Archive of SID

Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 51, No 1, Spring 2020 (45-54)
DOI: 10.22059/ijhs.2019.250705.1386

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۱، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۹ (ص ۵۴-۴۵)

تأثیر تغییر غلظت دی‌اکسیدکربن اتمسفر محیط کشت درون‌شیشه‌ای بر خصوصیات رشدی و پتانسیل فتوسنتزیِ ارکیده خربقی معمولی (*Epipactis veratrifolia*)

زهره سلطانی[۱]، شیرین دیانتی دیلمی[۲*]، ساسان علی نیائی فرد[۲] و سعیده رستمی[۱]
۱ و ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/٤ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۱)

چکیده

ارکیده خربقی معمولی از ارکیده‌های خاک‌رست و بومی مناطق معتدل ایران است و پتانسیل بالقوه‌ای جهت اصلاح برای مصارف زینتی دارد. هرچند تکثیر درون‌شیشه‌ای این گیاه قبلاً بررسی شده است، اما مطالعه عوامل مؤثر بر رشد و فتوسنتز این گونه در شرایط کنترل‌شده درون‌شیشه‌ای ضروری می‌باشد. در تحقیق حاضر گیاهچه‌های سه برگچه‌ای در ظروف شیشه‌ای حاوی محیط کشت تغییر یافته فاست مایع به همراه پرلیت استریل (جهت استقرار) کشت شدند. جهت حذف CO_2 از ویال‌های شیشه‌ای حاوی سه میلی‌لیتر KOH با غلظت اشباع و جهت افزایش CO_2 از ویال‌های حاوی سه میلی‌لیتر مواد آزادکننده CO_2 (محلول سه مولار بی‌کربنات سدیم و کربنات سدیم) در هریک از ظروف کشت استفاده شد. آزمایش بر پایه طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار و هر تکرار شامل سه نمونه گیاهی انجام شد. شاخص‌های رشدی نظیر وزن تر و خشک بخش هوایی، ارتفاع ساقه و طول ریشه، نرخ تعرق و حداکثر کارایی فتوسیستم II فتوسنتزی گیاهچه‌ها اندازه‌گیری شد. بیشترین میزان ارتفاع ساقه، وزن تر و خشک ساقه و طول ریشه در گیاهچه‌های حاصل از تیمار افزایش CO_2 مشاهده شد. از اتمسفر ظروف کشت موجب کاهش چشم‌گیر میزان حداکثر کارایی فتوسیستم II (QY_{max}) فتوسنتزی گیاهچه ها شد. از طرفی به‌دنبال پسابیدگی، بیشترین سرعت تعرق در برگ‌های تیمار شاهد و افزایش CO_2 مشاهده شد و حذف CO_2 سبب کاهش سرعت تعرق در گیاهچه‌ها شد. می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش درون‌شیشه‌ای CO_2 می‌توان باعث افزایش کارایی فتوسنتز گیاهان درون‌شیشه‌ای ارکیده خربقی معمولی شد و از این طریق رشد و نمو این گیاهان را در شرایط درون‌شیشه‌ای بهبود بخشید.

واژه‌های کلیدی: حداکثر کارایی فتوسیستم دو، کشت درون‌شیشه‌ای، مواد آزادکننده‌ی‌دی‌اکسیدکربن، مواد جاذب دی‌اکسیدکربن.

Effects of different concentrations of CO_2 in the atmosphere of *in vitro* culture vessels on growth characteristics and photosynthetic capacity of *Epipactis veratrifolia*

Zohre Soltani[1], Shirin Dianati Daylami[2], Sasan Aliniaeifard[2] and Saeideh Rostami[1]
1, 2. M. Sc. Student and Assistant Professor, Department of Horticulture, College of Aburaihan, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran
(Received: Jan. 21, 2018 - Accepted: Mar. 2, 2019)

ABSTRACT

Epipactis veratrifolia is a terrestrial orchid that belongs to the temperate zones of Iran with great breeding potentials for ornamental usages. Although *in vitro* propagation of this orchid has been previously performed but investigation on factors influencing its *in-vitro* growth and photosynthesis is still needed. In the current study, three-leaflet seedlings were cultured in closed vessels containing modified Fast liquid medium together with sterilized perlite (for sample establishment). To remove CO_2, vials containing saturated KOH solution as CO_2 absorbent and to increase CO_2 concentrations, vials containing 3 mL CO_2-releasing solutions (3 M sodium bicarbonate and sodium carbonate) were placed into the culture vessels. The experiment was carried out based on a completely randomized design with three replications and three samples per each replicate. Growth parameters including fresh and dry weights of shoot, stem height and root length together with transpiration rate and maximum quantum yield of photosystem II efficiency (QY_{max}) of the samples were measured. The highest values for shoot height, shoot dry and fresh weights and root length were observed in CO_2-increased treatments. Removing CO_2 from the atmosphere of culture vessels caused a dramatic decrease in QY_{max} of plantlets *in vitro*. Meanwhile, following desiccation, higher transpiration rate was detected in control and CO_2-increased treatments, while removing CO_2 decelerate transpiration rate of the plantlets. In conclusion, with increasing CO_2 *in vitro* we can promote photosynthetic efficiency of *Epipactis veratrifolia* and as a result enhance growth of plantlets *in vitro*.

Keywords: Carbon dioxide absorbent, carbon dioxide releasing, *in vitro* culture, maximum quantum yield of photosystem II efficiency (QY_{max}).

* Corresponding author E-mail: dianati@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ارکیده خربقی معمولی (*Epipactis veratrifolia*) از جمله ارکیده‌های خاک‌رست ریزوم‌دار و بومی مناطق معتدل ایران است. از برگ‌های این گیاه در طب سنتی هند جهت درمان تب مزمن و از ریزوم‌های آن به‌عنوان داروی تقویت جنسی استفاده می‌گردد (Dogan *et al.*, 2004; Dangwal *et al.*, 2010). این گیاه با قامتی افراشته به ارتفاع ۱۲۰-۱۵۰ سانتی‌متر و گل‌آذین مجتمع دارای کاسبرگ‌های رنگین و گلبرگ‌های تخم‌مرغی زرد زیبا پتانسیل بالقوه‌ای جهت اصلاح به‌عنوان گل گلدانی و حتی شاخه‌بریده دارد (Moradi *et al.*, 2016). با توجه به اهمیت فرایند اصلاح گیاهان بومی برای مصارف زینتی و یا دارویی و همچنین حفظ و احیای ذخایر ژنتیکی ایران، مطالعات بیشتر در زمینه کشت این گونه در شرایط کنترل‌شده درون‌شیشه‌ای ضروری به نظر می‌رسد. از آنجا که ارکیده‌ها غالباً گیاهانی کند رشد محسوب می‌شوند و از طرفی کنترل دما و نور در اتاقک‌های رشد بسیار هزینه‌بر است، لذا افزایش میزان رشد در این شرایط ضروری به‌نظر می‌رسد (Norikane *et al.*, 2013). عوامل محیطی در شرایط درون‌شیشه‌ای نسبت به محیط معمول رشد گیاهان، بسیار متفاوت است. به غیر از محیط کشت (شامل غلظت‌های مختلف از مواد مغذی معدنی و غیرمعدنی و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی) و شدت نور کم، اتمسفر کشت‌های درون‌شیشه‌ای نیز بسیار با هوای بیرون متفاوت است. به‌طوریکه رطوبت نسبی بسیار بالا (نزدیک به ۱۰۰٪) و مقادیر زیادی از گازهای اتیلن و اکسیژن (O_2) و مقادیر متنوع و یا بسیار اندک دی‌اکسیدکربن (CO_2) در آن وجود دارد و به همین علت میزان بقای گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای کاهش می‌یابد (Hazarika *et al.*, 2004; Kozai, 2010). غلظت CO_2 در فضای بسته ظروف کشت معمولاً کمتر از نقطه جبران و در حدود $\mu mol.l^{-1}$ ۱۰۰ و بسیار کمتر از غلظت معمول این گاز در جو زمین ($\mu mol.l^{-1}$ ۴۰۰) است. حتی زمانیکه این ظروف با فیلم‌هایی که قابلیت تبادل گازها را دارند، بسته می‌شوند، غلظت CO_2 از $\mu mol.l^{-1}$ ۲۰۰ تجاوز نمی‌کند (Kozai, 1991). غلظت محدود CO_2 و شدت نور کم موجب کاهش میزان فتوسنتز در این شرایط می‌شوند. از دیگر دلایل کاهش فتوسنتز در شرایط درون‌شیشه‌ای احتمالاً غلظت بالای قند محیط نیز می‌باشد (Kozai, 1991; Desjardins *et al.*, 1995). همچنین کمبود CO_2 همراه با رطوبت نسبی بالا سبب باز بودن مداوم روزنه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌شود و همین موضوع ظرفیت نگهداری آبِ برگ‌ها را هنگام خروج گیاهان از شیشه و در طول سازگاری به شدت کاهش می‌دهد و تلفات گیاهان در این مرحله افزایش می‌یابد (Hazarika, 2006). سطح پایین CO_2 هنگام قرارگرفتن گیاه در معرض نور، منجر به کمبود پذیرنده‌های الکترونی در زنجیره انتقال الکترونیِ فتوسنتز می‌شود (Durchan *et al.*, 2001). در نتیجه اکسیژن در دسترس، نقش پذیرنده الکترونی را ایفا و در واکنش مهلر به‌کار می‌رود (Mehler, 1951). محصول واکنش مهلر رادیکال‌های آزادی (ROS)[1] هستند که به ماکرومولکول‌های آسیب‌پذیر، حمله می‌کنند (Schreiber & Neubauer, 1990). با حذف CO_2 از ظروف کشت آرابیدوپسیس و سوسن، در غیاب و حضور ساکارز، میزان فتوسنتز کاهش و میزان ROS افزایش یافت (Askari, 2016). افزایش غلظت CO_2 در شرایط درون‌شیشه‌ای سبب بهبود فتوسنتز و عملکرد روزنه‌ها و در نتیجه سازگاری بهتر گیاهچه‌های گردو گردید (Vahdati *et al.*, 2017). مشابه همین نتایج در تنباکوی تیمارشده با اسید آبسزیک (ABA) در حضور غلظت بالای CO_2 نیز حاصل شد (Haisel *et al.*, 1999).

پژوهش حاضر در ادامه مطالعات انجام شده برای حفظ گیاهان ارکیده بومی و خودرو در پهنه منابع طبیعی کشور از طریق کشت درون‌شیشه‌ای و تکثیر برخی از آنها از جمله ارکیده خربقی معمولی (با ارزش دارویی و پتانسیل بالقوه برای اصلاح به‌عنوان گل شاخه‌بریده و مصارف دیگر) صورت گرفته است تا به اهمیت بررسی نقص کارایی فتوسنتزیِ گیاهان درون‌شیشه‌ای در اثر کمبود CO_2 پرداخته و شرایط رشد و فتوسنتز آن‌ها را بهبود بخشد.

1. Reactive oxygen species

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

ماده گیاهی و شرایط رشدی

بذرهای ارکیده خربقی معمولی اوایل مرداد ماه از ارتفاعات چالوس جمع‌آوری و تا زمان کشت در پاکت‌های کاغذی در یخچال قرار داده شدند. بذرها در اواسط مهرماه ۱۳۹۶ جهت ضدعفونی و کشت از یخچال خارج شدند و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از ضدعفونی‌شدن در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه، بذرها در محیط جامد فاست (Fast, 1976) تغییر یافته شامل عناصر ماکرو و میکرو همراه با پپتون (۲ g/l)، ساکارز (۱۲ g/l)، فروکتوز (۵ g/l) و آگار (۴/۹ g/l) (Duchefa, the Netherland)در pH=۶/۵ کشت شدند. بعد از گذشت ۷۵ روز، پروتوکورم‌های تشکیل شده در محیط قبلی واکشت شدند. گیاهان جهت ادامه رشد در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط طول روز ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. تمامی مراحل آزمایش، در آزمایشگاه اصلاح و تکثیر ثعلب (ارکیده) گروه باغبانی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران انجام شد.

حذف و افزایش CO_2

بعد از سه هفته گیاهچه‌های سه برگچه‌ای حاصل از رشد پروتوکورمها، در شیشه‌های مربایی دربدار (با ارتفاع ۸۵ میلی‌متر و قطر۶۵ میلی‌متر و گنجایش تقریبی ۳۵۰ میلی‌لیتر) کشت شدند که دارای محیط مایع فاست (۳۰ میلی‌لیتر) تغییریافته حاوی پپتون، ساکارز و فروکتوز بود و در کف آن جهت استقرار گیاهچه‌ها تا ارتفاع حدود ۳۰ میلی‌متر پرلایت دانه ریز استریل ریخته شده بود. جهت اعمال تیمارهای حذف و افزایش CO_2 در هنگام توزیع محیط کشت یک ویال شیشه‌ای استریل با حجم پنج میلی‌لیتر در هر یک از ظروف کشت قرار داده شد. در شیشه‌های مربوط به تیمار حذف CO_2 درون این ویال‌های شیشه‌ای سه میلی‌لیتر محلول هیدروکسید پتاسیم اشباع استفاده شد. این محلول، CO_2 موجود در اتمسفر محیط کشت را طبق رابطه (۱) جذب نموده و بی‌کربنات پتاسیم ($KHCO_3$) تولید می‌کند.

رابطه ۱) $KOH + CO_2 \rightarrow KHCO_3$

همچنین در شیشه‌های مربوط به تیمارهای افزایش غلظت CO_2 از ویال‌های ۵ میلی‌لیتری استفاده شد که با سه میلی‌لیتر محلول بی‌کربنات سدیم ($NaHCO_3$) و کربنات سدیم ($Na2CO_3$) سه مولار به ترتیب با نسبت ۷۳ به ۲۳ پر می‌شدند. این مقدار محلول معادل ۴۰ گرم در لیترمکعب CO_2 در محیط آزاد می‌کند (Solárová & Pospíšilová, 1997; Xiao *et al.*, 2011).

سرعت تعرق

جهت بررسی مقدار تعرق در واکنش به شرایط برون‌شیشه‌ای، همه برگ‌های هر یک از گیاهان درون‌شیشه‌ای اسکن شد و سطح برگ آن با استفاده از نرم‌افزار image J محاسبه گردید. برگ‌های جدا شده بلافاصله به‌صورتی‌که پشت برگ رو به بالا باشد بر روی ترازوی آزمایشگاهی AND مدل GR ۱۲۰ با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم دارای محفظه (به منظور جلوگیری از تاثیرات محیطی) قرار گرفت. همزمان دوربین دیجیتالی به منظور تصویربرداری از صفحه ترازوی دیجیتال، در محیط نصب گردید. در نهایت به مدت یک ساعت، وزن نمونه‌ها در هر دقیقه ثبت شدند و سرعت تعرق با استفاده از رابطه (۲) محاسبه گردید (Aliniaeifard & van Meeteren, 2014).

رابطه ۲)
$$E = \{\{\left\{\frac{\Delta \text{ fresh weight (g)}}{\text{molar mass water } \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)}\right\} \times 1000\left(\frac{\text{mmol}}{\text{mol}}\right)\}/\text{measurment frequency(s)}\}/\text{leaf area (m}^2\text{)}.$$

شاخص‌های رشد

بعد از یک ماه شاخص‌های رشدی مانند وزن تر و خشک بخش هوایی و ریشه (به‌وسیله ترازوی آزمایشگاه و برحسب گرم)، طول ریشه و ساقه (بوسیله کولیس و برحسب میلی‌متر)، حجم ریشه (بوسیله مزور مدرج و برحسب میلی‌لیتر مکعب)، سطح برگ (با استفاده از کپی‌برداری از عکس و توسط نرم‌افزار J image و بر حسب میلی‌متر مربع) و تعداد ساقه، برگ و ریشه اندازه‌گیری شدند.

حداکثر کارایی فتوسیستم II فتوسنتزی

قبل از خارج ساختن گیاهچه‌ها از ظروف کشت و عملیات تخریب، جهت اندازه‌گیری کارایی فوتوسیستم

www.SID.ir

Archive of SID

II از تصویربرداری فلورسنس کلروفیل با استفاده از دستگاه فلورکم مدل FC 1000-H و با استفاده از روش Aliniaeifard & van Meeteren (2014) استفاده شد. در ابتدا گیاهچه‌های درون ظروف کشت، به‌مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. پس از سازگاری در تاریکی، گیاهچه‌ها بلافاصله برای اندازه‌گیری حداکثر کارایی کوانتومی فوتوسیستم II زیر دستگاه قرار گرفتند. دستگاه فلورکم شامل یک دوربین CCD و چهار پنل ال‌ای‌دی ثابت است که یک جفت آن پالس‌های اندازه‌گیری و یک جفت دیگر وظیفه ایجاد روشنایی فعال و فلش اشباع را بر عهده دارند. تصویربرداری در تاریکی با استفاده از فلش‌های کوتاه انجام شد. در انتهای فلش‌های کوتاه، نمونه‌ها با یک پالس اشباع (سه هزار و ۹۰۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه) مواجه شدند که منجر به اشباع ناپایدار فوتوشیمیایی می‌شود و گیرنده‌های اولیه فوتوسیستم II را کاهش می‌دهد (Genty *et al.*, 1989). پس از رسیدن به حالت پایدار فلورسنس، دو گروه میانگین داده‌ها توسط دستگاه آنالیز و بر صفحه رایانه نمایان می‌شوند. گروه اول مربوط به اندازه‌گیری‌های تحت تأثیر فلش‌های کوتاه در تاریکی است که با F0 مشخص شده و دسته دوم که با Fm نشان داده شده مربوط به اندازه‌گیری نور اشباع است. با استفاده از این دو داده میزان Fv طبق رابطه (۳) محاسبه می‌شود.

رابطه ۳) $Fv= Fm- F0$

$Fv/ Fm= (Fm- F0)/ Fm$

میانگین داده‌های Fv/Fm و انحراف معیار مربوط به هر تصویر، با استفاده از نرم‌افزار فلورکم نسخه ۷ محاسبه شد.

آنالیزهای آماری

آزمایش بر پایه طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار و هر تکرار شامل سه نمونه انجام شد. تجزیه داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SAS و مقایسه میانگین با آزمون دانکن در سطح آماری ۰/۰۱ و ۰/۰۵ انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج به‌دست‌آمده حاکی از نقش CO_2 در ایجاد تغییرات معنی‌دار در ارتفاع، وزن تر و خشک ساقه و همچنین طول ریشه بود. در شاخص‌های حجم ریشه، سطح برگ، تعداد ساقه، برگ و ریشه اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد. جدول ۱ تجزیه آماری شاخص‌های رشدی بخش هوایی و جدول ۲ تجزیه آماری شاخص‌های رشد ریشه را نشان می‌دهند.

شاخص‌های رشد

میزان وزن‌تر و خشک ساقه به‌طور معنی‌داری در تیمارهای مختلف، متفاوت بود. بیشترین میزان وزن‌تر ساقه (۰/۲۲۸ گرم) در گیاهچه‌های حاصل از تیمار افزایش CO_2 به‌دست آمد و این میزان بیش از دو برابر گیاهان شاهد (۰/۰۹۲ گرم) و گیاهان حاصل از تیمار حذف CO_2 (۰/۰۸۸) بود. گیاهچه‌های حاصل از تیمار حذف CO_2 و شاهد از این نظر باهم اختلاف معنی‌داری نداشته و هر دو در یک گروه آماری قرار گرفتند (شکل۱).

جدول ۱. تجزیه آماری شاخص‌های رشد بخش هوایی

Table 1. Analysis of variance of shoot parameters

S.O.V	Shoot fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Shoot length (mm)	Leaf number	Leaf area (mm)	Plantlet number
CO_2	19^{*}	0.06^{*}	2300.77^{**}	1.13^{ns}	48794.28^{ns}	3^{ns}
Error	2.7	0.01	99.33	0.74	11022.72	2.33

ns، * و **: نبود اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ns, *, **: Non-significantly differents and significantly differences at 5 and 1% of probability levels, respectively.

جدول ۲. تجزیه آماری شاخص‌های رشد ریشه

Table 2. Analysis of variance of root parameters

S.O.V	Root fresh weight (g)	Root dry weight (g)	Root length (mm)	Root number	Root volume (mm^3)
CO_2	79^{ns}	0.45^{ns}	1470.52^{**}	14.77^{ns}	0.33^{ns}
Error	16.4	0.56	95.1	19.33	0.89

ns، **: نبود اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

ns, **: Non-significantly differents and significantly differences at 1% of probability levels, respectively.

www.SID.ir

Archive of SID

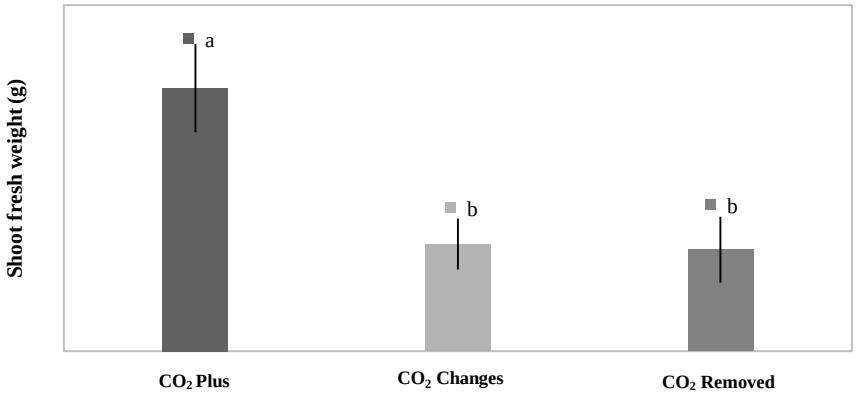
بیشترین میزان وزن خشک ساقه (۰/۰۱۸۸ گرم) در گیاهچه‌های حاصل از تیمار افزایش CO_2 و کمترین میزان وزن خشک ساقه (۰/۰۱۰۳ گرم) در تیمار شاهد مشاهده شد. وزن خشک ساقه در تیمار افزایش CO_2 تقریباً دو برابر سایر تیمارها بود (شکل ۲).

همچنین طول ریشه و ارتفاع ساقه در تیمارهای مختلف با هم تفاوت معنی‌داری داشتند. ارتفاع گیاهچه‌های حاصل از تیمار افزایش CO_2 (۶۶ میلی‌متر) بیش از پنج برابر گیاهچه‌های تیمار حذف CO_2 (۱۲ میلی‌متر) بودند. همچنین گیاهچه‌های شاهد (۲۸ میلی‌متر) طولی کمتر از نصف گیاهان تیمار افزایش CO_2 را داشتند (شکل‌های ۳ و ۴).

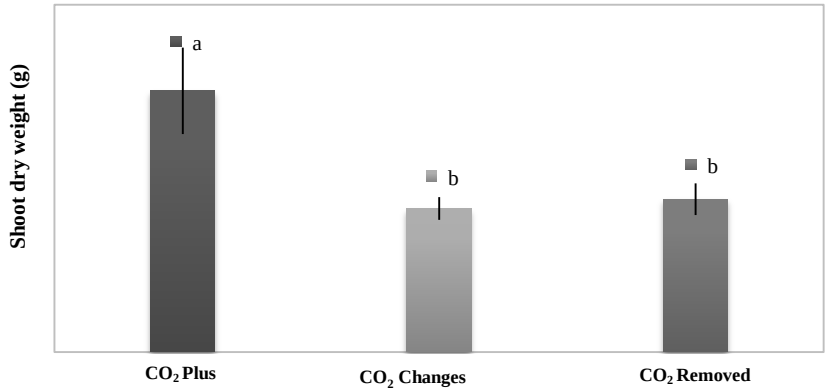
بیشترین طول ریشه (۵۸/۳ میلی‌متر) در تیمار افزایش CO_2 مشاهده شد،که تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نشان نداد. اما گیاهان تحت تیمار حذف CO_2 که کمترین طول ریشه (۱۴/۱۱ میلی‌متر) را دارا بودند، با گیاهان حاصل از تیمار افزایش CO_2 و شاهد اختلاف معنی‌دار نشان دادند و تقریباً یک سوم طول ریشه آنها را داشتند (شکل ۵).

حداکثر کارایی فتوسیستم II فتوسنتزی

بیشترین میزان Fv/Fm، متعلق به گیاهچه‌های حاصل از تیمار افزایش CO_2 بود. اگرچه گیاهچه‌های شاهد با اختلاف کمی در مرتبه بعد قرار گرفتند، اما این اختلاف معنی‌دار نبود. گیاهچه‌هایِ تیمار حذف CO_2 با نصف میزان حداکثر کارایی فتوسیستمII فتوسنتزی (QYmax) در مقایسه با گروه اول با اختلاف معنی‌دار در دسته دوم طبقه‌بندی شدند (جدول ۳) (شکل‌های ۶ و ۷).



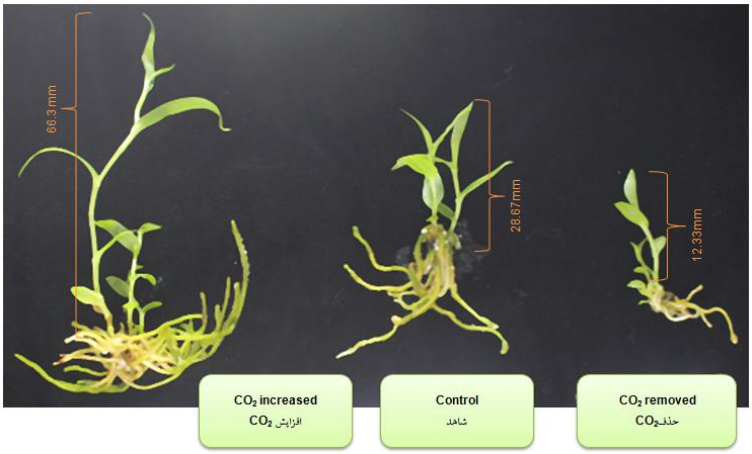
شکل ۱. تأثیر تغییر سطوح درون‌شیشه‌ای CO_2 بر وزن تر ساقه ارکیده خربقی معمولی
Figure 1. Effect of in vitro CO_2 levels on shoot fresh weight of *Epipactis veratrifolia*



شکل ۲. تأثیر تغییر سطوح درون‌شیشه‌ای CO_2 بر وزن خشک ساقه ارکیده خربقی معمولی
Figure 2. Effect of *in vitro* CO_2 levels on shoot dry weight of *Epipactis veratrifolia* seedlings

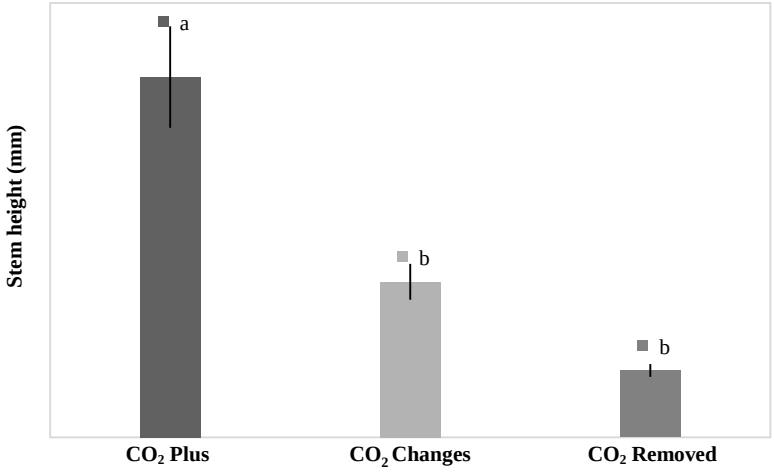
www.SID.ir

Archive of SID



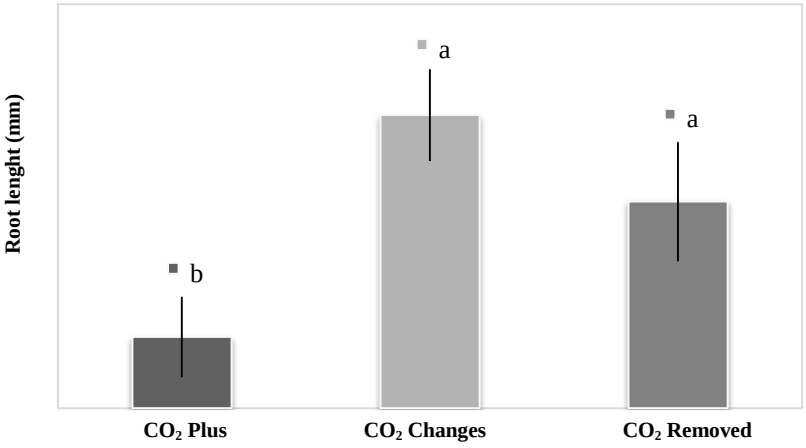
شکل ۳. تأثیر تغییر سطوح درون‌شیشه‌ای CO_2 بر گیاهچه‌های ارکیده خربقی معمولی

Figure 3. Seedlings result from *in vitro* atmosphere CO_2 changes



شکل ۴. تأثیر تغییر سطوح درون‌شیشه‌ای CO_2 بر ارتفاع ساقه ارکیده خربقی معمولی

Figure 4. Effect of *in vitro* CO_2 levels on stem length of *Epipactis veratrifolia* seedlings



شکل ۵. تأثیر تغییر سطوح درون‌شیشه‌ای CO_2 بر طول ریشه ارکیده خربقی معمولی

Figure 5. Effect of *in vitro* CO_2 levels on root length of *Epipactis veratrifolia* seedlings

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. تجزیه آماری شاخص‌های حداکثر کارایی فتوسیستم II

Table 3. Analysis of variance of maximum quantum efficiency of photosystem II

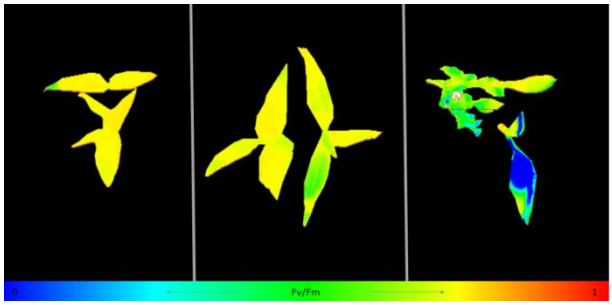
S.O.V	Fv/Fm
CO_2	0.11514444**
Error	0.002244

**: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

**: Significantly differences at 1% at probability level.

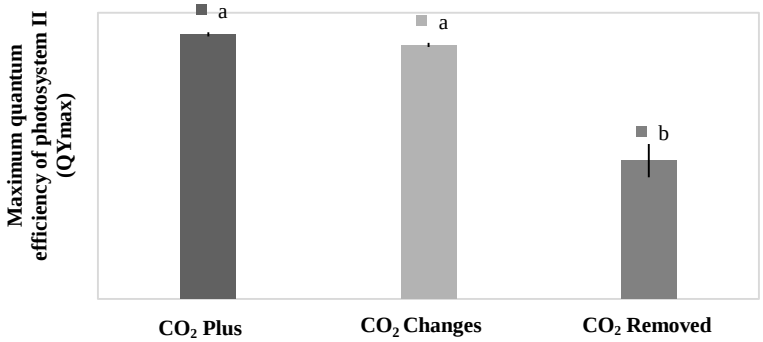
سرعت تعرق برگ در طول پسابیدگی

برگ‌های گیاهچه‌های حاصل از تیمارهای مختلف، عکس‌العمل متفاوتی از نظر سرعت تعرق نشان دادند. بیشترین سرعت تعرق در برگ‌های تیمار شاهد (C) و افزایش CO_2 (CO_2) مشاهده شد. حذف CO_2 (KOH) سبب کاهش سرعت تعرق در گیاهچه‌ها شد (شکل ۸).



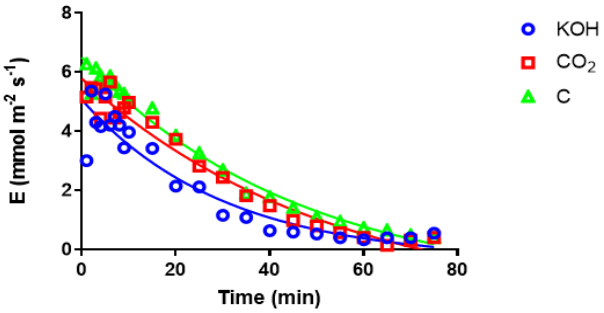
شکل ۶. حداکثر کارایی فتوسیستم II. به ترتیب از راست به چپ حداکثر کارایی فتوسیستم دو در گیاهچه‌های حاصل از تیمار حذف CO_2، تیمار افزایش CO_2، تیمار شاهد

Figure 6. Effect of *in vitro* CO_2 levels maximum quantum yield of photosystem II (Fv/Fm) of *Epipactis veratrifolia* seedlings



شکل ۷. تأثیر تغییر سطوح درون‌شیشه‌ای CO_2 بر حداکثر میزان کارایی فتوسیستم II فتوسنتزی (QY max) در ارکیده خربقی معمولی

Figure 7. Effect of *in vitro* CO_2 levels on maximum quantum yield of photosystem II (QYmax) in *Epipactis veratrifolia* seedlings



شکل ۸. تأثیر تغییر سطوح درون‌شیشه‌ای CO_2 بر میزان تعرق در طول ۸۰ دقیقه ارزیابی پسابیدگی برگ در ارکیده خربقی معمولی. حروف C، CO_2 و KOH به‌ترتیب نمایانگر تیمارهای شاهد، افزایش CO_2 و حذف CO_2 می‌باشند.

Figure 8. Effect of *in vitro* CO_2 levels on transpiration rate (E) during 80 minutes of leaf desiccation in *Epipactis veratrifolia* seedlings.C, CO_2 and KOH: control, CO_2 increased and CO_2 removed treatments respectively

www.SID.ir

Archive of SID

شرایط معمول محیط درون‌شیشه‌ای شامل رطوبت نسبی بالا، شدت نور کم، غلظت پایین CO_2، دمای ثابت و غلظت بالای قند، ویتامین و تنظیم‌کننده‌های رشد و نبود میکروارگانیسم‌ها در کنار تجمع اتیلن و دیگر گازها، محیطی نامتعادل جهت رشد گیاهان فراهم می‌آورد (Nguyen & Kozai, 2005; Kozai, 2010). تحت این شرایط غلظت CO_2 در طول روشنایی کاهش یافته و در تاریکی افزایش می‌یابد (Solárová & Pospíšilová, 1997). افزایش میزان CO_2 در فضای درون‌شیشه‌ای سبب ایجاد تغییرات معنی‌دار بر خصوصیات رشد می‌شود. در این مطالعه برای اولین بار اثر میزان CO_2 بر رشد گونه ثعلب خربقی معمولی بررسی شده است. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد، استفاده از ترکیبات آزادکننده CO_2 رشد ارکیده خربقی را بهبود می‌دهد. نظیر همین تأثیر در تمشک قرمز (Deng & Donnelly, 1993)، توت‌فرنگی (Kozai *et al*., 1991)، تنباکو (Kozai *et al*., 1990)، هویج (Kozai & Iwanami, 1988)، ارکیده (Kozai *et al*., 1987) و سیب‌زمینی (Kozai *et al*., 1988) نیز مشاهده شده است. این افزایش رشد احتمالاً در اثر افزایش میزان فتوسنتز در این شرایط است. مشخص شده است که میزان جذب CO_2 در تیمار افزایش CO_2 افزایش یافته است و همین موضوع سبب افزایش فتوسنتز در تمشک قرمز (Deng & Donnelly, 1993) و توت‌فرنگی (Kozai *et al*., 1991) شده است. افزایش CO_2 منجر به افزایش فعالیت کربوکسیلازی و کاهش فعالیت اکسیژنازی در روبیسکو می‌شود که نتیجه آن بهبود تجمع CO_2 است (Rybczyński *et al*., 2007; Reddy *et al*., 2010). غلظت پائین CO_2 علت اصلی کاهش میزان فتوسنتز و در نتیجه آن کاهش میزان رشد در شرایط درون‌شیشه‌ای است (Pospisilova *et al*., 2007). در مطالعه ما نیز اتمسفر غنی از CO_2 سبب افزایش طول ریشه، ارتفاع ساقه، وزن تر و خشک ساقه در ارکیده خربقی معمولی (شکل ۳) و همچنین حذف CO_2 سبب کاهش محسوس فتوسنتز در آن شد (شکل‌های ۶ و ۷). اما میزان وزن خشک و تر ریشه و سطح برگ اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان نداد. این مسئله احتمالاً به مدت زمان کم اعمال تیمار افزایش CO_2 (۴ هفته) باز می‌گردد (Vahdati *et al*., 2017).

فعالیت ریشه با دو عامل طول و تعداد آن ارتباط دارد (Nobel, 1991). هرچند که تعداد ریشه‌ها در مطالعه پیش‌رو تغییر محسوس و اختلاف معنی‌دار در اثر اعمال تیمارها نداشت. اما طول ریشه گیاهان تحت تأثیر افزایش CO_2 افزایش معنی‌دار نشان داد. همچنین مشخص شده است احتمالاً گیاهانی که فعالیت ریشه‌ای بیشتری دارند، سازگاری بیشتری با شرایط محیطی خارج از ظروف کشت پیدا می‌کنند (Deng & Donnelly, 1993).

به‌طورکلی گیاهان کشت بافتی دارای برگ‌هایی با آناتومی غیرعادی هستند که توانایی کنترل میزان آب درون بافتی خود را ندارند (Brainerd & Fuchigami, 1982; Galzy & Compan, 1992). میزان تعرق گیاهان کشت بافتی به محض خروج از ظروف کشت به شدت افزایش یافته و بتدریج بعد از سازگاری اولیه کاهش می‌یابد (Hazarika, 2006; Rkhis *et al*., 2011). با افزایش میزان CO_2 میزان تعرق در گیاهچه‌های کیوی کاهش یافت (Arigita *et al*., 2002). همانند همین نتایج در گیاهچه‌های گردو (Vahdati *et al*., 2017)، *Pfaffia glomerata* (Saldanha *et al*., 2013) و تمشک قرمز (Deng & Donnelly, 1993) دیده شده است. برخلاف بررسی‌های پیشین، با افزایش میزان CO_2، میزان تعرق در گیاهچه‌های ارکیده خربقی معمولی افزایش یافت. احتمالاً در اثر افزایش CO_2 تعداد روزنه‌ها افزایش یافته و همین موضوع موجبات افزایش تعرق در طول پسابیدگی را فراهم آورده است (Lake & Woodward, 2008).

نتیجه‌گیری کلی

ارکیده خربقی معمولی کشت بافتی مانند سایر گیاهان درون‌شیشه‌ای دارای سیستم فتوسنتزی ناقصی است و در نتیجه درصد زنده‌مانی پائینی دارد. افزایش میزان CO_2 در شرایط درون‌شیشه‌ای سبب افزایش کارایی فتوسیستم II فتوسنتزی (QYmax) در ارکیده خربقی معمولی شد. این افزایش نتیجه افزایش جذب CO_2 در این شرایط است. با افزایش QYmax در این گیاهچه‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

میزان رشد و طول ریشه تحت تأثیر آن افزایش یافت. همچنین افزایش CO_2، برخلاف انتظار، سبب افزایش میزان تعرق شده و این موضوع به نوبه خود احتمالاً از عوامل تقلیل‌دهنده سازگاری گیاهچه‌های خربقی معمولیِ حاصل از شرایط کشت بافت، در شرایط محیطی می‌باشد.

REFERENCES

1. Aliniaeifard, S. & van Meeteren, U. (2014). Natural variation in stomatal response to closing stimuli among Arabidopsis thaliana accessions after exposure to low VPD as a tool to recognize the mechanism of disturbed stomatal functioning. Journal of Experimental Botany, 65(22), 6529-6542 .
2. Arigita, L., González, A. & Tamés, R. S. (2002). Influence of CO_2 and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured in vitro. Physiologia Plantarum, 115(1), 166-173 .
3. Askari, N. (2016) .Aspects of bulblet growth of lily in vitro .wageningen university. PhD. thesis. ISBN:978-94-6257-760-2
4. Brainerd, K. & Fuchigami, L. (1982). Stomatal functioning of in vitro and greenhouse apple leaves in darkness, mannitol, ABA, and CO_2. Journal of Experimental Botany, 33(3), 388-392 .
5. Dangwal, L., Sharma, A., Kumar, N., Rana, C. & Sharma, U. (2010). Ethno-medico botany of some aquatic *Angiospermae* from North-West Himalaya. Researcher, 2(4), 49-54 .
6. Deng, R. & Donnelly, D. J. (1993). In vitro hardening of red raspberry by CO_2 enrichment and reduced medium sucrose concentration. HortScience, 28(10), 1048-1051 .
7. Desjardins, Y., Hdider, C. & de Riek, J. (1995). Carbon nutrition in vitro—regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems Automation and environmental control in plant tissue culture (pp. 441-471): Springer.
8. Dogan, Y., Baslar, S., Ay, G. & Mert, H. H. (2004). The use of wild edible plants in western and central Anatolia (Turkey). Economic Botany, 58(4), 684-690 .
9. Durchan, M., Vácha, F. & Krieger-Liszkay, A. (2001) .Effects of severe CO_2 starvation on the photosynthetic electron transport chain in *tobacco* plants. Photosynthesis research, 68(3), 203 .
10. Fast, G. (1976). *Moglichkeiten zur Massenvermehrung von Cypripedium calceolus und anderen europaischen Wildorchideen.* Paper presented at the Proceedings of the Eighth World Orchid Conference. Frankfurt, Germany: German Orchid Society (in German).
11. Galzy, R. & Compan, D. (1992). Remarks on mixotrophic and autotrophic carbon nutrition of *Vitis* plantlets cultured in vitro. Plant cell, tissue and organ culture, 31(3), 239-244 .
12. Genty, B., Briantais, J.-M. & Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 990(1), 87-92 .
13. Haisel, D., Pospíšilová, J., Synková, H., Čatský, J., Wilhelmová, N. & Plzáková, Š. (1999). Photosynthetic pigments and gas exchange of in vitro grown *tobacco* plants as affected by CO_2 supply. Biologia Plantarum, 42(3), 463-468 .
14. Hazarika, B. (2006). Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. Scientia Horticulturae, 108(2), 105-120 .
15. Hazarika, B., Parthasarathy, V. & Nagaraju, V. (2004). Influence of in vitro preconditioning of *Citrus* sp .microshoots with sucrose on their ex vitro establishment. Indian Journal of Horticulture, 61(1), 29-31 .
16. Kozai, T. (1991). Photoautotrophic micropropagation. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 27(2), 47-51 .
17. Kozai, T. (2010). Photoautotrophic micropropagation—environmental control for promoting photosynthesis. Prop Ornam Plants, 10, 188-204 .
18. Kozai, T., Iwabuchi, K., Watanabe, K. & Watanabe, I. (1991). Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets in vitro and changes in nutrient composition of the medium. Plant cell, tissue and organ culture, 25(2), 107-115 .
19. Kozai, T. & Iwanami, Y. (1988). Effects of CO_2 enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 57(2), 279-288 .
20. Kozai, T., Koyama, Y. & Watanabe, I. (1988). Multiplication of potato plantlets in vitro with sugar free medium under high photosynthetic photon flux. Paper presented at the Symposium on High Technology in Protected Cultivation 230.

www.SID.ir

Archive of SID

21. Kozai, T., Oki, H. & Fujiwara, K. (1987). Effects of CO_2 enrichment and sucrose concentration under high photosynthetic photon fluxes on growth of tissue-cultured *Cymbidium* plantlets during the preparation stage. Paper presented at the Symposium: Plant micropropagation in horticultural industries. Preparation, hardening and acclimatization processes, Arlon (Belgium), 10-14 Aug 1987.
22. Kozai, T., Takazawa, A., Watanabe, I. & Sugi, J. (1990). Growth of *tobacco* seedlings and plantlets in vitro as affected by in vitro environment. Environment Control in Biology, 28(2), 31-39 .
23. Lake, J. & Woodward, F. (2008). Response of stomatal numbers to CO_2 and humidity: control by transpiration rate and abscisic acid. New Phytologist, 179(2), 397-404 .
24. Mehler, A. H. (1951). Studies on reactions of illuminated chloroplasts: I. Mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents. Archives of Biochemistry and Biophysics, 33(1), 65-77 .
25. Moradi, S., Dianati daylami, S., Vahdati, K. & Arab, M. (2016). Effect of medium, explants and BA on somatic embryogenesis induction in tow Iranian native orchids. Journal of Plant Production Research, 22(4), 119-132 . (in Farsi)
26. Nguyen, Q. T. & Kozai, T. (2005). Photoautotrophic Micro-Propagation of Woody Species. In T. Kozai, F. Afreen & S. M. A. Zobayed (Eds.), Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System pp. Dordrecht: Springer Netherlands.
27. Nobel, P. (1991). Physiological and environmental plant physiology. Academic, New York .
28. Norikane, A., Teixeira da Silva, J. A. & Tanaka, M. (2013). Growth of in vitro *Oncidesa* plantlets cultured under cold cathode fluorescent lamps with super-elevated CO_2 enrichment. AoB Plants, 5, plt044 .
29. Pospisilova, J., Synková, H., Haisel, D. & Semorádová, S. (2007). Acclimation of Plantlets to *Ex Vitro* Conditions: Effects of Air Humidity, Irradiance, CO_2 Concentration and Abscisic Acid (a Review). Acta horticulturae, 748, 29 .
30. Reddy, A. R., Rasineni, G. K. & Raghavendra, A. S. (2010). The impact of global elevated CO_2 concentration on photosynthesis and plant productivity. Current Science, 46-57 .
31. Rkhis, A. C., Maalej ,M., Drira, N. & Standardi, A. (2011). Micropropagation of olive tree *Olea europaea* L.'Oueslati'. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 35(4), 403-412 .
32. Rybczyński, J. J., Borkowska, B., Fiuk, A., Gawrońska, H., Śliwińska, E. & Mikuła, A. (2007). Effect of sucrose concentration on photosynthetic activity of in vitro cultures *Gentiana kurroo* (Royle) germlings. Acta Physiologiae Plantarum, 29(5), 445-453 .
33. Saldanha, C. W., Otoni, C. G., Notini, M. M., Kuki, K. N., da Cruz, A. C. F., Neto, A. R., Otoni, W. C. (2013). A CO_2-enriched atmosphere improves in vitro growth of Brazilian ginseng *[Pfaffia glomerata (*Spreng*.) Pedersen*]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 49(4), 433-444 .
34. Schreiber, U. & Neubauer, C. (1990). O_2 dependent electron flow, membrane energization and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. Photosynthesis research, 25(3), 279-293 .
35. Solárová, J. & Pospíšilová, J. (1997). Effect of carbon dioxide enrichment during in vitro cultivation and acclimation to *ex vitro* conditions. Biologia Plantarum, 39(1), 23-30 .
36. Vahdati, K., Asayesh, Z. M., Aliniaeifard, S. & Leslie, C. (2017). Improvement of *Ex Vitro* Desiccation through Elevation of CO_2 Concentration in the Atmosphere of Culture Vessels during In Vitro Growth. HortScience, 52(7), 1006-1012 .
37. Xiao, Y., Niu, G. & Kozai, T. (2011). Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 105(2), 149-158 .

www.SID.ir