Archive of SID

نشریه علمی تغذیه گیاهان باغی
دوره دوم، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۸، (ص ۲۱-۳۲)

بهینه‌سازی سیستم جوانه‌زنی آرابیدوپسیس برای مطالعات تغذیه‌ای در کشت‌های بدون خاک

محمد جواد نظری دلجو[1*]، ساندر ون دلدن[2]، لیو مارسلیز[3]

۱- دانشیار گروه علوم و مهندسی باغبانی، واحد مهاباد، دانشگاه آزاد اسلامی، مهاباد، ایران
nazarideljou@yahoo.com
۲- استادیار گروه باغبانی و فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه واخنینگن، واخنینگن، هلند
sander.vandelden@wur.nl
۳- استاد گروه باغبانی و فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه واخنینگن، واخنینگن، هلند
leo.marcelis@wur.nl

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۲۳ تاریخ پذیرش:۱۳۹۸/۰۶/۲۳

چکیده

آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) مهمترین گیاه مدل در تحقیقات تغذیه و ژنتیک گیاهی است. این آزمایش براساس اهمیت پرورش آرابیدوپسیس در سیستم‌های بدون خاک به‌منظور آزمایش‌های دقیق تغذیه‌ای و اهمیت سیستم جوانه‌زنی کارآمد و تولید گیاهچه‌های سالم، در بستر ترکیبی آگار و عناصر معدنی اجرا گردید. برهمین اساس میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری به‌طول ۱۰ میلی‌متر برش و توسط نوار چسب عریض به‌شکل وارونه به میز هود متصل و سپس با محیط کشت حاوی آگار (۰/۵۵٪) و عناصر معدنی (فرمولاسیون هوگلند) با نسبت حجمی ۱:۱ پر شدند. پس از انجماد محیط کشت، میکروتیوب‌ها به‌شکل معمولی و طبیعی برگردانیده و بذور استریل و استراتیفه شده آرابیدوپسیس در آن‌ها کشت و سپس به اتاقک رشد با شرایط محیطی کنترل شده منتقل گردیدند.

درصد جوانه‌زنی بذور، وزن تر و خشک برگ، سطح رزت و گیاهچه‌های سالم و قابل انتقال (۲۱۰ گیاهچه) طی سه هفته اول مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش بیانگر کارایی سیستم طراحی شده به‌منظور جوانه‌زنی بذور آرابیدوپسیس برای کشت‌های بدون خاک بود. درصد جوانه‌زنی بذور کشت شده بیش از ۹۷/۵٪ بود. بیش از ۸۵٪ گیاهچه‌های تولیدی سالم، دارای رشد مناسب و یکنواخت، به‌ویژه دارای ریشه‌های سالم و قابل بررسی در مطالعات بیولوژی ریشه و قابل انتقال به محیط کشت اصلی بودند. نشاهای تولید شده در این سیستم در هفته سوم و در مرحله ۸ برگی پس از کشت آماده انتقال به محیط اصلی کشت بودند. براساس نتایج آزمایش سیستم طراحی شده در این تحقیق بدلیل کارایی بالا، کنترل دقیق محیط کشت جوانه‌زنی و رشد ریشه، جهت آزمایش‌های مربوط به جوانه‌زنی و کشت آرابیدوپسیس در سیستم بدون خاک به‌ویژه آزمایشات مرتبط با تغذیه معرفی می‌گردد

کلید واژه‌ها: آگار، بستر جوانه‌زنی، رشد گیاهچه، عناصر غذایی، گیاه مدل

-مقاله پژوهشی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) مهمترین گیاه مدل در زمینه تغذیه گیاهی، مطالعات ژنتیکی، زیست فناوری، متابولیسم و غیره است (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). در ۵۰ سال اخیر بیش از ۵٤۰۰۰ مقاله در دنیا در خصوص آرابیدوپسیس به چاپ رسیده (Provart et al., 2016) که نشان‌دهنده اهمیت و نقش این گیاه در مطالعات متعدد گیاهی است. به‌عبارتی خصوصیات منحصربه‌فرد این گیاه مانند اندازه کوچک، چرخه رشدی کوتاه، خودگشنی، دسترسی به توالی کامل ژنوم و غیره از مهمترین فاکتورهای موثر در محبوبیت و استفاده از این گیاه در تحقیقات مختلف بیولوژیکی است (Toda *et al.*, 1999; Somerville & Koornneef, 2002).

کشت آرابیدوپسیس عمدتا به دو روش خاک یا بدون خاک (آبکشت) صورت می‌پذیرد. کشت آرابیدوپسیس در بستر خاک به‌دلیل عدم کنترل دقیق غلظت و نسبت عناصر غذایی موجود در بستر، مشکلات مربوط به شوری، پی‌اچ نامناسب و غیره و در نتیجه تاثیر منفی بر رشدونمو، واکنش‌های بیوشیمیایی گیاه، و همچنین عدم امکان بررسی مورفولوژی و فیزیولوژی ریشه همواره یکی از دغدغه‌های محققان و دانشمندان علوم گیاهی است. لیکن سیستم بدون خاک یا هایدروپونیک به‌دلیل کنترل دقیق نیازهای تغذیه‌ای و بستر کشت، امکان تولید ریشه‌های سالم جهت مطالعات مرتبط با مورفولوژی و بیولوژی ریشه، رشد سریع و تولید گیاهان سالم و به‌دور از تنش و غیره مشکلات ناشی از کشت خاکی را ندارد (Toda et al., 1999; Arteca and Arteca, 2000; Smeets et al., 2008). همچنین استفاده از بستر و سیستم مناسب جوانه‌زنی و رفع تنش‌های مختلف غذایی (بیشبود و کمبود عناصر معدنی) طی دوره رشدی آرابیدوپسیس در سیستم بدون خاک نقش بسزایی در تولید گیاهچه و نشاهای سالم با توجه به بذور بسیار ریز و حساس آرابیدوپسیس و رشد کند اولیه بذور جوانه زده دارد.

عمده مطالعات انجام شده در خصوص کشت‌های بدون خاک آرابیدوپسیس معطوف به روش کشت و طراحی سیستم پس از جوانه‌زنی آرابیدوپسیس است (Toda et al., 1999; Arteca and Arteca 2000; Norén et al., 2004; Smeets et al., 2008; Conn et al., 2013; Tocquin et al., 2013). همچنین استفاده از پتری‌دیش حاوی کاغذ صافی و یا ژل آگار از دیگر موارد مطالعه شده در خصوص جوانه‌زنی آرابیدوپسیس است (دیدار و همکاران، ۱۳۹۳؛ مهدیه و محمدصالح، ۱۳۹٤؛ Boyes *et al.*, 2001). کشت بذور در پتری‌دیش به‌طور عمده برای آزمایش‌های جوانه-زنی کاربرد داشته و بذور جوانه‌زده بدلیل فضای ناکافی در پتری‌دیش کارایی و شاخص‌های لازم برای انتقال نشا به محیط اصلی را ندارند.

Hutter and Barzvi (2003) و Smeets et al. (2008) برای جوانه‌زنی آرابیدوپسیس در روش بدون خاک از بستر راک‌وول استفاده نمودند. براین اساس بذور مستقیما روی بستر کشت درون لوله‌های آزمایش یا فالکون جوانه زده و رشد نمودند. لیکن عیب این روش چسبیدن ریشه‌ها به بستر راک‌وول و در نتیجه عدم امکان جداسازی ریشه سالم و تمامی ریشه‌ها به ویژه در مراحل اولیه رشد و قبل از انتقال نشا بود. ضمن اینکه بستر راک‌وول کاملا خنثی نبوده و ممکن است طی مراحل اولیه رشد گیاهچه‌ها به‌ویژه در مطالعات تغذیه‌ای روشی چالشی باشد. همچنین Schlesier et al., (2003) از توری جهت جوانه‌زنی در محیط‌های کاملا استریل بهره‌برده که مشکل این سیستم نیز فضای

www.SID.ir

Archive of SID

ناکافی جهت رشد و اتصال ریشه‌ها بهم و عدم امکان رشد تکی گیاهچه‌ها در سیستم مذکور بود. شایان ذکر است علاوه بر کشت بذور آرابیدوپسیس در آگار در مواردی هم در بسترهای آلی، معدنی و آمیخته‌های آلی و معدنی مانند کوکوپیت، فیبرنارگیل، پرلایت و راک‌وول استفاده می‌شود. لیکن در صورت استفاده از بسترهای آلی بدلیل رهاسازی برخی عناصر معدنی امکان آزمایشات دقیق مربوط به عناصر غذایی با چالش مواجه بوده، به‌علاوه چسبندگی ریشه به بستر و مشکلات ناشی از آن از دیگر محدودیت-های این سیستم جوانه‌زنی و انتقال نشا می‌باشد. با توجه به مطالب مذکور و تحقیقات اندک در خصوص روش و سیستم جوانه‌زنی بذور آرابیدوپسیس در بستر آگار، مهمترین هدف این آزمایش طراحی و بهینه‌سازی سیستم جوانه‌زنی آرابیدوپسیس بر پایه بستر آگار و عناصر غذایی جهت مطالعات تغذیه‌ای دقیق در سیستم آبکشت است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این آزمایش در گروه گروه باغبانی و فیزیولوژی گیاهی دانشگاه واخنینگن هلند انجام گرفت. بذور آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) اکوتیپ کلمبیا (Col-0) (تهیه شده از گروه ژنتیک دانشگاه واخنینگن) به مدت ۵ دقیقه با اتانول ۷۰٪ استریل و سپس سه مرتبه با آب مقطر استریل در زیر هود شستشو گردید. به‌منظور جوانه‌زنی یکنواخت بذور استریل شده در پتری دیش حاوی کاغذ صافی مرطوب به مدت سه روز در دمای ٤ درجه سلسیوس قرار داده شدند (Boyes *et al.*, 2001).

آماده سازی محیط کشت جوانه‌زنی

میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری پروپیلن (Sarstedt®, REF 72.698.200) به طول یک سانتیمتر برش و سپس با محیط کشت جوانه‌زنی شامل ترکیب آگار (۰/۵۵٪، Daishing agar) و عناصر معدنی براساس فرمولاسیون استاندارد هوگلند و آرنون (۱۹۵۰) با نسبت ۱:۱ پر گردید (جدول ۱). براساس نتایج مطالعات متعدد انجام شده، محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (۱۹٦۲) متداول‌ترین محیط کشت مورد استفاده در تحقیقات البته برای جوانه‌زنی آرابیدوپسیس در پتری‌دیش است. لیکن به‌دلیل غلظت بالای عناصر غذایی معدنی پرمصرف این فرمولاسیون، هدایت الکتریکی محلول غذایی آن بالا بوده (۸/٦ دسی-زیمنس‌برمتر) و به‌همین دلیل از فرمولاسیون استاندارد هوگلند با هدایت‌الکتریکی برابر ۲/۱ دسی‌زیمنس‌برمتر استفاده شد (Tocquin et al., 2003; Siedlecka and Krupa, 2005; Smeets, et al., 2008). تنها نکته قابل توجه در استفاده از فرمولاسیون هوگلند عدم تشکیل فاز جامد محیط کشت پس از اتوکلاو نمودن ترکیب همزمان آگار و عناصر غذایی بود. برهمین اساس استریل محلول آگار و محلول عناصر غذایی جداگانه و به‌ترتیب با اتوکلاو (دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار psi۱۵) و سرنگ‌های فیلتردار انجام پذیرفت. برهمین اساس و به‌دلیل استریل نمودن جداگانه آگار و عناصر غذایی غلظت‌های اولیه آگار و عناصر معدنی دو برابر غلظت استاندارد در نظر گرفته شد تا پس از فیلتراسیون و اتوکلاو نمودن و ترکیب آن‌ها با نسبت ۱:۱، غلظت اصلی و استاندارد نهایی یعنی غلظت ۰/۵۵٪ آگار و هدایت الکتریکی برابر ۲/۱ دسی‌زیمنس-برمتر حاصل گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. فرمولاسیون هوگلند و آرنون (۱۹۵۰) مورد استفاده در محیط کشت جوانه‌زنی آرابیدوپسیس

Table 1. Hoagland and Arnon (1950) nutrient recipe used for Arabidopsis germination medium

غلظت عناصر Concentration (mM)	منابع کودی Mineral source	
1	NH4H2PO4	**عناصر پرمصرف**
6	KNO3	
4	Ca(NO3)2*4H2O	Macro nutrients
2	MgSO4*7H2O	(mM)
46.25	H3BO3	
9.14	$MnCl_2•4H_20$	**عناصر کم مصرف**
0.76	ZnSO4 * 7 H2O	Micro nutrients
0.32	CuSO4 * 5 H2O	
0.1111	Na2MoO4 * 2H2O	(µM)
40	NaFe(III)EDTA	
2.1	EC (dS/m)	**شاخص شوری محلول غذایی**
5.6	pH	**پی اچ نهایی محلول غذایی**

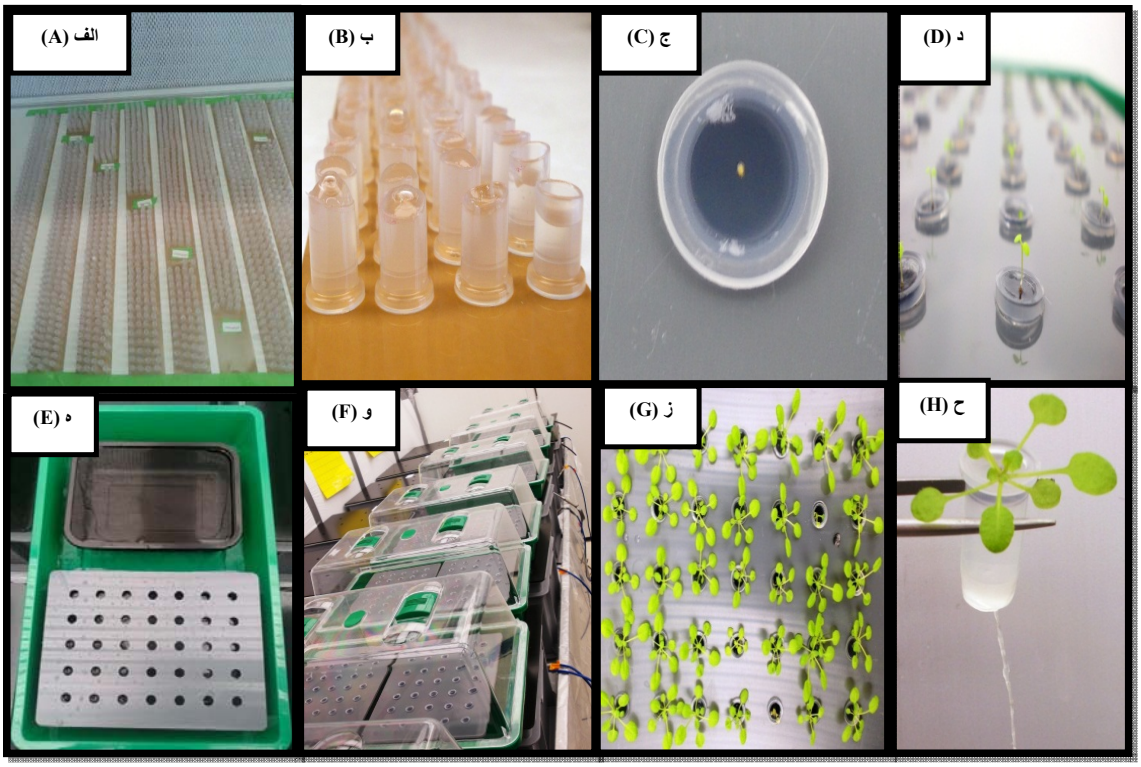
کشت بذور و انتقال به اتاقک رشد

جهت پرنمودن میکروتیوب‌ها ابتدا نوار چسب عریض بر روی میز کار هود قرار گرفته و سپس مطابق شکل دو انتهای نوار چسب به میز متصل و تثبیت گردید (شکل ۱- الف). در مرحله بعدی میکروتیوب‌های برش خورده به‌شکل وارونه بر روی نوار چسب مستقر و سپس یک میلی‌لیتر از محیط کشت تهیه شده با استفاده از سمپلر به‌درون آن‌ها منتقل گردید (شکل ۱- ب). پس از سپری شدن مدت زمانی کوتاه و تغییر فاز محیط کشت از مایع به جامد، میکروتیوب‌های حاوی محیط کشت از چسب جدا و به‌درون سینی‌های تعبیه شده جهت انتقال بذر و جوانه زنی منتقل گردیدند. سینی‌های پروپیلنی نگهدارنده میکروتیوب با ابعاد ۱۵ x ۲۵ سانتی‌متر برش و جهت نگهداری میکروتیوب‌ها سوراخ‌هایی با ابعاد قطر بیرونی میکروتیوب و به تعداد ۳۵ عدد در هر سینی ایجاد گردید. در ادامه یک عدد بذر سرمادهی شده (استراتیفه) در درون هر میکروتیوب کشت و سپس سینی‌های حاوی میکروتیوب بر روی ظروف یک لیتری حاوی محلول استاندارد هوگلند جهت رشد ریشه قرار گرفت (شکل ۱- ج، د، ه). در پایان سینی‌های حاوی بذور کشت شده آرابیدوپسیس به اتاقک‌های شفاف و محفوظ (جهت نگهداری رطوبت) منتقل (شکل ۱- و) و سپس به اتاقک کشت جهت جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها منتقل گردید.

.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- سیستم جوانه‌زنی بذور آرابیدوپسیس در محیط آگار جهت مطالعات در سیستم بدون خاک یا آبکشت. میکروتیوب‌های برش خورده حاوی آگار (الف، ب)؛ بذر کشت شده درون میکروتیوب بر روی محیط آگار (ج)؛ بذور جوانه زده آرابیدوپسیس (د)؛ سینی نگهدارنده میکروتیوب و ظرف حاوی محلول غذایی (ه)؛ گلخانه یا محفظه‌های کوچک شفاف جهت حفظ رطوبت و جوانه‌زنی اولیه بذور آرابیدوپسیس (و)؛ سینی کشت حاوی بذور جوانه زده (ز) و گیاهچه ۱۴ روزه آرابیدوپسیس با ریشه‌های خارج شده از میکروتیوب (ح).

Figure 1. Agar-nutrient Arabidopsis germination system for soilless studies. Cut end micro-tubes containing agar (A, B); cultivated seeds on agar medium (C); germinated seeds (D); seed and nutrient solution holder (E); transparent seed germination greenhouse (F); seed tray with germinated seeds (G) and 14 days old Arabidopsis plants (H).

سازگاری بذور جوانه‌زده و گیاهچه‌ها با محیط رشد

جهت سازگاری اولیه گیاهچه‌ها با شرایط محیطی اتاقک رشد دریچه‌های بالایی هر اتاقک که در شکل ۱-و با پیکان زرد رنگ مشخص گردیده به‌تدریج و طی سه روز باز و نهایتا در روز چهارم پوشش شفاف از روی گیاهچه-ها برداشته شد (شکل ۱- و، ز). لازم به ذکر است در صورت عدم وجود یا دسترسی به اتاقک‌های کوچک و شفاف می‌توان از هر وسیله‌ای مانند جعبه‌های حاوی درب‌های شفاف جهت حفظ رطوبت و عبور نور استفاده نمود.

شرایط محیطی اتاقک رشد

دمای اتاقک رشد شب و روز به‌ترتیب برابر ۲۰ و ۲۲ درجه سلسیوس، سیکل نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، رطوبت نسبی ۷۰٪ و شدت نور ۱۷۵ میکرومول در متر مربع در ثانیه در نظر گرفته شد (Conn et al., 2013). با توجه به اهمیت و نقش شرایط محیطی

www.SID.ir

Archive of SID

در جوانه‌زنی و نتایج آزمایش تمامی پارامترهای مورد اشاره شامل دمای شب و روز، رطوبت نسبی، شدت نور و غلظت دی‌اکسید کربن، شبانه روز و به‌طور آنلاین کنترل گردید.

pH محلول‌های غذایی با استفاده از اسید کلریدریک برابر ۵/٦ تنظیم و جهت تثبیت pH از بافر مس (MES buffer) با غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. تمامی نمک-های مورد استفاده مرک (Merck, Germany) و آب مورد استفاده جهت تهیه محلول‌های غذایی نیز آب مقطر بود. همچنین EC و pH محلول‌ها روزانه کنترل و محلول‌های غذایی پس از جوانه‌زنی و خروج ریشه‌ها از میکروتیوب تا پایان آزمایش هر هفته تعویض گردید.

سنجش درصد جوانه‌زنی و پارامترهای رشدونموی

با توجه به ماهیت آزمایش یعنی بررسی درصد جوانه‌زنی بذور آرابیدوپسیس تحت تاثیر سیستم و محیط کشت، سه تکرار و در هر تکرار یا واحد آزمایشی ۲ سینی کشت حاوی ۳۵ میکروتیوب و جمعا ۷۰ بذر در هر واحد آزمایشی و ۲۱۰ بذر و گیاهچه در کل آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. درصد جوانه‌زنی پس از انتقال بذور به‌درون اتاقک رشد به‌طور روزانه کنترل و شمارش گردید. ظهور ریشه‌چه و برگ‌های کوتیلدونی به‌عنوان شاخص جوانه‌زنی لحاظ گردید.

سنجش میزان نسبی رشد گیاهچه‌ها پس از جوانه‌زنی طی سه هفته اول پس از کشت بذور با برداشت گیاهچه‌ها از محیط رشد و انتقال آنها به آزمایشگاه جهت تعیین وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و تعیین سطح برگ بوته انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های مورد بررسی با استفاده از نم افزار SAS و مقایسه میانگین صفات در سطح ۵٪ و یا استفاده از آزمون توکی انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

کارایی سیستم، درصد جوانه‌زنی و تولید گیاهچه‌های سالم

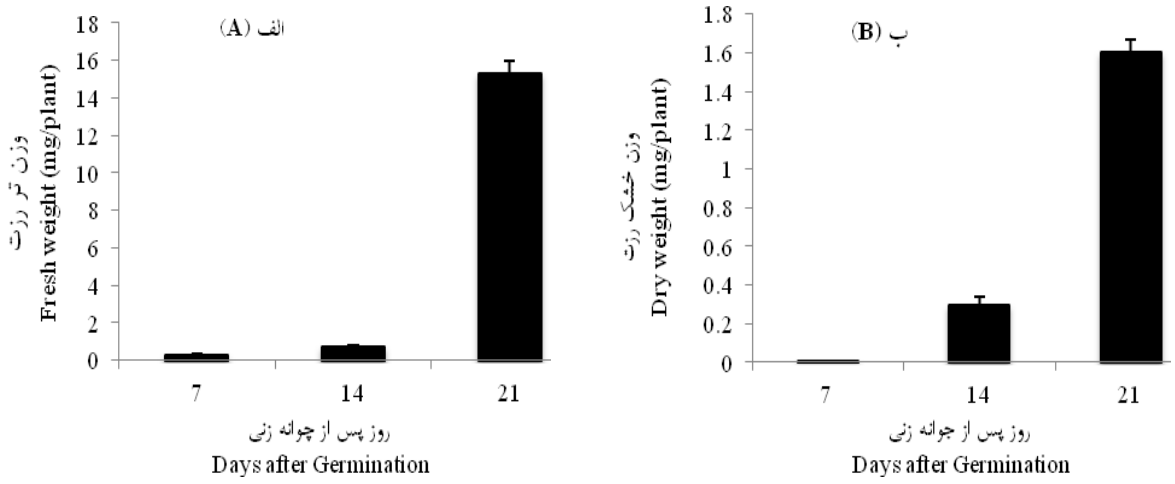
جوانه‌زنی مهمترین مرحله آغازین رشد گیاهان است. بر اساس نتایج آزمایش درصد جوانه‌زنی بذور در سیستم مورد آزمایش ۹۸/۵٪ بود. همچنین بیش از ۹۳٪ گیاهچه-های تولید شده در این روش سالم و دارای رشد یکنواخت و حاوی شاخص‌های کیفی و مناسب جهت انتقال به بستر و شرایط جدید رشد بودند.

پارامترهای رشد و نموی آرابیدوپسیس

نتایج آزمایش نشان‌دهنده تاثیر معنادار سیستم جوانه‌زنی و محیط کشت آگار و عناصر معدنی هوگلند بر پارامترهای رشدونموی گیاهچه‌ها طی سه هفته اول کشت بود. همان-طوری‌که در شکل (۲- الف) مشاهده می‌گردد وزن تر برگ گیاهچه‌ها طی سه هفته اول رشد و قبل از انتقال نشا روندی افزایشی داشت. همچنین روند مشابهی برای وزن خشک رزت یا برگ گیاهان آرابیدوپسیس تحت تاثیر سیستم و محیط کشت جوانه‌زنی طراحی شده مشاهده گردید (شکل ۲- ب).

www.SID.ir

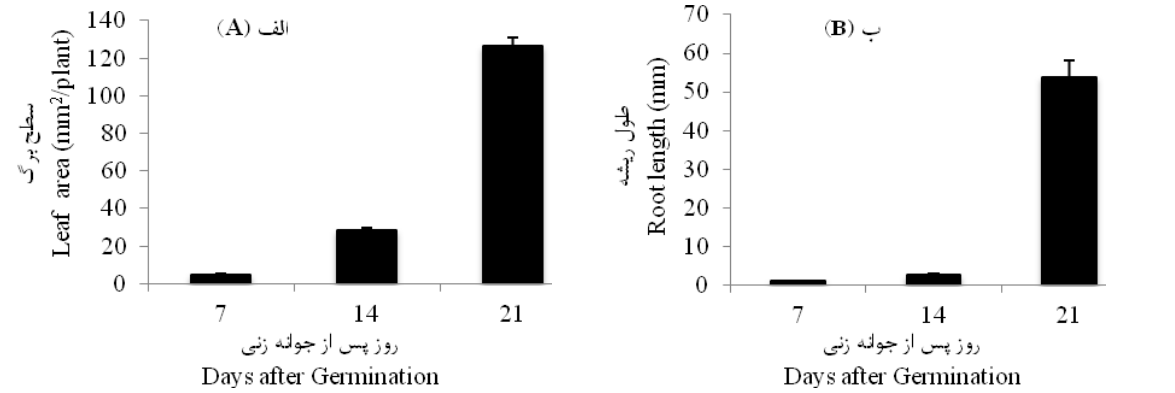
Archive of SID



شکل ۲- وزن تر (الف) و خشک (ب) گیاهچه‌های آرابیدوپسیس اکوتیپ (Col-0) طی سه هفته اول پس از جوانه‌زنی. (میله‌های روی هر ستون (Error Bars) بیانگر خطای استاندارد (Mean ±SE; n=60) می‌باشد).

Figure 2. Leaf (rosette) fresh (A) and dry (weight) of three weeks old Arabidopsis (Col-0). The bars on each column represent the standard errors (Mean ±SE; n=60).

همچنین نتایج آزمایش بیانگر توسعه رزت یا سطح برگ در بوته گیاهچه‌های آرابیدوپسیس طی سه هفته اول پس از جوانه‌زنی بود. به‌عبارتی توسعه رزت در هفته دوم نسبت به هفته اول حدود ٦ برابر و هفته سوم نسبت به هفته دوم ٤/٥ برابر بود (شکل ۲- الف). همچنین رشد ریشه نیز روند مشابهی طی سه هفته اول پس از جوانه‌زنی نشان داد. برهمین اساس متوسط رشد ریشه در بوته در سیستم جوانه‌زنی طراحی شده طی هفته‌های اول، دوم و سوم به‌ترتیب برابر با ۰/۸۵، ۲/۵ و ۵۳/۷۵ میلی‌متر بود (شکل ۲- ب).



شکل ۳- سطح برگ (الف) و طول ریشه (ب) در گیاهان آرابیدوپسیس اکوتیپ (Col-0) طی سه هفته اول پس از جوانه‌زنی. (میله-های روی هر ستون (Error Bars) بیانگر خطای استاندارد (Mean ±SE; n=60) می‌باشد).

Figure 3. Rosette area (A) and root length of three weeks old Arabidopsis (Col-0). The bars on each column represent the standard errors (Mean ±SE; n=60).

www.SID.ir

Archive of SID

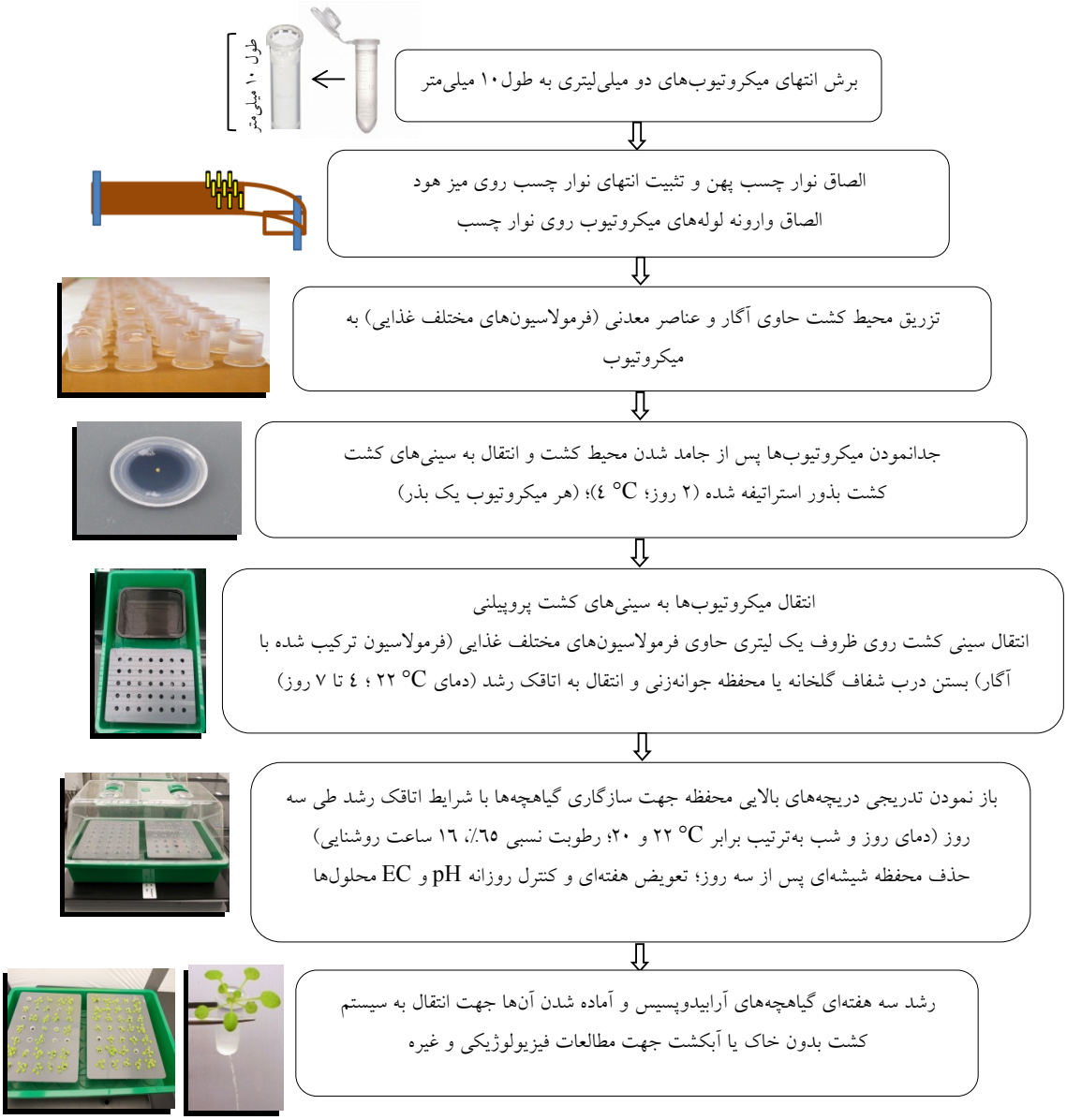
بر اساس نتایج آزمایش سیستم طراحی شده جهت جوانه-زنی بذور آرابیدوپسیس در میکروتیوب‌های یک میلی-لیتری حاوی آگار و عناصر غذایی دارای کارایی بالا در جوانه‌زنی بذور بود (شکل ٤). تولید گیاهچه‌های سالم با رشد یکنواخت یکی دیگر از مزایای این سیستم جوانه‌زنی بود. همچنین امکان تولید تعداد زیاد گیاهچه در فضای کم نیز از دیگر مزیت‌های این روش است؛ برهمین اساس هر سینی کشت پروپیلنی حاوی ۳۵ عدد سوراخ یا نگهدارنده میکروتیوب بود. بدیهی است در صورت نیاز به مقادیر بیشتر علاوه بر افزایش تعداد سینی‌های کشت، می‌توان سینی‌های کشت با ابعاد و تعداد سوراخ‌های بیشتر طراحی و فراهم نمود. در این‌صورت ظروف نگهدارنده محلول غذایی یا محیط ریشه نیز به همان ابعاد می‌بایست بزرگتر شود.

یکی از مهمترین عوامل موثر در کارایی سیستم‌های جوانه‌زنی مورد استفاده توسط محققان، دسترسی و امکان فراهم نمودن وسایل و امکانات موجود است؛ بر همین اساس تمامی وسایل موجود در سیستم مذکور در بیشتر آزمایشگاه‌های زیست‌شناسی، زیست‌فناوری، زراعت و علوم باغبانی فراهم بوده و به‌راحتی می‌توان سیستم مذکور را راه‌اندازی نمود.

یکی از مشکلات کشت آرابیدوپسیس در بسترهای خاکی و حتی سیستم‌های بدون خاک حاوی بسترهای مواد آلی (فیبرنارگیل، کوویپت و غیره) و بسترهای معدنی (پرلایت، ورمی‌کیولایت و غیره)، عدم دقت آزمایش به‌دلیل رهاسازی عناصر معدنی بستر طی آزمایش و همچنین عدم امکان دسترسی راحت به سیستم ریشه به‌ویژه در مطالعات مرتبط با تغذیه گیاهی و همچنین تحقیقات مرتبط با فیزیولوژی و مورفولوژی ریشه است؛ لیکن در این سیستم بدلیل عدم بهره‌گیری از بسترهای آلی و معدنی و به-عبارتی رشد اولیه ریشه در آگار و سپس در محلول غذایی می‌توان گیاهانی با ریشه‌های سالم و دست‌نخورده جهت مطالعات بسیار دقیق تغذیه‌ای و انواع مطالعات مرتبط با ریشه را تولید نمود. نتایج این آزمایش با نتایج Tocquin et al., (2003) یعنی اهمیت کشت بدون خاک آرابیدوپسیس مطابقت دارد. لیکن در روش مذکور نگهدارنده‌های بذور توانایی حفظ بستر آگار را نداشته و برای تثبیت بستر از توری مشبک در زیر نگهدارنده بذور استفاده شد که در این روش علی‌رغم تغییرات کلی نسبت به روش آن‌ها نیاز به نگهدارنده ژل آگار نیز برطرف گردید. همچنین این روش مشکلات ناشی از کشت بذور در راک‌وول مانند رهاسازی برخی عناصر معدنی و عدم امکان بررسی و جداسازی بخشی از ریشه که توسط Hutter and Barzvi (۲۰۰۳) و Smeets et al., (2008) برای جوانه‌زنی آرابیدوپسیس استفاده شده بود را برطرف نمود.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- مراحل مختلف آماده سازی سیستم جوانه‌زنی، محیط کشت، کشت بذور و انتقال نشا آرابیدوپسیس

Figure 4. Different stages of Arabidopsis germination system preparation, seed media, seed cultivation and transplantation of Arabidopsis.

براساس نتایج آزمایش رشد گیاهچه‌های آرابیدوپسیس طی سه هفته اول پس از جوانه‌زنی دارای رشد ایده‌آل و مناسبی بودند. برهمین اساس وزن تر و خشک برگ و همچنین توسعه رزت تحت تاثیر سیستم جوانه‌زنی و همچنین محلول غذایی پس از رشد کند اولیه گیاهچه‌ها در هفته اول، به‌طور چشمگیری از هفته دوم تا سوم افزایش یافت. دلیل رشد مناسب گیاهچه‌ها در این سیستم می‌تواند ناشی از کارایی سیستم و همچنین محلول غذایی سازگار با رشد آرابیدئپسیس باشد. در این روش طول میکروتیوب‌ها به‌دلیل خروج راحت و سریعتر ریشه‌چه اولیه از بستر و تغذیه از محلول غذایی حداقل مقدار ممکن یعنی ۱۰ میلی‌متر در نظر گرفته شد. همان‌طوری‌که

www.SID.ir

Archive of SID

اشاره شد رشد اولیه آرابیدوپسیس طی ۱۰ روز اول بسیار کند و بطئی بوده لیکن پس از آن از رشد تصاعدی و افزایشی داشته و برهمین اساس عدم طویل بودن محیط آگار و در نتیجه امکان خروج ریشه‌چه از بستر و قرارگیری در محلول غذایی می‌تواند نقش مهمی در تولید گیاهان سالم و قوی ایفا نماید. عامل دیگر بهبود پارامترهای رشد ونموی گیاهچه‌ها در این سیستم می‌تواند به‌دلیل انتخاب محلول غذایی مناسب و سازگار با نیازهای غذایی آرابیدوپسیس باشد. نتایج آزمایش‌های متعدد بیانگر رابطه تنگاتنگ بین رشد گیاه و قابلیت دسترسی ریشه به عناصر ضروری مورد نیاز است. به‌عبارتی هر گونه عدم تعادل تغذیه‌ای شامل کمبود و یا بیشبود عناصر غذایی معدنی منجر به بروز تنش فیزیولوژیک و در نتیجه کاهش رشد و نمو و سلامت گیاه می‌گردد (Marschner, 2011). براساس نتایج تحقیقات متعدد محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (۱۹۶۲) (MS) متداول‌ترین محیط کشت مورد استفاده در تحقیقات برای جوانه‌زنی آرابیدوپسیس البته در محیط پتری‌دیش است (وحدتی و همکاران، ۱۳۸۹؛ دیدار و همکاران، ۱۳۹۳؛ مهدیه و محمدصالح، ۱۳۹٤؛ Zhu et al., 1998 و Boyes *et al.*, 2001). لیکن با توجه به پتانسیل اسمزی بالای محیط کشت MS به ویژه MS کامل (Full strength; ×1MS) و حتی غلظت ۵۰٪ MS به‌ترتیب با ECهای برابر ۸/٦ و ٤/٤ دسی‌زیمنس‌برمتر ممکن است در صورت انتخاب برای محلول غذایی منجر به تنش اسمزی به گیاهچه‌های آرابیدوپسیس و عدم تولید گیاهان سالم گردد. لیکن محلول غذایی هوگلند و آرنون (۱۹۵۰) احتمالا بدلیل EC متعادل‌تر محلول غذایی (۲/۱ دسی‌زیمنس‌برمتر) منجر به رشد بهینه آرابیدوپسیس گردیده است. بدیهی است تعیین بهترین فرمولاسیون کودی و مناسب رشد آرابیدوپسیس در سیستم آبکشت و بدون خاک می‌تواند یکی از مهمترین چالش و اهداف محققان علوم تغذیه باشد. چرا که طیف وسیعی از فرمولاسیون‌های مختلف توسط محققان جهت پرورش آرابیدوپسیس در دنیا استفاده می‌شود لیکن اطلاعات دقیقی مبنی بر برتری و تایید یک فرمولاسیون نهایی وجود ندارد (Toda et al., 1999; Arteca and Arteca 2000; Norén et al., 2004; Smeets et al., 2008; Conn et al., 2013; Tocquin et al., 2013).

نتیجه‌گیری

براساس نتایج آزمایش سیستم جوانه‌زنی بهینه شده برای تولید گیاهچه‌های آرابیدوپسیس به‌دلیل کارایی بالا نقش بسزایی در تولید گیاهچه‌های سالم داشت. همچنین امکان فراهم نمودن امکانات و تجهیزات مورد استفاده در تمامی آزمایشگاه‌های علوم گیاهی از دیگر مزایای این روش است. با توجه به حذف خاک و سایر بسترهای آلی، این روش جهت مطالعات دقیق مرتبط با تغذیه و متابولیسم گیاهی قابل توصیه است. بهره‌گیری از فرمولاسیون استاندارد هوگلند و آرنون (۱۹۵۰) نیز منجر به رشد و نمو مطلوب گیاهچه‌ها گردید؛ هر چند انجام آزمایشات تکمیلی جهت تعیین بهترین فرمولاسیون غذایی برای مرحله جوانه‌زنی و همچنین دوره پس از انتقال نشا قابل توصیه می‌باشد.

قدردانی:

بدینوسیله از پرسنل مجموعه یونیفارم و آزمایشگاه های گروه باغبانی و فیزیولوژی گیاهی دانشگاه واخنینگن هلند به دلیل فراهم نمودن شرایط و امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

مهدیه، م.، و محمدصالح، ف.، ۱۳۹٤. نقش microRNA399 و سوکروز در پاسخ های فیزیولوژیک گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) نسبت به کمبود فسفر، زیست‌شناسی گیاهی ایران، شماره ۲۳، صص ۷۵-۸٦.

دیدار، ن.، پژوهنده، م.، و محمودی، ف.، ۱۳۹۳. ایجاد گیاهان زودگلده آرابیدوپسیس از طریق خاموش کردن ژن CLF به روش RNA silencing. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، شماره ٦، صص ٦۱-۷٤.

وحدتی، م.، اقدسی، م.، و صادقی پور، ح.، ۱۳۸۹. بر هم کنش ترهالوز و اسید آسکوربیک در رشد گیاهچه‌های آرابیدوپسیس. پژوهش-های تولید گیاهی، شماره ٤، صص ٤۸-۲۷.

Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* 408: 796–815.

Arteca, R. N., and J. M. Arteca. 2000. A novel method for growing Arabidopsis thaliana plants hydroponically. *Physiologia Plantarum* 108: 188–193.

Boyes, D. C., A. M. Zayed, R., Ascenzi, A. J. McCaskill, N. E. Hoffman, K. R. Davis, and J. Görlach. 2001. Growth stage–based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell* 13(7): 1499-1510.

Conn S. J., B. M.Hocking Dayod, B. Xu, A. Athman, S. Henderson, L. Aukett, V.Conn, M. K. Shearer, S. Fuentes, S. D. Tyerman, and M. Gilliham. 2013. Protocol: optimising hydroponic growth systems for nutritional and physiological analysis of Arabidopsis thaliana and other plants. *Plant methods* 9: 4.

Hermans, C., M. Vuylsteke, F. Coppens, A. Craciun, D. Inzé, and N. Verbruggen. 2010. Early transcriptomic changes induced by magnesium deficiency in Arabidopsis thaliana reveal the alteration of circadian clock gene expression in roots and the triggering of abscisic acid-responsive genes. *New Phytologist* 187(1: 119-131.

Hoagland, D. R., and D. I. Arnon. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347: 1–32.

Marschner, H. 2011. Marschner's mineral nutrition of higher plants. *Academic press.*

Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia plantarum* 15: 473–497.

Norén H., P. Svensson, B. Andersson, H. Nore, P. Svensson, B. Andersson. 2004. A convenient and versatile hydroponic cultivation system for *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 121: 343–348.

Provart, N. J., J. Alonso, S. M. Assmann, D. Bergmann, S. M.Brady, J. Brkljacic, P. McCourt. 2016. 50 years of Arabidopsis research: highlights and future directions. *New Phytologist 209*(3): 921–944.

Schlesier, B., F. Bréton, and H. P. Mock. 2003. A hydroponic culture system for growing *Arabidopsis thaliana* plantlets under sterile conditions. *Plant molecular biology reporter*, 21(4): 449-456.

Smeets, K., J. Ruytinx, F. Van Belleghem, B. Semane, D. Lin, J. Vangronsveld, and A. Cuypers. 2008. Critical evaluation and statistical validation of a hydroponic culture system for Arabidopsis thaliana. *Plant physiology and biochemistry* 46(2): 212-218.

Somerville, C., and M. Koornneef. 2002. A fortunate choice: the history of Arabidopsis as a model plant. *Nature Reviews Genetics 3*(11): 883–889.

Tocquin P., L. Corbesier, A. Havelange, A. Pieltain, E. Kurtem, G. Bernier, and C. Périlleux. 2003. A novel high efficiency, low maintenance, hydroponic system for synchronous growth and flowering of *Arabidopsis thaliana*. *BMC plant biology* 3: 2.

Toda, T., H. Koyama, and Hara, T. 1999. A simple hydroponic culture method for the development of a highly viable root system in Arabidopsis thaliana. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 63(1): 210-212.

Zhu, J.K., J. Liu, and L. Xiong. 1998. Genetic analysis of salt tolerance in Arabidopsis: evidence for a critical role of potassium nutrition. *The Plant Cell* 10(7): 1181-1191.

www.SID.ir

Archive of SID

Optimization of Arabidopsis germination system for nutritional studies under soilless culture

Mohammad Javad Nazarideljou[1*], Sander van Delden[2], L. F. M. Marcelis[3]

1- *Associate Professor, Department of Horticultural Science, Mahabad Branch, Islamic Azad University, Mahabad, Iran.* nazarideljou@yahoo.com

2- *Assistant Professor, Department of Horticulture and Product Physiology, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.* sander.vandelden@wur.nl

3- *Professor, Department of Horticulture and Product Physiology, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.* leo.marcelis@wur.nl

Received Date: 2019/06/13 **Accepted Date: 2019/09/14**

ABSTRACT

Introduction: Arabidopsis thaliana (*Arabidopsis thaliana*) is the most important model plant in plant nutrition studies, genetics, and plant biotechnology. Arabidopsis cultivation is mainly done in either soil or soilless systems. Soil cultivation of Arabidopsis in compared to soilless culture does not have precise control on the concentration and ratio of mineral elements in the substrate, salinity, and pH, which results in negative effects on plant growth, biochemical reactions, etc. However, soilless or hydroponic systems due to the exact control of plant nutritional needs and the substrate are more compatible for high accuracy experiments such as plant nutrition, especially for primary seedling growth. Accordingly, this experiment was conducted to provide an optimized Arabidopsis germination system for production of healthy seedlings for soilless systems based on the agar-nutrient media.

Materials and Methods: This experiment was conducted based on the importance of the development of Arabidopsis in soilless systems in order to provide accurate nutritional and physiological trials and the importance of effective germination and the production of healthy seedlings in an agar-nutrient media. Therefore, two milliliters microtubes were cut into 10 mm in length, and connected upsidedown to the table with adhesive tape then were filled with agar (0.55%) and mineral elements (Hoagland formulation) medium. (1: 1 V/V). Sterilized and stratified Arabidopsis seeds were sown on filled microtubes and then transferred to the growth chamber with controlled environmental conditions. Germination percentage and growth and development parameters of seedlings were measured for three weeks.

Results and discussion: Results showed the effectiveness of the optimized germination system and also the agar-nutrient medium for Arabidopsis. Accordingly, seed germination percentage was more than 97.5%. Also, production of healthy seedlings with optimum growth (85%) especially the production of intact roots for various biological root and nutritional studies was another advantage of this experiment. Based on the results three weeks old plants were ready for transplanting to the main cultivation system.

Conclusion: The results of the present study led to the conclusion that optimized system and medium due to high efficiency, simple and possible design, precise control of the substrate and root medium, could be recommended for Arabidopsis germination experiments and also arabidopsis cultivation for nutritional purposes.

www.SID.ir

Archive of SID

Keywords: Agar, germination medium, seedling growth, , nutrition element, model plant

.

www.SID.ir