*, 23(1), 9-21.
- Gogorcena, Y., Abadia, J. & Abadia, A. (2004). A new technique for screening iron-efficient genotypes in peach rootstocks: elicitation of root ferric chelate reductase by manipulation of external iron concentrations. *Journal of Plant Nutrition*, 27, 1-15.
- Gonzalo, M. J., Moreno, M. A. & Gogorcena, Y. (2011). Physiological responses and differential gene expression in Prunus rootstocks under iron deficiency conditions. *Journal of Plant Physiology*, 168(9), 887-93.
- Han, Z. H., Wang, Q. & Chen, L. (1996). Root and Rhizosphere Responses of Iron-Efficient or -Inefficient Apple Genotypes to Solution pH. *Journal of Plant Nutrition*, 20(11), 1517-1525.

14. Hell, R. & Stephan, U.W. (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta*, 216, 541-551.
15. Jimenez, S., Pinochet, J., Abadía, A., Moreno, M. A. & Gogorcena, Y. (2008). Tolerance response to iron chlorosis of *Prunus* selections as rootstocks. *HortScience*, 43, 304-309.
16. Iturbe-Ormaeche, I., Moran, J. F., Arrese-Igor, C., Gogorcena, Y., Klucas, R. V. & Becana, M. (1995). Activated oxygen and antioxidant defenses in iron deficient pea plants. *Plant Cell Environment*, 18, 421-9.
17. Kenndy, A. T., Rowe, P. W. & Samule, T. J. (1980). The effect of apple rootstock genotypes on mineral content of Scion leaves. *Euphytica*, 29, 497-482.
18. Kosegarten, H. & Koyro, H. W. (2001). Apoplastic accumulation of iron in the epidermis of maize (*Zea mays*) roots grown in calcareous soil. *Physiology of Plant*, 113, 515-22.
19. Landsberg, E. C. (1996). Hormonal regulation of iron-stress response in sunflower roots: a morphological and cytological investigation. *Protoplasma*, 194, 69-80.
20. Lindsay, W. L. & Schwab, A. P. (1982). The chemistry of iron in soil and its availability to plant. *Journal of Plant Nutrition*, 5, 821-840.
21. Lucena, J. J. (1998). Effects of bicarbonate, nitrate and other environmental factors on iron deficiency chlorosis. A review, *Journal of Plant Nutrition*, 23, 1591-1606.
22. Marschner, H., Kirkby, E. A. & Cakmak, I. (1996). Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *Journal of Experimental Botany*, 47, 1255-1263.
23. Masucci, J. D. & Schiefelbein, J. W. (1994). The *rhd6* mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root-hair initiation through an auxin- and ethylene-associated process. *Plant Physiology*, 106, 1335-1346.
24. Marschner, P. (2012). *Mineral nutrition of higher plants*. Elsevier Ltd. pp. 978.
25. Marquard, R. D. & Tipton, J. L. (1987). Relationship between extractable chlorophyll and an in situ method to estimate leaf greenness. *Hort Science*, 22, 1327.
26. McDonald, A. S., Ericsson, T. & Larsson, C. (1996). Plant nutrition, dry matter gain and partitioning at the wholeplant level. *Journal of Experimental Botany*, 47, 1245-1253.
27. Mengel, K. (1994). Iron availability in plant tissues-iron chlorosis on calcareous soils. *Plant Soil*, 165, 275-283.
28. Mirabdolbaghi, M. (2007). Study the effect of lime on decreasing leaf nutrient and lime-induced chlorosis on apple clonal rootstocks. *Final Report. Horticultural Science Dep.* (in Farsi)
29. Mohammadi, S. Baninasab, B., Khoshgoftarmanesh, A., & Gasemi, A. (2014). Responses of clonal quince rootstocks to Iron. In: Proceedings of 8th Iranian Horticultural Science, 26-29 Aug, Bu Ali University, Hamedan, Iran, pp. 245-252. (in Farsi)
30. Molassiotis, A., Georgia, T., Grigorios, D., Patakas, A. & Therios, I. (2006). Effects of 4-month Fe deficiency exposure on Fe reduction mechanism, photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and antioxidant defense in two peach rootstocks differing in Fe deficiency tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 163, 176-185.
31. Morales, F., Grasa, R., Abadia, A. & Abadia, J. (1998). Iron chlorosis paradox in fruit trees. *Journal of Plant Nutrition*, 21, 815-825.
32. Moog, P. R. & Bruggemann, W. (1994). Iron reductase systems on the plasma membrane – a review. *Plant Soil*, 165, 241-60.
33. Nye, P. H. & Tinker, P. B. (1977). *Solute movement in the soil-root system*. Blackell, oxford, UK.
34. Pestana, M., Varennes, A., Abad, J. & Faria, E. (2005). Differential tolerance to iron deficiency of citrus rootstocks grown in nutrient solution. *Scientia Horticulturae*, 104, 25-36.
35. Prado, R. M. & Alcantara, E. (2011). Tolerance to iron chlorosis in non-grafted quince seedlings and in pear grafted on to quince plants. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 11(4), 119-128.
36. Ranieri, A., Castagna, A., Baldan, B. & Soldatini, G. F. (2001). Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower. *Journal of Experimental Botany*, 52, 25-35.
37. Robertson, G. A. & Loughman, B. C. (1974). Response to boron deficiency: a comparison with responses produced by chemical methods of retarding root elongation. *New Phytologist*, 73, 821-832.
38. Rombola, A. D., Bruggemann, W., Lopez-Millan, A. F., Tagliavini, M., Abadia, J., Marangoni, B. & Moog, P. R. (2002). Biochemical responses to iron deficiency in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Tree Physiology*, 22, 869-875.
39. Rombola, A. D., Bruggemann, W., Lopez, A. F., Tagliavini, M., Abadia, J., Marangoni, B. & Moog, P. R. (2002). Biochemical responses to iron deficiency in kiwifruit (*Actinidiadeliciosa*). *Tree Physiology*, 22, 869-875.
40. Romera, F. J., Alcantara, E. & Guardia, M. D. (1991). Characterization of the tolerance to iron chlorosis in different peach rootstocks grown in nutrient solution. II. Iron stress response mechanisms. *Plant Soil*, 130, 120-124.

41. Romheld, V. (2000). The chlorosis paradox: Fe inactivation as a secondary event in chlorotic leaves of grapevine. *Journal of Plant Nutrition*, 23, 1629-43.
42. Romheld, V. & Marschner, H. (1986). Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. *Advance in Plant Nutrition*, 2, 155-204.
43. Romheld, V. & Marschner, H. (1981). Iron-deficiency-stress induced morphological and physiological changes in root tips of sunflower. *Physiologia Plantarum*, 53, 354-360.
44. Schenkeveld, W.C. (2010) *Iron fertilization with FeEDDHA The fate and effectiveness of FeEDDHA chelates in soil-plant systems*. Ph.D. Thesis, Wageningen University.
45. Schmidt, W. (2003). Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *Trends Plant Science*, 8, 188-93.
46. Snell, F. D., Snell, C. T. & Snell, C. A. (1959). *Colorometric methods of analysis*. V. 2A. Van Nostrand.
47. Susin, S., Abadia, A., Antonio, G. R., Lucena, J. J. & Abadia, J. (1996). The pH requirement for in Vivo Activity of the Iron-Deficiency-Induced "Turbo" Ferric Chelate Reductase. *Plant Physiology*, 11, 1-123.
48. Socias, I., Company, R., Aparisi, G. & Felipe, A. J. (1995). *A genetical approach to iron chlorosis in deciduous fruit trees. Iron Nutrition in Soils and Plants*. (pp. 167-174) Kluwer Academic Publishers. Netherland.
49. Tanimoto, M., Roberts, K. & Dolan, L. (1995). Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 8, 943-948.
50. Tagliavini, M. & Rombolà, A. D. (2001). Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems. *European. Journal of Agronomy*, 15, 71-92.
51. Tagliavini, M., Rombola, A. D. & Marangoni, B. (1995). Response to iron-deficiency stress of pear and quince genotypes. *Journal of Plant Nutrition*, 18(11), 2465-2482.
52. Thomas, E., Marler, R. C. & Andrea, L. B. (2002). Iron Deficiency Induced Changes in Iron Reductase Activity in Papaya Roots. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*, 127(2), 184-187.
53. Yadava, U. L. (1986). A rapid nondestructive method to determine chlorophyll in intact leaves. *HortScience*, 21, 1449-1450.
54. Yi, Y. & Guerinot, M. L. (1996) Genetic evidence that induction of root Fe(III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. *Plant Journal*, 10(5), 835-44.
55. Viti, R. & Cinelli, F. (1993). Lime-induced chlorosis in quince rootstocks: methodological and physiological aspects. *Journal of Plant Nutrition*, 16(4), 631-641.
56. Vizzotto, G., Matosevic, I., Pinton, R., Varanini, Z. & Costa, G. (1997). Iron deficiency responses in roots of kiwi. *Journal of Plant Nutrition*, 20, 327-334.
57. Wei, L. C., Loeppert, R. H. & Ocumpaugh, W. R. (1997). Fe-deficiency stress response in Fe-deficiency resistant and susceptible subtterranean clover: importance of induced H⁺ release. *Journal of Experimental Botany*, 48, 239-246.
58. Welch, R. M., Norvell, W. A., Schaefer, S. C., Shaff, J. E. & Kochian, L. V. (1993). Induction of iron (III) and copper(II) reduction in pea (*Pisum sativum* L.) roots by Fe and Cu status: Does the root-cell plasmalemma Fe(III)-chelate reductase perform a general role in regulating cation uptake? *Planta*, 190, 555-61.
59. Zhang, L., Zhai, H. & Zhang, X. J. (2002) Screening of Fe-efficient Apple Rootstock Genotypes. *Journal of Plant Nutrition*, 17(4), 579-592.