تاثیر سیستم فتومیکس تروفیک بر خصوصیات فیزیولوژیکی و آناتومیکی گیاهچه های کشت بافتی گردوی ایرانی

امین حسن خواه (١)، کورش وحدتی (٢)، محمود لطفی (٣)، مسعود میرمعصومی (٤)، محمد اکبری (١)، حمید صباغی (١)، عطا دژآهنگ (١)

١- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه تهران، ٢- دانشیار دانشگاه تهران، ٣- استاد یار دانشگاه تهران، ٤- مربی دانشگاه تهران

از خصوصیات گیاهان کشت بافتی، عدم توانایی فتوسنتز کافی و برخی اختلالات فیزیولوژیکی و آناتومیکی است. مهمترین دلیل عدم تهویه و کافی نبودن میزان CO_2 و همچنین وجود منبع کربن مصنوعی در محیط کشت است. تعداد کم، بزرگ و باز بودن روزنه ها و همچنین میزان پایین کلروفیل در برگ های گیاهچه ها از مهمترین این ناهنجاری ها هستند. در این آزمایش ریزنمونه های یکسانی از رقم گردوی هارتلی در دو نوع ظرف، بدون تهویه و با تهویه ی غیر فعال (درهای فیلتردار) همراه با چهار سطح ساکارز (٠، ١٥ ، ٣٠ و ٤٥ g/L) بررسی شد. بهترین رشد در گیاهچه های کشت شده در ظروف تهویه دار و ٣٠ گرم در لیتر ساکارز، مشاهده شد. میزان کلرفیل نیز در گیاهچه های کشت شده در سیستم فتومیکس تروفیک (ظروف با تهویه توسط فیلتر) بیشتر بود. سطوح مختلف ساکارز بر روی میزان کلروفیل تاثیر معنی داری نداشت. روزنه ها در گیاهچه های کشت شده در شرایط بدون تهویه، کاملا باز بودند در حالی که در گیاهچه های کشت شده در شرایط با تهویه ی طبیعی، تقریبا بسته و به شرایط طبیعی نزدیکتر بودند. برش عرضی ساقه نشان داد که آوندها و کرک های روی ساقه در گیاهچه های رشد یافته در سیستم فتومیکس تروفیک طبیعی و بزرگتر بودند. به طور کلی گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط با تهویه و ١٥ گرم در لیتر ساکارز با وجود ارتفاع کمتر از شادابی بیشتری برخوردار بودند و کمترین ناهنجاریهای آناتومی و فیزیولوژیکی را داشتند.

کلمات کلیدی: کشت بافت، فتواتوتروفیک، سازگاری، ساکارز،ظروف فیلتردار

مقدمه:

گیاهچه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای میزان کمی کلروفیل و آنزیم‌های فتوسنتز کننده دارند (Hdider and Desjardins, 1994). کلروپلاست‌ها در اثر نور تحریک می‌شود اما در سطوح پایین کلروفیل انتقال الکترون کم شده و در نتیجه جذب الکترون کاهش می‌یابد. از طرف دیگر فعالیت فتوسنتزی با غلظت کم CO_2 ظروف کشت در طول فتوپریود و افزودن منبع قند خارجی محدود می‌شود (Kubota, 2002). Sivanesan و همکاران (٢٠٠٨) اضهار داشت که کم بودن محتوای کلروفیل برگ، با کم شدن میزان جذب نور، موجب کاهش فتوسنتز می‌شود. با برقراری گیاهچه‌هایی با محتوای کلروفیل بیشتر شانس بقا و رشد و توسعه بیشتر در مرحله سازگاری به واسطه توانایی فتوسنتز بیشتر دارند. با برقراری تهویه بر محتوای کلروفیل برگ گیاهچه‌ها افزوده می‌شود. روزنه‌های گیاهچه‌ی رشد یافته در شرایط با تهویه در طول مدت روشنایی باز و در مدت تاریکی بسته می‌شوند، در حالی که روزنه‌ی گیاهچه‌های مرسوم در طول هر دو دوره‌ی روشنایی و تاریکی باز می‌مانند (Olmos and Hellin, 1998). معمولا برگ‌ها در کشت یافت مرسوم دارای مزوفیل غیر طبیعی با فضای سلولی بزرگ و تعداد روزنه‌ی کمتر با عملکرد بسیار ناقص هستند (Van and Debergh, 1996 ; Hazarika, 2006 Huylenbroeck). Zobayed و همکاران (b ٢٠٠١) بیان کردند که برگ‌های گل کلم و توتون رشد یافته در شرایط فتواتوتروفیک به خوبی توسعه‌ی بهتری داشته و دارای مزوفیل طبیعی و با فضای بین سلولی مناسب نسبت به گیاهچه های رشد یافته در ظروف کشت بسته بودند.

مواد و روش‌ها:

جوانه‌ی انتهایی گردوی (رقم چندلر) با اندازه های یکسانی به عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند. این ریزنمونه‌ها در ظروف کشت حاوی ۸۰ml محیط کشت DKW همراه با ۲.۲gr/lit فیتاژل کشت شدند و در چهار سطح ساکارز (۰ ، ۱۵، ۳۰ و ٤٥ g/lit) و دو سطح تهویه (بدون تهویه و تهویه طبیعی) ، در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی مورد آزمون قرار گرفتند. در این آزمایش تاثیر تهویه و میزان ساکارز بر روی شاخص‌ها فیزیولوژی و آناتومی مختلفی از جمله میزان کلرفیل، روزنه‌های برگ و آوندهای ساقه مورد بررسی قرار گرفت. روزنه‌ها از سطح زیرین برگ برگ پنجم از پایین توسط لاک جدا شده و با استفاده از ماده لوگول رنگ‌آمیزی و زیر میکروسکوپ مشاهده شدند. مشاهده آوندهای ساقه و پرزهای روی آن نیز با استفاده از برش عرضی ساقه و رنگ‌آمیزی مضاعف زیر میکروسکوپ انجام شد. برای اندازه گیری میزان کلروفیل برگ، به طور تصادفی از چهار گیاهچه از هر تیمار، یک برگ (برگ پنجم از پایین) به عنوان نمونه انتخاب شد. میزان کلروفیل پس از ۲۵ روز توسط دستگاه HPLC و با استفاده از فورمول زیر محاسبه شد.

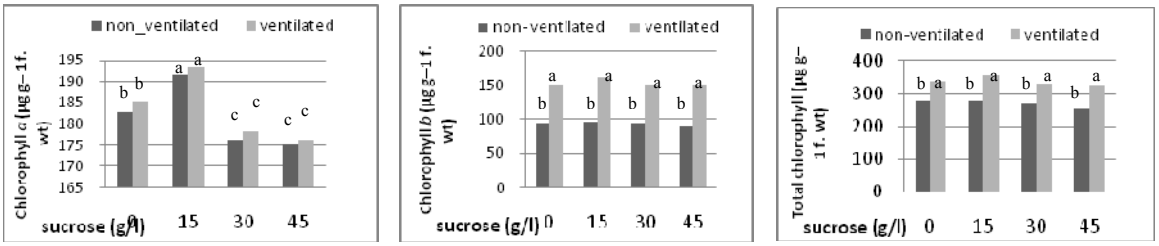
$$Mg = [۲۲/۹(D_{۶۶۴}) - ۴/۶۸(D_{۶۴۳})] \times V/۱۰۰۰ \times W$$

$$Mg = [۱۲/۲۷(D_{۶۶۴}) - ۲/۶۹(D_{۶۴۵})] \times V/۱۰۰۰ \times W$$

$$Mg = [۲۰/۲(D_{۶۶۳}) - ۸/۰۲(D_{۶۴۵})] \times V/۱۰۰۰ \times W$$

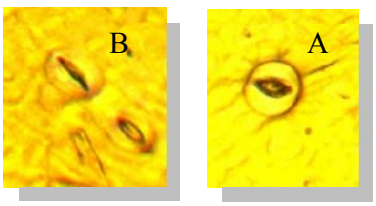
نتایج:

میزان کلرفیل : میزان کلرفیل اندازه گیری شده در تیمارهای با تهویه نسبت به تیمار بدون تهویه افزایش معنی‌داری از خود نشان دادند . این در حالی بود که استفاده از مقدار متفاوت ساکارز بر میزان کلروفیل اثر معنی‌داری نداشت. میزان کلرفیل a اندازه گیزی شده در تیمار ۱۵ گرم در لیتر ساکارز (۱۹۳/۳ µg g– 1 f. wt) بیشترین مقدار و تیمار ٤٥ گرم در لیتر ساکارز (۱۷۵/٤ µg g– 1 f. wt) کمترین مقدار را نشان داد.



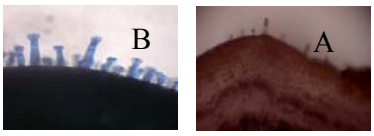
نمودار۱: میزان مختلف کلرفیل a ، b و کل (µg g– 1 f. wt) در دو نوع ظرف بون تهویه و با تهویه (توسط درب‌ها فیلتر دار)، در چهار سطح ساکارز

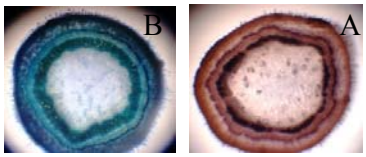
روزنه: کپی سطح برگ (شکل ۱) نشان می دهد که روزنه در گیاهچه‌های رشد یافته در ظروف با تهویه‌ی طبیعی بیضی شکل و با عرض منافذ کمتر بودند. در حالی که برگ گیاهچه‌های رشد یافته در ظروف بدون تهویه کروی شکل و با عرض منافذ بزرگتر بودند. به طور کلی روزنه در برگ گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط با تهویه به مراتب به حالت طبیعی گیاه نزدیکتر بود.



شکل ۱: A) روزنه برگ گیاهچه در ظروف بدون تهویه و ۳۰g/l ساکارز B) روزنه برگ گیاهچه در ظروف با تهویه و ۳۰g/l ساکارز

آوندها و کرک‌های روی ساقه: تصویر مشاهده شده از برش عرضی روی ساقه‌ی گیاهچه‌های رشد یافته در دو نوع ظرف با تهویه‌ی طبیعی و بدون تهویه، حاوی محیط کشت DKW همراه با ۳۰گرم در لیتر ساکارز نشان از طبیعی تر شدن ساقه گیاهان تهویه دار بود. همانطور که در شکل دو مشاهده می‌شود آوندهای این گیاهان بزرگتر و بیشتر بوده که در نتیجه آن انتقال مواد بهتر صورت می‌گیرد. با مشاهده شکل ۳ تاثیر تهویه بر شادابی و افزایش کرک هایروی ساقه نیز نشان دهنده شادابی و طبیعی‌تر شدن ساقه گیاهچه‌های تهویه دار است.





شکل ۲ : A) برش عرضی ساقه‌ی گیاهچه در محیط بدون تهویه و ۳۰g/l ساکارز B) برش عرضی ساقه گیاهچه در محیط با تهویه و ۳۰g/l ساکارز

بحث:

یرای ناهنجاری‌ها فیزیولوژیکی، آناتومیکی و نیز عدم توانایی فتوسنتز گیاهچه‌ها در کشت بافت می‌توان دلایلی مثل رطوبت نسبی بالا، CO2 کم، اتیلن زیاد و وجود منبع کربن مصنوعی آورد. معمولا از ساکرز (۲۰-۳۰ گرم در لیتر) در محیط ریزازدیادی به عنوان منبع کربن مصنوعی استفاده می‌شود (Hazarika و همکاران ، ۲۰۰٤). با ایجاد تهویه می‌توان رطوبت نسبی و تجمع اتیلن را کاهش و CO2 را افزایش داد. با ایجاد تهویه و افزایش CO2 و نیز کاهش منبع کربن توانایی فتوسنتز در گیاهچه افزایش می‌یابد لذا کلروفیل به عنوان رنگدانه فتوسنتزی در بالا بردن توانایی فتوسنتز گیاهچه‌ی درون شیشه‌ای از اهمیت بالایی برخوردار است. با ایجاد تهویه میزان کلرفیل‌های a و b به دلایلی نظیر کاهش تجمع اتیلن افزایش می‌یابد (Kubota et al., 2001). از طرف دیگر با ایجاد تهویه، تبادلات گازی افزایش یافته و روزنه‌های برگ به حالت طبیعی نزدیک‌تر می‌شوند. با فعال شدن روزنه، تعرق صورت گرفته و جذب مواد افزایش می‌یابد و به دنبال آن افزایش رشد و نمو را شاهد خواهیم بود (Zobayed et al., 2005). یکی از اثرات دیگر تهویه در بهبود آوندهای ساقه می‌باشد که به دنبال آن انتقال مواد بهتر و بیشتر صورت گرفته و لذا موجب افزایش رشد می‌گردد. قابل ذکر است که به دنبال بهبود ناهنجاری‌های فیزیولوژیکی و آناتومیکی گیاهچه‌های کشت بافتی انتظار می‌رود که میزان تلفات گیاهچه‌ها در مراحل سازگاری کاهش یابد (Afreen et al., 2002).

منابع:

Afreen, F., Zobayed, S.M.S., Kozai, T., 2002. Photoautotrophic culture of Coffea arabusta somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos. Ann. Bot. 90, 11–19.

Ashraf M, azmi A, khan a and Ala A 1994 effect of water stress on total phenols, peroxidase activity and chlorophyll contect in wheat. Acta physiologiae plantarum, 16 (3), 185-1.

Kubota C, Kakizaki N, Kozai T, Kasahara K and Nemoto J 2001 Growth and net photosynthetic rate of tomato plantlets during photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation. HortSci. 36, 49- 52.

Marino, G., Berardi, G., 2004. Different sealing materials for petri dishes strongly affect shoot regeneration and development from leaf explants of quince ‘BA29’. In vitro Cell. Dev. Biol. Plant 40, 384–388.

Olmos E and Hellin E 1998 Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants. Sci. Hort. 75, 91-101.

Zobayed S M A, Afreen-Zobayed F and Kozai T 1999b Stomatal characteristics and leaf anatomy of potato plantlets cultured in vitro under photoautotrophic and photomixotrophic conditions. In vitro Cell. Dev. - Plant 35, 183-188.
Zobayed S M A, Afreen F and Kozai T 2001b Physiology of Eucalyptus plantlets cultured photoautotrophically under forced ventilation. In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant. 37, 807-813.
Zobayed, S., 2005. Ventilation in micropropagation. In: Photoautotrophic (sugarfree medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System. Springer, Netherlands, pp. 147–186.

Effect of photomixtrophic system in physiological and anatomical characteristics in Persian walnut Plantlets

Amin hassankhah[1], kurosh vahdati[2], mahmoud lotfi[3], masuod mirmasomi[4],mohammad akbari[1]
hamid sabaghy[1], ata dejahang[1]
[1]MSc student in university of Tehran, [2]associated profession in university of Tehran,
[3]assistant profession in university of Tehran

Abstract
Tissue plantlets are unable to photosynthesis in medium. Therefore sugar, vitamins and grows regulators should add to medium. Lack of ventilation and co2 and artificial carbon source is the most important reason for these problem that cause abnormal physiological characteristic. The most obvious of these physiological characteristics are low rate of a,b chlorophyll and also exist of open stomata in in vitro plantlets leafs that directly effects on photosynthesis. In these study two similar walnut (hartly cultivar) explants with and without ventilation (in filtered vessel) were cultured. Also sucrose in three level (0, 15, 30 and 45 g/lit) were examined. At list best grows were obvious in plant that were cultured in filtered vessel with 30 g/lit sucrose. And the chlorophyll rate was more in ventilated plantlets. Different levels of sucrose have no significant effect on chlorophyll contact. Images shows opening stomatal in plantlet leaves cultured in conditions without ventilation, while stomatal in plantlet leaves cultured in conditions with natural ventilation were semi open and Elliptical . In ventilated condition the vessels were more normal. In conclusion best plantlet observed for treatment of 15 g/l sucrose with ventilation that had least anatomical and physiological abnormality