مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۲۴ شماره ۲ صفحه‌های ۲۷۵ تا ۲۸۶ (۱۴۰۲)
مقاله پژوهشی

تاثیر طول دوره کشت درون‌شیشه‌ای بر فتوسنتز گیاهچه‌های فالانوپسیس

Effect of *in vitro* Culture Period on the Photosynthesis of *Phalaenopsis amabilis* Plantlets

صدیقه شکری[۱]، علیرضا بابایی[۱*]، نیما احمدی[۱]، علی مختصی بیدگلی [۲] و ساسان علی‌نیائی‌فرد[۳]

۱. گروه علوم و مهندسی باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲. گروه زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. دانشکده فناوری کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (arbabaei@modares.ac.ir)
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۴/۲۸، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۱۹

چکیده

فالانوپسیس از گیاهان زینتی ارزشمند در دنیا می‌باشد. متداول‌ترین روش افزایش آن کشت درون‌شیشه‌ای است. در گیاهان کشت‌بافتی، فتوسنتز زیر تاثیر عوامل زیادی قرار می‌گیرد و نقش دقیق آن در رشد و نمو گیاهان کشت بافتی شناخته نشده است. در پژوهش حاضر، عملکرد فتوسنتزی بر اساس تبادل‌های گازی و فلورومتری در گیاهچه‌های فالانوپسیس (با سازوکار فتوسنتزی CAM اختیاری)، در شرایط درون‌شیشه‌ای در دو دوره زمانی ۲ هفته‌ای و ۸ هفته‌ای و در ۴ زمان مختلف در شبانه‌روز مورد بررسی قرار گرفت. هدف بررسی رفتار روزنه‌ای و عملکرد فتوسنتزی گیاهچه‌های فالانوپسیس در شرایط درون‌شیشه‌ای بود. یافته‌های تبادل‌های گازی و فلورومتری نشان دادند که میزان سرعت فتوسنتز و عملکرد کوانتومی گیاهچه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای به توانمندی گیاه در ایجاد سازگاری در یاخته‌های گیاهی نسبت به شرایط درون‌شیشه‌ای بستگی دارد. دوره کشت بلندمدت نسبت به دوره کوتاه‌مدت عملکرد فتوسنتزی و کوانتومی بهتری داشت و میزان فرونشست غیرفتوشیمیائی (NPQ) و هدررفت حرارتی کمتری مشاهده شد. عملکرد روزنه‌ها به دلیل قرارگیری طولانی‌مدت در رطوبت بالا مختل شده و تأثیر روزنه‌ها در فرایند فتوسنتز در گیاهچه‌ها به تقریب بی‌تأثیر بود. با توجه به یافته‌ها، گیاهچه‌های فالانوپسیس با سازوکار فتوسنتزی CAM اختیاری در شرایط درون‌شیشه‌ای، کنترل بهتری در رویارویی با شرایط تنش‌زا دارد و عملکرد فتوسنتزی و فیزیولوژیکی بهتری را نشان خواهد داد.

واژه‌های کلیدی: ارکید، تبادل‌های گازی، فتوسنتز، کشت بافت، کلروفیل فلئورسانس.

مقدمه

فالانوپسیس با نام علمی *Phalaenopsis amabilis*، از تیره ارکیدسانان[۱]، از جمله گیاهان تجاری ارزشمند با تنوع بسیار بالا و پرطرفدار در صنعت گل و گیاهان زینتی می‌باشد. یکی از مهمترین روش‌های افزایش تجاری این گیاه ریزافزایی می‌باشد. فتوسنتز مبنای تولید زیست‌توده با استفاده از انرژی نور خورشید در گیاه است. گیاهان دارای سه نوع فتوسنتزی C_3، C_4 و CAM[۲] می‌باشند؛ به طوری که بیشتر گیاهان از سازوکار فتوسنتزی C_3 پیروی می‌کنند؛ اما فالانوپسیس به طور معمول در الگوی جذب دی‌اکسیدکربن انعطاف‌پذیر بوده و دارای سازوکار فتوسنتزی CAM اختیاری (C3/CAM) می‌باشد؛ بدین معنی که گیاه در شرایط نامساعد و تنش‌زا توانایی تغییر و تبدیل سازوکار فتوسنتزی از C_3 به CAM را دارد (Luttge, 2004).

گیاهان کشت بافتی در مراحل سازگاری تلفات بالایی دارند و ارکیدها نیز اینگونه می‌باشند. عوامل گوناگونی، مانند نوع ریزنمونه، اندازه ریزنمونه، کیفیت نور و وجود قندهای مکمل در محیط بر ظرفیت فرآیند فتوسنتزی تأثیر می‌گذارد (Nguyen & Kozai, 1998؛ Rodrigues *et al.*, 2015). فتوسنتز در گیاهچه‌های کشت بافتی، زیر تاثیر شرایط محیط درون شیشه‌ای قرار

۱- Orchidaceae
۲- Crassulacean acid metabolism

می‌گیرد و به طور معمول گیاهچه‌های کشت بافتی سازگاریافته به دلایل مختلف مانند کاهش عملکرد فتوسنتزی، نسبت به گیاهان تکثیری به روش قدیمی دارای عملکرد رشدی و کیفی پایین‌تری خواهند بود (Triques *et al*., 1998).

در سیستم درون شیشه‌ای، کشت گیاهان در ظرف‌های کامل در بسته انجام می‌شود و سبب محدودیت در تبادل‌های گازی به ویژه اکسیژن و دی‌اکسیدکربن بین جو داخل شیشه و خارج آن می‌گردد (Karamzadeh *et al*., 2000). در مطالعه‌های متعددی مشخص شده است که به دلیل محدودیت تبادل‌های گازی، غلظت دی‌اکسیدکربن در ظرف‌های کشت حاوی ریزنمونه‌های کلروفیل‌دار، پس از کشت و شروع فتوسنتز، به شدت کاهش پیدا می‌کند و پس از مدت کوتاهی به غلظت پایدار می‌رسد که به طور چشمگیری کمتر از غلظت استاندارد دی‌اکسیدکربن جو (۳۵۰ پی‌پی‌ام) و بالاتر از نقطه جبران دی‌اکسیدکربن (۵۰ تا ۱۰۰ پی‌پی‌ام) می‌باشد (Karamzadeh *et al*., 2000؛ Nguyen & Kozai, 1998).

فتوسنتز، کربوهیدرات مورد نیاز برای سایر فرآیندهای گیاهی را فراهم می‌کند. ساکارز به عنوان یک منبع اصلی کربن در شرایط درون شیشه‌ای در اختیار گیاه قرار می‌گیرد و فتوسنتز در گیاه در این شرایط زیر تاثیر قرار می‌گیرد. این تغییر منجر به ایجاد تغییرهای آناتومیکی و فیزیولوژیکی مختلفی در برگ، روزنه و کاهش کیفیت گیاهچه‌های تولیدی و ایجاد سیستم ریشه‌ای ضعیف در گیاهچه‌ها می‌شود (Gago *et al*., 2021؛ Aliniaeifard *et al*., 2020). باز و بسته شدن روزنه‌ها، در ورود دی‌اکسیدکربن مورد استفاده در فتوسنتز و خروج بخار آب در فرآیند تعرق نقش دارد (Kozai, 1991). بیشتر مطالعه‌های میکروسکوپی انجام شده در گیاهان کشت بافتی نشان داده‌اند که ساختار روزنه در برخی از گیاهان کشت بافتی تفاوت چشمگیری با گیاهان رشدیافته در گلخانه دارد (Aliniaeifard *et al*., 2020؛ Kumar & Rao, 2012). بنابراین، بررسی عوامل مؤثر در بهبود کیفیت داخلی این گیاهان ضروری است.

ارزیابی فلئورسانس کلروفیل، یکی از رایج‌ترین روش‌ها برای مطالعه فرآیندهای فتوشیمیایی و فیزیولوژیکی مانند محتوای کلروفیل و یا فتوسنتز و تنفس در گیاهان می‌باشد که وضعیت و ظرفیت سیستم فتوسنتزی را از راه کارایی کوانتومی فتوسیستم دو (PSII) نشان می‌دهد (Murchie & Lawson, 2013). یکی از مهم‌ترین شاخص‌های فلئورسانس کلروفیل، عملکرد کوانتومی است که تخمینی از بیشینه PSII در یک شدت نور مشخص می‌باشد و زمانی که گیاه در شرایط تنش قرار می‌گیرد، عملکرد کوانتومی به دلیل افت فتوسنتز ناشی از اختلال در فعالیت فتوسیستم دو، کاهش می‌یابد و در نهایت سبب کاهش رشد گیاه می‌شود (Murchie & Lawson, 2013؛ Ritchie, 2006). روش فلئورسانس کلروفیل پیشتر برای گیاهان در شرایط آزمایشگاهی و ارزیابی فتوسنتز آزمایشگاهی موفق بوده است (Sun & Wang, 2018؛ Murchie & Lawson, 2013؛ Green *et al*., 1998).

در بررسی فلورومتری و اندازه‌گیری بازده کوانتومی فتوسیستم دو، نرخ کل فتوسنتز بر اساس زنجیره انتقال الکترون، محاسبه می‌شود و سایر متابولیسم‌های یاخته مانند تنفس تاریکی را در نظر نمی‌گیرد؛ بنابراین تنها با استفاده از فلورومتری، نمی‌توان نرخ خالص فتوسنتز را به دست آورد (Sun & Wang, 2018؛ Murchie & Lawson, 2013).

بررسی توانایی فتوسنتزی گیاهان بر پایه تبادل‌های گازی و با ارزیابی دی‌اکسیدکربن با حذف تنفس نوری امکان پذیر است (Sun & Wang, 2018؛ Hazrati *et al*., 2016؛ Beer *et al*., 2021). استفاده از دستگاه واکاوی فروسرخ به عنوان یک روش به طور کامل مناسب و کاربردی در بررسی تعرق، هدایت روزنه‌ای، نرخ خالص فتوسنتزی و کارایی مصرف آب می‌باشد و استفاده از این روش، در ترکیب با بررسی پارامترهای مربوط به کارایی فتوسیستم دو می‌تواند در تعیین نزادگان‌های متحمل به تنش‌ها به عنوان یک روش کاربردی مورد استفاده قرار گیرد (Ramazan *et al*., 2021). با توجه به مطالعه‌های موجود در زمینه فتوسنتز، بررسی‌های محدودی درباره فتوسنتز گیاهان، مانند فالانوپسیس در شرایط درون‌شیشه‌ای صورت گرفته است و بنابراین هدف پژوهش حاضر، بررسی رفتار فتوسنتزی فالانوپسیس (با سازوکار فتوسنتزی CAM اختیاری)، در شرایط درون‌شیشه‌ای در دوره زمانی کوتاه‌مدت و بلندمدت با تاکید بر پارامترهای مربوط به روزنه، تبادل‌های گازی و کلروفیل فلئورسانس بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

گیاهچه‌های فالانوپسیس تولیدشده در شرایط درون‌شیشه‌ای دارای دست‌کم دو برگ کامل توسعه یافته، به طور تصادفی انتخاب و به محیط تازه منتقل شدند. محیط کشت مورد استفاده در تیمارهای آزمایشی، محیط موراشیگ و اسکوگ (MS)

نیم‌غلظت، حاوی ساکارز دو درصد و آگار ۰/۶درصد بود. برای جلوگیری از تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر شرایط آزمایش، هیچ تنظیم‌کننده رشدی در این پژوهش استفاده نشد. در هر تیمار، ۳۰ ظرف حاوی یک گیاهچه کامل جهت بررسی پارامترهای مختلف، به کار رفت. نمونه‌ها در دوره نوری ۱۶:۸ ساعت، چگالی شار فوتون فتوسنتزی[۱] ۳۰۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)، دمای ۱۸:۲۴ درجه سلسیوس در روز و شب و رطوبت نسبی ۶۰ درصد قرار گرفتند. تیمارهای مورد بررسی، دو دوره زمانی کوتاه‌مدت (دو هفته) و بلندمدت (هشت هفته) در شرایط کنترل‌شده و درون‌شیشه‌ای بود. پس از گذشت این دروه‌های زمانی، نمونه‌برداری برای اندازه‌گیری کربوهیدرات کل، محتوای کلروفیل و کاروتنوئید و بررسی پارامترهای مربوط به تبادل‌های گازی در چهار ساعت مختلف در شبانه‌روز (دو ساعت پس از روشنایی، هشت ساعت پس از روشنایی، پانزده ساعت پس از روشنایی و چهار ساعت پس از تاریکی) صورت گرفت. برای پارامترهای مربوط به فلئورسانس کلروفیل بررسی‌ها تنها در دو دوره زمانی دو و هشت هفته‌ای صورت گرفت.

پارامترهای مربوط به تبادل‌های گازی

پارامترهای مربوط به تبادل‌های گازی، شامل نرخ خالص فتوسنتزی (P_{net})، نرخ تعرق (E)، هدایت روزنه‌ای (g_s)، غلظت دی‌اکسیدکربن درون یاخته‌ای (Ci)، نسبت غلظت دی‌اکسیدکربن درون یاخته‌ای به غلظت دی‌اکسیدکربن جو (Ci/Ca)، کاهش فشار بخار بر اساس دمای برگ (VPDL[۲]) و کارایی مصرف آب لحظه‌ای (WUE[۳]) با استفاده از دستگاه فتوسنتزی قابل حمل (Li-6400XT Portable Photosynthesis System, Li-Cor Inc.) اندازه‌گیری شدند. رطوبت هوا در محفظه برگ حدود ۸۰٪ و غلظت دی‌اکسیدکربن ($\mu mol.mol^{-1}$) ۳۸۰-۳۷۰ بود. دمای محفظه برگ ۲۸-۲۵ درجه سلسیوس بود.

پارامترهای مربوط به کلروفیل فلئورسانس

برای ارزیابی کلروفیل فلئورسانس از دستگاه عکسبرداری فلئورسانس کلروفیل فلئورکم Photon Systems Instruments, PSI, Czech Republic آزمایشگاه فتوسنتز و واکنش‌های نوری گروه علوم باغبانی دانشکده فناوری کشاورزی دانشگاه تهران استفاده شد. اندازه‌گیری‌ها در ساعت مشخصی از روز (بین ساعت ۱۲ تا ۱۵) انجام شد. پیش از شروع ارزیابی، ظرف‌های حاوی گیاهچه‌های کامل، به مدت سی دقیقه در تاریکی کامل قرار گرفتند. پس از سازگاری با تاریکی، تمام گیاهان بی‌درنگ پس از خروج از شرایط درون‌شیشه‌ای، برای ارزیابی مورد استفاده قرار گرفتند. دستگاه فلئورکم شامل یک دوربین CCD و چهار پنل LED ثابت بود که یک جفت پالس[۴]های اندازه‌گیری را تامین می‌کرد و جفت بعدی نور اکتینیک[۵] و فلاش اشباع‌کننده را تامین می‌کرد. محاسبه بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم دو (Fv/Fm) با استفاده از یک پروتکل شخصی‌سازی شده محاسبه شد (Genty *et al*., 1989). تصاویر در طول فلش‌های اندازه‌گیری کوتاه در تاریکی ثبت شدند. در پایان فلاش‌های کوتاه، نمونه‌ها در معرض یک پالس نور اشباع (۳۹۰۰ میکرومول در متر مربع بر ثانیه) قرار گرفتند که منجر به اشباع گذرا از فیتوشیمی و کاهش گیرنده‌های کینون اولیه[۶] در فتوسیستم دو شد (Genty *et al*., 1989). پس از رسیدن به فلئورسانس پایدار، دو سری متوالی از داده‌های فلئورسانس دیجیتالی شدند. میانگین یکی از آن‌ها در طول فلاش‌های کوتاه در تاریکی (F0) و دیگری در طول فلاش نور اشباع (Fm) به دست آمد. فلئورسانس متغیر (Fv) از معادله زیر محاسبه شد:

$$Fv=Fm-F0$$

سطح فلئورسانس لحظه‌ای در زمان t (Ft)، سطح فلئورسانس پایه (F0′)، فلئورسانس متغیر (Fv′) و فلئورسانس بیشینه (Fm′) در شرایط روشنایی نیز توسط دستگاه ثبت شد.

بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیسم دو در تاریکی از راه نسبت بین فلئورسانس متغیر بر بیشینه فلئورسانس اشباع در تاریکی به دست آمد:

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

برای محاسبه خاموشی غیرفیتوشیمیایی (NPQ)، ضریب خاموشی فیتوشیمیایی (qP)، تخمین مراکز باز فتوسیستم دو (qL) و بیشینه بازده کوانتومی فتوسیستم دو (ΦPSII) نیز از معادله‌های زیر استفاده شد (Maxwell & Johnson, 2000).

$$NPQ = (Fm/Fm') - 1$$
$$qP = (Fm'-Ft)/(Fm'-Fo')$$

۱- Photosynthetic Photon Flux Density (PPFD) ۲- Vapor Pressure Deficit Leaf ۳- Water Usage Effectiveness

۴- Pulse ۵- Actinic light ۶- Primary quinone acceptor

$\Phi PSII = (Fm'-Ft)/Fm'$

بررسی‌های بیوشیمیایی

به منظور بررسی محتوای کلروفیل و کارتنوئید، از دستکم دو برگ کامل توسعه‌یافته در هر کدام از گیاهچه‌ها استفاده شد. نمونه‌های برگی جدا شده در نیتروژن مایع به طور کامل پودر شده و عصاره‌گیری براساس روش وارن (۲۰۰۸) انجام و عصاره متانولی استخراج شد (Warren, 2008). عصاره متانولی استخراج‌شده، به منظور اندازه‌گیری میزان محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل مورد استفاده قرار گرفت. محدوده رنگدانه‌ها با اندازه‌گیری جذب اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۶۵۲ و ۶۶۵ نانومتر با استفاده از خوانشگر میکروپلیت فتومتریک (Microplate Spectrophotometer, BioTek, Epoch) مبتنی بر تک رنگ با پهنای باند ۲/۴ نانومتر تعیین شد. محتوای کلروفیل به صورت میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ (mg/g FW) بیان شد (Ritchie, 2006).

برای اندازه‌گیری کربوهیدرات کل، عصاره اتانولی نمونه‌های برگی پودرشده در نیتروژن مایع با روش فنول-سولفوریک اسید استخراج شد و بررسی روی آن صورت گرفت (Masuko *et al*., 2005). محتوای کربوهیدرات کل (mg/g FW) با منحنی استاندارد محاسبه شد.

ویژگی‌های روزنه

برای بررسی ویژگی‌های روزنه‌ای در گیاهان کشت بافتی در دوره‌های زمانی مختلف کشت در شرایط درون‌شیشه‌ای، اپیدرم سطح زیرین برگ با یک لایه نازک لاک بی‌رنگ پوشانده شد. پس از خشک شدن لاک روی اپیدرم، با استفاده از نوار چسب شفاف لایه اپیدرم برگ جدا و روی لام شیشه‌ای چسبانده و به کمک میکروسکوپ نوری Olympus با بزرگنمایی 40X عکسبرداری و مورد بررسی قرار گرفت. روزنه‌ها در سطح لایه اپیدرمی به طور تصادفی انتخاب شدند. در هر واحد آزمایشی، جدیدترین برگ روی گیاه که به طور کامل رشد کرده بود در ۵ گیاه مختلف برای هر تیمار استفاده شد. در هر تیمار آزمایشی بین ۴۰ تا ۵۰ روزنه مورد بررسی قرار گرفت و ویژگی‌هایی مانند طول روزنه، عرض روزنه، نسبت طول به عرض شکاف روزنه، مساحت روزنه و شاخص روزنه توسط نرم‌افزار Image J (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD; http://imagej.nih.gov/ij/) اندازه‌گیری شد. برای محاسبه شاخص روزنه از معادله زیر استفاده شد (Aliniaeifard & Meeteren, 2014):

$$\text{شاخص روزنه} = \frac{\text{تراکم روزنه} \times ۱۰۰}{\text{تراکم روزنه} + \text{تراکم یاخته‌های اپیدرمی و نگهبان}}$$

واکاوی آماری داده‌ها

آزمایش به صورت فاکتوریل (دو دوره زمانی و چهار زمان مختلف از شبانه روز) در قالب طرح به طور کامل تصادفی با سه تکرار در هر واحد آزمایشی پیاده‌سازی شد. تمامی مراحل آماری و واکاوی طرح با استفاده از نرم افزار SAS 9.4 انجام شد. پیش از تجزیه واریانس، نرمالیتی باقیمانده‌ها با استفاده از رویه Univariate بررسی شد. تجزیه واریانس با استفاده از رویه مدل خطی عمومی (GLM) و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون کمینه تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد انجام شدند. رسم نمودارها با استفاده از مایکروسافت اکسل انجام شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که برهمکنش دوطرفه معنی‌داری بین زمان‌های مختلف شبانه‌روز و دوره کشت در شرایط درون‌شیشه‌ای بر پارامترهای محتوای کارتنوئید، کلروفیل کل، نسبت کلروفیل a به کلروفیل b و تمام پارامترهای مربوط به عملکرد روزنه‌ها وجود داشت. همچنین، اثر معنی‌دار طول دوره کشت بر P_{net}، Ci و Ci/Ca در آزمایش مشاهده شد. در آزمایش حاضر، محتوای کربوهیدرات کل تنها زیر تاثیر زمان نمونه‌برداری در زمان‌های مختلف شبانه‌روز قرار گرفت. تجزیه واریانس داده‌های مربوط به کلروفیل فلئورسانس نشان داد، اثر طول دوره کشت در شرایط درون‌شیشه‌ای بر تمام پارامترهای مربوط به کلروفیل فلئورسانس به جز ضریب خاموشی فتوشیمیایی (qP) غیرمعنی‌دار بود. تجزیه واریانس داده‌های مربوط به روزنه‌ها نشان

داد که اثر طول دوره کشت و زمان‌های مختلف شبانه‌روز و اثر برهمکنش آن‌ها، تفاوت معنی‌داری را در هدایت روزنه‌ای، تعرق و کارایی مصرف آب نداشت.

نرخ خالص فتوسنتز (P_{net})

نرخ خالص فتوسنتزی در دوره زمانی کوتاه‌مدت، به طور معنی‌داری بیشتر از دوره کشت بلندمدت بود (شکل ۱-a). در پژوهش‌های متعددی مشخص شد که تبادل گاز در شرایط درون‌شیشه‌ای، بسیار محدود است (Karamzadeh *et al*., 2000؛ Nguyen & Kozai, 1998) و در طی زمان غلظت دی‌اکسیدکربن پس از یک شیب نزولی، ثابت می‌ماند و به یک غلظت پایدار می‌رسد. این غلظت کمی بالاتر از نقطه جبران دی‌اکسیدکربن و بسیار کمتر از غلظت دی‌اکسیدکربن جو می‌باشد. بنابراین در چنین غلظت کم دی‌اکسیدکربن در ظرف‌های کشت، نرخ فتوسنتز خالص گیاهچه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای کم خواهد بود (Karamzadeh *et al*., 2000؛ Kozai, 1991؛ Nguyen & Kozai, 1998). در گیاهچه‌های فالانوپسیس میزان فتوسنتز در زمان‌های مختلف شبانه‌روز هیچ تفاوت معنی‌داری نشان نداد، اما بیشترین میزان فتوسنتز صرف نظر از معنی‌داری، در شب اتفاق افتاد. گیاه فالانوپسیس یک گیاه با عملکرد فتوسنتزی CAM اختیاری است و زمانی که در شرایط تنش قرار می‌گیرد، نوع سازوکار فتوسنتز را تغییر می‌دهد (Luttge, 2004؛ Pollet *et al*., 2009). این نتایج نشان داد هنگامیکه گیاهچه‌های فالانوپسیس در مدت زمان کوتاهی در شرایط درون‌شیشه‌ای قرار می‌گیرد، گیاهچه‌ها هنوز سازگاری نسبی با شرایط رطوبتی بالا پیدا نکردند و تفاوتی در عملکرد فتوسنتزی گیاهچه‌ها در زمان‌های مختلف شبانه‌روز مشاهده نمی‌شود.

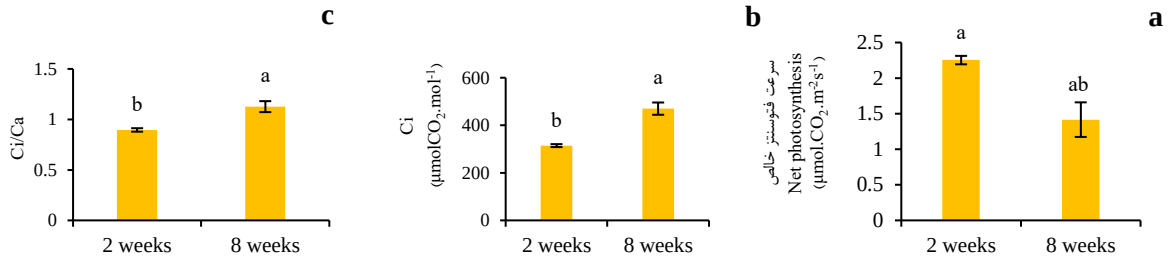
تبادل‌های گازی (Ci، Ci/Ca، هدایت روزنه‌ای، تعرق و WUE)

بیشترین میزان Ci در دوره بلندمدت (شکل ۱-b) و در انتهای روز به دست آمد و کمترین میزان در تاریکی مشاهده شد (شکل ۲). نسبت Ci/Ca نیز به طور چشمگیری زیر تأثیر طول دوره کشت قرار گرفت و در دوره کشت بلندمدت بیشتر از دوره کشت کوتاه‌مدت بود (شکل ۱-c). قرار گرفتن بلندمدت در شرایط درون‌شیشه‌ای، موجب ایجاد تغییرهای ظاهری در یاخته‌های گیاهی می‌شود (Green *et al*., 1998؛ Ghanbari *et al*., 2019؛ Karamzadeh *et al*., 2000). تغییرهای ظاهری بیشتر در یاخته‌های برگ در دیواره یاخته‌ای رخ می‌دهد و باعث ضخیم شدن یاخته‌ها می‌شود. به دلیل محدودیت جریان دی‌اکسیدکربن بین یاخته‌ای، کارایی تثبیت دی‌اکسیدکربن در ساعت‌های تاریکی افزایش می‌یابد (Kozai, 1991؛ Fujiwara & Kozai, 1995) که با نتیجه به دست آمده در پژوهش حاضر همخوانی دارد. در بررسی Busch و همکاران نشان داده شد که برخی از گیاهان مانند برنج (*Oryza sativa*) و گندم (*Triticum aestivum*) می‌توانند از راه یک سازوکار درونی، اثرهای بازدارندگی تنفس نوری را کاهش داده و با تثبیت موقعیت کلروپلاست‌ها موجب بسته‌شدن جریان CO_2 تنفس نوری از سیتوزول به فضای بین یاخته‌ای شود و در نتیجه سرعت بالای تنفس نوری در این گیاهان را از این راه متعادل کند. در این حالت، CO_2 دوباره وارد کلروپلاست می‌شود و در نتیجه جذب کربن فتوسنتزی افزایش پیدا می‌کند (Busch *et al*., 2012).

کارایی مصرف آب (WUE)، میزان تعرق و هدایت روزنه‌ای در این بخش از پژوهش زیر تأثیر دوره‌های کشت قرار نگرفت و اثر هر دو دوره زمانی کشت در شرایط درون‌شیشه‌ای بر این پارامترها غیرمعنی‌دار بود. صرف‌نظر از بررسی آماری، میزان تعرق و هدایت روزنه‌ای در دوره کشت بلندمدت نسبت به دوره کشت کوتاه‌مدت بالاتر بود. همینطور در ساعت‌های انتهایی روز میزان بالاتری نسبت به ساعت‌های ابتدایی روز نشان داد. هوای درون ظرف‌های کشت اغلب رطوبت نسبی اشباع دارند، بنابراین میزان تعرق در برگ‌ها در رطوبت به تقریب ۱۰۰ درصد بسیار کم می‌باشد و به راحتی می‌تواند روابط آبی گیاهچه‌ها در ظرف‌های کشت را زیر تأثیر قرار دهد (Karamzadeh *et al*., 2000؛ Kozai, 1991؛ Fujiwara & Kozai, 1995؛ Tiwari *et al*., 1998).

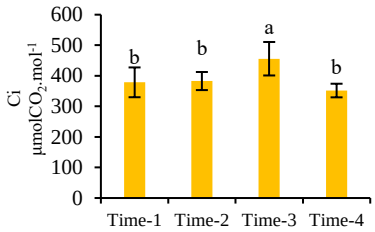
میزان تعرق در گیاهان با میزان VPD [۱] و سطح کل برگ متناسب است (Fujiwara & Kozai, 1995). به همین ترتیب، بالاترین میزان کارایی مصرف آب صرف نظر از بررسی آماری، در دوره کوتاه‌مدت و در تاریکی مشاهده شد که می‌تواند تا حدودی بیانگر بسته شدن روزنه‌ها در شب برای این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای باشد و با نتایج مربوط به هدایت روزنه‌ای و تعرق همخوانی داشت. رطوبت نسبی بالا موجب رشد ضعیف گیاهچه و نابسامانی‌های ساختارهای فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در گیاهچه‌ها شده و سرانجام منجر به تأثیر روی روزنه‌ها می‌شود (Aliniaeifard *et al*., 2020؛ Ghanbari *et al*., 2019).

۱- Vapor Pressure Deficit



شکل ۱- اثر طول دوره کشت بر سرعت فتوسنتز خالص (الف)، غلظت دی‌اکسیدکربن درون یاخته‌ای (ب) و نسبت غلظت دی‌اکسیدکربن درون یاخته‌ای به دی‌اکسیدکربن سطح یاخته (پ) در گیاهچه‌های فالانوپسیس در شرایط درون شیشه‌ای.

Fig. 1. Effects of culture period on the net photosynthesis (a), intracellular CO_2 concentration (b), and Ci/Ca (c) of *Phalaenopsis amabilis* plantlets under *in vitro* conditions.



شکل ۲- غلظت دی‌اکسید کربن درون یاخته‌ای (Ci) در زمان‌های مختلف شبانه‌روز در گیاهچه‌های فالانوپسیس در شرایط درون شیشه‌ای.

Fig. 2. Intracellular CO_2 concentrations of *Phalaenopsis amabilis* plantlets at different day and night times under *in vitro* conditions.

عملکرد روزنه‌ها

بیشترین طول و عرض روزنه در در هر دو دوره کشت در ساعت‌های اولیه روز (۲ ساعت پس از روشنایی) و کمترین میزان آن، در دوره کوتاه‌مدت در تاریکی و در دوره بلندمدت در ساعت‌های پایانی روز (۱۵ ساعت پس از روشنایی) مشاهده شد (جدول ۱). طی بررسی نسبت طول به عرض شکاف روزنه مشاهده شد که در دوره کوتاه‌مدت بالاترین نسبت در میانه روز (۸ ساعت پس از روشنایی) می‌باشد و روزنه‌های بیشتری در ابتدای روز باز بودند. اما در دوره بلندمدت، واکنش روزنه‌ها به طور کامل متفاوت بود. بیشترین نسبت طول به عرض شکاف روزنه‌ها در تاریکی و همچین در ساعت‌های اولیه روز مشاهده شد (جدول ۱). این نشان‌دهنده بسته بودن روزنه در تاریکی و در شب در دوره کشت بلندمدت برای گیاهچه‌ها می‌باشد. این در حالیست که بیشترین میزان فتوسنتز در گیاهچه‌ها در دوره کوتاه مدت در شب مشاهده شده بود. این نتیجه به احتمال بیانگر عدم تأثیر روزنه بر فرآیند فتوسنتز در گیاهچه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌باشد. این امر پیشتر در مطالعه‌های دیگری نیز به اثبات رسیده بود (Kozai, 1991؛ Aliniaeifard *et al.*, 2020؛ Nguyen & Kozai, 1998). شمار روزنه‌های بیشتری در دوره بلندمدت در ساعت‌های ابتدایی روز و تاریکی بسته بودند که با نتایج به دست آمده در بررسی تعرق و هدایت روزنه‌ای هم‌راستا می‌باشد. همانطور که در بررسی نتایج مربوط به تعرق نیز مشاهده شد، فعالیت و عملکرد روزنه‌های گیاه در رویارویی با شرایط رطوبتی بالا تا حد زیادی مختل می‌شود و عامل اصلی اختلال در عملکرد روزنه قرارگیری طولانی مدت گیاهان در رطوبت نسبی بالا می‌باشد؛ در نتیجه واکنش بسیار محدودی توسط گیاه، در رویارویی با تیمارهای آزمایشی در شرایط درون شیشه‌ای مشاهده شد. این امر در پژوهش‌های زیادی مورد تائید قرار گرفت و نتایج پژوهش حاضر نیز در این راستا می‌باشند (Karamzadeh *et al.*, 2000؛ Nguyen & Kozai, 1998؛ Aliniaeifard & Meeteren, 2014).

جدول ۱- مقایسه میانگین عملکرد روزنه‌ها در چهار زمان مختلف شبانه‌روز (زمان اول: دو ساعت پس از روشنایی؛ زمان دوم: هشت ساعت پس از روشنایی؛ زمان سوم: ۱۵ ساعت پس از روشنایی؛ زمان چهارم: ۴ ساعت پس از تاریکی) در دو دوره کشت کوتاه‌مدت (۲ هفته) و دوره کشت بلندمدت (۸ هفته) در گیاهچه‌های فالانوپسیس در شرایط درون‌شیشه‌ای.

Table 1. Mean comparison of stomatal function at four times of the day and night (time 1: 2 hours after light; time 2: 8 hours after light; time 3: 15 hours after light; time 4: 4 hours after dark) in short-term (2 weeks) and long-term (8 weeks) culture period in *Plalaenopsis amabilis* plantlets under *in vitro* conditions.

		طول روزنه Stomata length (µm)	عرض روزنه Stomata width (µm)	نسبت طول به عرض شکاف روزنه Length to width of pore ratio (µm)	ضخامت روزنه Stomata thickness (µm)	مساحت روزنه Stomata area (μm^2)	شاخص روزنه Stomata index
دو هفته 2 weeks	زمان اول Time-1	35.555^{a}	27.674^{a}	0.482^{bc}	5.458^{a}	817.020^{a}	0.728^{a}
	زمان دوم Time-2	33.971^{ab}	24.382^{b}	0.572^{a}	4.295^{b}	695.075^{bc}	0.563^{b}
	زمان سوم Time-3	34.105^{ab}	26.436^{ab}	0.525^{ab}	4.781^{ab}	747.030^{ab}	0.744^{a}
	زمان چهارم Time-4	31.839^{b}	24.184^{b}	0.458^{c}	3.904^{b}	626.873^{b}	0.734^{a}
هشت هفته 8 weeks	زمان اول Time-1	35.416^{a}	25.640^{a}	0.554^{a}	5.600^{a}	762.714^{b}	0.579^{b}
	زمان دوم Time-2	32.698^{b}	23.246^{b}	0.522^{ab}	4.051^{b}	662.218^{c}	0.757^{a}
	زمان سوم Time-3	28.666^{c}	18.505^{c}	0.463^{b}	5.460^{a}	486.233^{d}	0.717^{a}
	زمان چهارم Time-4	36.426^{a}	25.827^{a}	0.562^{a}	5.554^{a}	851.747^{a}	0.506^{c}

میانگین های دارای حرف‌های مشابه در هر ستون مربوط به هر دوره تفاوت معنی‌داری با هم ندارند. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفته است.

Means with the same letters in each column are not significantly different based on LSD Test at the 5% level of probability.

بر اساس نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر، شاخص روزنه و مساحت روزنه در دوره کوتاه‌مدت بیشتر از دوره بلندمدت بود. در طول دوره رشد، رطوبت نسبی بالای محیط در شرایط دون شیشه‌ای، اندازه و شاخص روزنه را زیر تاثیر قرار می‌دهد (Maleki Asayesh *et al*., 2021؛ Kozai, 1991). این امر می‌تواند تا حدودی عامل تعرق و هدایت روزنه‌ای بالاتر گیاهچه‌های رشدیافته در شرایط رطوبت نسبی بالا باشد (Aliniaeifard & Meeteren, 2014). رطوبت نسبی بالا در بلند مدت موجب رشد ضعیف گیاهچه و نابسامانی‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در گیاهچه‌ها می‌شود (Ghanbari *et al*., 2019؛ Fujiwara & Kozai, 1995؛ Kozai, 1991؛ Nguyen & Kozai, 1998؛ Tiwari *et al*., 1998). در کنار سایر عامل‌های محیطی مؤثر بر عملکرد روزنه‌ها، مدت زمان قرارگیری گیاه در شرایط درون‌شیشه‌ای با رطوبت نسبی بسیار بالا و VPD به تقریب برابر با صفر، می‌تواند عملکرد روزنه را در پاسخ به محرک‌های بسته شدن روزنه‌ها کاهش دهد (Aliniaeifard & Meeteren, 2014). این نابسامانی‌های مورفولوژیکی ویژه در عملکرد روزنه در گیاهان درون‌شیشه‌ای در مطالعه‌های زیادی نشان داده شده‌اند (Maleki Asayesh *et al*., 202). دوره‌های کشت بلندمدت در شرایط آزمایشگاهی بر فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای، عملکرد کوانتومی و سایر پارامترها تأثیر می‌گذارند (Ghanbari *et al*., 2019؛ Hazrati *et al*., 2016). در دوره کشت بلندمدت به دلیل انطباق‌پذیری بالاتر گیاهچه‌های فالانوپسیس نسبت به شرایط درون‌شیشه‌ای و فرصت کافی جهت تغییر آناتومی، تأثیر بر عملکرد روزنه‌ها، شمار، مساحت و تراکم روزنه‌ها همسو با نتایج به دست آمده در پارامترهای مربوط به فتوسنتز بود.

بازده کوانتومی فتوشیمیایی مؤثر در فتوسیستم دو

با توجه به نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر، بازده کوانتومی فتوسیستم دو در گیاهچه‌های فالانوپسیس هیچ تفاوت معنی‌داری در دو دوره کشت بلندمدت و کوتاه‌مدت در شرایط درون شیشه‌ای نشان نداد. بررسی وضعیت فتوسنتز یک معیار قابل اعتماد برای ارزیابی سازگاری گیاهان با شرایط محیطی پیرامون آن‌هاست (Maxwell & Johnson, 2000؛ Beer *et al*., 2021؛ Ramazan *et al*., 2021). با پارامترهای کلروفیل فلئورسانس می‌توان تفاوت اصلی بین فیزیولوژی شب و روز در گیاه فالانوپسیس را نشان داد (Pollet *et al*., 2009). جریان الکترون‌ها در فتوسیستم بیانگر بررسی سرعت فتوسنتز است و اندازه‌گیری فلئورسانس کلروفیل با تخمین شیوه عملکرد فتوسنتز امکان‌پذیر است (Fracheboud & Leipner, 2003). اندازه‌گیری بازده کوانتومی فتوسیستم دو (ΦPSII)، ظرفیت فتوسنتزی ناخالص فتوسنتز را به ما می‌دهد، زیرا فلورومتری، برخلاف اندازه‌گیری‌های تبادل‌های گازی، تنفس نوری (میتوکندری) و سایر اجزای متابولیسم یاخته‌ای را در نظر نمی‌گیرد و تنها زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی را در نظر می‌گیرد (Ramazan *et al*., 2021؛ Maxwell & Johnson, 2000؛ Green *et al*., 1998).

با فرض نادیده گرفتن مؤلفه تشکیل گرما، یک رابطه معکوس بین سرعت فتوسنتز و کلروفیل فلئورسانس وجود دارد (Beer *et al*., 2021؛ Hikosaka & Noda, 2018). هر چه فرآیند فتوسنتز کارایی کمتری داشته باشد، انرژی بیشتری برای تولید فلئورسانس باقی می‌ماند و هر چه فتوسنتز موثرتر باشد، انرژی کمتری به عنوان فلئورسانس تلف می‌شود. بنابراین، می‌توان از یک رابطه معکوس بین فتوسنتز و فلئورسانس برای تخمین عملکرد فتوسنتزی استفاده نمود (Beer *et al*., 2021). در بررسی فتوسنتز گیاه فالانوپسیس توسط Pollet و همکاران (۲۰۰۹) کاهش qP و ΦPSII و افزایش NPQ در انتقال از روز به شب مشاهده شد که مربوط به خاتمه انتقال الکترون فتوسنتزی به دلیل غیرفعال شدن چرخه کالوین است (Pollet *et al*., 2009). مقدار بازده کوانتومی نشان‌دهنده بیشینه بازده کوانتومی فتوسیستم دو است که می‌تواند به عنوان استانداردی برای شیوه عملکرد فتوسنتز استفاده شود (Murchie & Lawson, 2013؛ Maxwell & Johnson, 2000؛ Beer *et al*., 2021؛ Hazrati *et al*., 2016). در نتیجه، میزان کاهش عملکرد کوانتومی یا تغییرهای فلئورسانس برای اندازه‌گیری درجه تحمل به تنش در نژادگان‌های مختلف استفاده می‌شود. فتوسیستم دو به بازدارنده‌های محیطی و تنش بسیار حساس است (Fracheboud & Leipner, 2003؛ Hazrati *et al*., 2016).

بررسی کلروفیل فلئورسانس

بر اساس واکاوی داده‌های موجود، هیچ تفاوت معنی‌داری در شرایط پژوهش در F0، Fm، Fv، QYmax و Fv'/Fm'، NPQ، qN و Rfd مشاهده نشد. مقدار QYmax و Fv'/Fm' نمی‌تواند نرخ فتوسنتز را تخمین بزند و تنها می‌تواند به عنوان یک معیار برای تنش‌های دمایی، نوری، شوری و غیره استفاده شود (Beer *et al*., 2021؛ Maxwell & Johnson, 2000؛ Ramazan *et al*., 2021). برای گونه‌های مختلف گیاهی مانند ذرت، آفتابگردان، سوسن، یونجه و درختان پهن‌برگ تغییرهای روزانه فتوسنتز با Fv/Fm ارتباط معناداری را نشان نداد (Sun & Wang, 2018). کارایی فتوسنتز به شرایط محیطی گیاه بستگی دارد (Maxwell & Johnson, 2000؛ Hikosaka & Noda, 2018). گیاهان در شرایط طبیعی به سرعت در برابر تغییرهای مختلف قرار می‌گیرند و سازوکارهای سازگاری متفاوتی را برای مدیریت تنش‌ها، استفاده مؤثر از انرژی نورانی و به کمینه رساندن آسیب به دستگاه فتوسنتزی به کار می‌گیرند (Hikosaka & Noda, 2018؛ Hazrati *et al*., 2016؛ Baker, 2008). کاهندگی غیرفتوشیمیایی سازوکار مهمی در گیاهان است که انرژی نورانی زیادی را به صورت گرما از گیاه دفع می‌کند (Maxwell & Johnson, 2000؛ Muller *et al*., 2001) و به عنوان یک روش مهم برای سازگاری گیاهان با تنش‌های سنگین مطرح شده است (Muller *et al*., 2001؛ Karamzadeh *et al*., 2000؛ Hazrati *et al*., 2016). در گیاهچه‌های فالانوپسیس هیچ تفاوت آماری معنی‌داری در هدررفت گرما بین دوره کشت کوتاه‌مدت و بلندمدت مشاهده نشد (جدول ۲). هنگامی که گیاهچه‌ها در شرایط آزمایشگاهی قرار می‌گیرند، پیش از رسیدن به مرحله سازگاری نسبی با رطوبت بالا، نور کمتر و وجود قند در محیط، هدررفت گرما را نشان می‌دهند (Pollet *et al*., 2009؛ Ramazan *et al*., 2021؛ Muhammad *et al*., 2021؛ Fracheboud & Leipner, 2003). عدم سازگاری نسبی با شرایط موجود منجر به قرار گرفتن گیاه در شرایط تنش و کاهش عملکرد فتوسنتزی می‌شود که به احتمال به دلیل نابسامانی در زنجیره انتقال الکترون در فتوسیستم دو می‌باشد و با هدررفت گرمایی بالایی نیز همراه خواهد بود (Pollet *et al*., 2009). ضریب qP زیر تأثیر دوره کشت در شرایط درون‌شیشه‌ای قرار گرفت و بالاترین میزان qP در فالانوپسیس در دوره بلند مدت

نسبت به دوره کوتاه مدت بود (جدول ۲). اگر سطح qP بالا باشد، نشان‌دهنده استفاده بهینه از انرژی فتوشیمیایی در متابولیسم کربن (مانند تنفس نوری) است (Fracheboud & Leipner, 2003). در گیاهان سازگاریافته و متحمل به شرایط موجود، qP و ΦPSII بالا و هدررفت گرمایی کم می‌باشد و در گیاهان زیر تنش، برعکس است (Fracheboud & Leipner, 2003؛ Murchie & Lawson, 2013؛ Pollet *et al*., 2009؛ Ramazan *et al*., 2021). با توجه به نتایج موجود، تنش در دوره کشت بلندمدت برای گیاهچه‌های فالانوپسیس بیشتر از دوره کشت کوتاه‌مدت بود. شاخص‌های qP و Fv/Fm اطلاعاتی در مورد فرآیندهای زیرساختی فتوسنتز به ما می‌دهند که کارایی فتوسنتز را زیر تأثیر قرار می‌دهند، درحالیکه ΦPSII با عملکرد به دست آمده مرتبط است (Baker, 2008؛ Ramazan *et al*., 2021؛ Murchie & Lawson, 2013).

جدول ۲- مقایسه میانگین پارامترهای کلروفیل فلئورسانس در دوره کشت کوتاه‌مدت (۲ هفته) و بلندمدت (۸ هفته) در گیاهچه‌های فالانوپسیس در شرایط درون‌شیشه‌ای.

Table 2. Mean comparison of chlorophyll fluorescence parameters in short-term (2 weeks) and long-term (8 weeks) culture periods in *Plalaenopsis amabilis* plantlets under *in vitro* conditions.

دوره کشت Culture period	F0	Fm	Fv	Fv/Fm	Fv'/Fm'	NPQ	qN	qP	qL	Rfd	ΦPSII
دو هفته 2 weeks	512.97 a	2313.60 a	1800.63 a	0.773 a	0.717 a	0.380 a	0.343 a	0.725 b	1.203 a	0.900 a	0.416 a
هشت هفته 8 weeks	463.62 a	1964.95 a	1501.34 a	0.770 a	0.720 a	0.292 a	0.275 a	0.580 a	1.218 a	0.760 a	0.514 a

میانگین‌های دارای حرف‌های مشابه در هر ستون مربوط به هر دوره تفاوت معنی‌داری باهم ندارند. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفته است.

Means with the same letters in each column are not significantly different based on LSD test at the 5% level of probability.

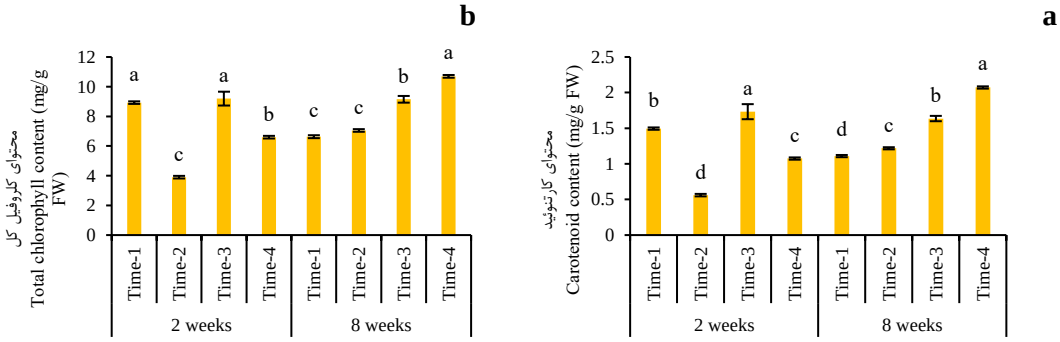
محتوای کلروفیل کل، کارتنوئید و کربوهیدرات کل

به طور کلی، میزان محتوای کلروفیل کل و کارتنوئید در دوره بلند مدت بیشتر از دوره کوتاه مدت بود. در دوره کوتاه مدت بالاترین میزان محتوای کلروفیل در فالانوپسیس در ابتدای روز (۲ ساعت پس از روشنایی) و پایان روز (۱۵ ساعت پس از روشنایی) و کمترین میزان نیز در میانه روز (۸ ساعت پس از روشنایی) مشاهده شد (شکل ۳-b). بیشترین و کمترین میزان محتوای کارتنوئید در این دوره نیز، به ترتیب، در انتهای روز (۱۵ ساعت پس از روشنایی) و میانه روز (۸ ساعت پس از روشنایی) در گیاهچه‌های فالانوپسیس به دست آمد (شکل ۳-a). در دوره کشت بلندمدت در شرایط درون شیشه‌ای نیز بیشترین و کمترین میزان محتوای کلروفیل کل به ترتیب در تاریکی (۴ ساعت پس از تاریکی) و در ابتدای روز (۲ ساعت پس از روشنایی) به دست آمد (شکل ۳-b).

بالاترین میزان محتوای کارتنوئید در دوره کشت بلندمدت، در تاریکی (۴ ساعت پس از تاریکی) مشاهده شد (شکل ۳-a). به طور کلی، میزان محتوای کارتنوئید در گیاهچه‌های فالانوپسیس در دوره کوتاه مدت در انتهای روز و در دوره بلند مدت در تاریکی بیشترین میزان خود را نشان داد. کلروفیل و کارتنوئیدها به عنوان گیرنده‌های نوری در فرایند فتوسنتز عمل می‌کنند (Rodrigues *et al*., 2015؛ Triques *et al*., 1998)، سطح این گیرنده‌ها در ساعت‌های پایانی روز و شب به بیشینه میزان خود می‌رسد و این می‌تواند بیانگر افزایش میزان فتوسنتز در تاریکی باشد (Pollet *et al*., 2009؛ Triques *et al*., 1998). این نتیجه با نتیجه به دست آمده در بررسی فتوسنتز خالص هم راستا بود. سطح گیرنده‌های نوری در گیاهچه‌های فالانوپسیس در دوره کشت بلند مدت بیشتر از دوره کشت کوتاه‌مدت بود. در پژوهش حاضر مشاهده شد که فتوسنتز در دوره کشت بلندمدت کمتر از دوره کشت کوتاه‌مدت بود. زمانی که فرآیند فتوسنتز با وجود فراهمی دی‌اکسیدکربن، کلروفیل و گیرنده‌های نوری کارتنوئیدی به خوبی پیش نمی‌رود، این امر می‌تواند به دلیل نابسامانی در عملکرد فتوسنتزی یا زنجیره انتقال الکترون باشد (Muhammad *et al*., 2021؛ Green *et al*., 1998). نابسامانی در عملکرد فتوسنتزی ممکن است به دلیل افزایش تنش گیاهچه‌ها در شرایط

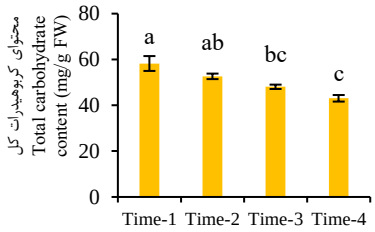
درون‌شیشه‌ای رخ دهد که با نتایج به دست آمده در بررسی هدررفت انرژی و خاموشی غیرفیتوشیمیایی بالاتر در دوره کشت کوتاه مدت و عملکرد کوانتومی بالاتر در دوره‌ی کشت بلند مدت هم‌راستا می‌باشد.

با توجه به نتایج مشاهده شد که میزان محتوای کربوهیدرات کل تنها زیر تأثیر ساعت‌های مختلف شبانه‌روز قرار گرفت. بیشترین و کمترین میزان غلظت کربوهیدرات کل به ترتیب در ساعت‌های اول روز و در تاریکی مشاهده شد (شکل ۴). در شرایط درون شیشه‌ای به دلیل در دسترس بودن قند و تعرق کم، بافت مصرف‌کننده وجود ندارد (Gago *et al.*, 2021). بنابراین، انباشت کربوهیدرات در یاخته‌های گیاهی موجب مهار فتوسنتزی (Rodrigues *et al.*, 2015) و کاهش سرعت فتوسنتز در گیاهچه‌ها در شرایط آزمایشگاهی در ساعت‌های اولیه روز خواهد شد که با نتایج به دست آمده در بررسی فتوسنتز همخوانی دارد.



شکل ۳- اثر برهمکنش دوره‌های کشت و زمان‌های مختلف شبانه‌روز بر محتوای کارتنوئید (a) و محتوای کلروفیل کل (b) در گیاهچه‌های فالانوپسیس در شرایط درون شیشه‌ای.

Fig. 3- Interaction effects of culture period and different day and night times on the carotenoid content (a) and total chlorophyll content (b) of *Phalaenopsis amabilis* plantlets under *in vitro* conditions.



شکل ۴- اثر زمان‌های مختلف شبانه‌روز بر محتوای کربوهیدرات کل در گیاهچه‌های فالانوپسیس در شرایط درون شیشه‌ای.

Fig. 4. Effects of different day and night times on the total carbohydrate content in *Phalaenopsis amabilis* plantlets under *in vitro* conditions.

نتیجه‌گیری

فالانوپسیس از گیاهان ارزشمند اقتصادی در صنعت گلکاری است و مهمترین روش افزایش تجاری این گیاه ریزافزایی می‌باشد. فتوسنتز یکی از حیاتی‌ترین فعالیت‌ها در گیاهان است و زیر تأثیر عوامل زیادی قرار می‌گیرد. گیاه فالانوپسیس دارای سازوکار فتوسنتزی CAM اختیاری می‌باشد. در پژوهش حاضر، بررسی فتوسنتز در گیاهچه‌های فالانوپسیس در شرایط درون‌شیشه‌ای در دوره‌های کشت کوتاه‌مدت و بلندمدت بررسی شد. براساس یافته‌های موجود، مشاهده شد که با وجود فراهمی قند در محیط کشت در شرایط درون‌شیشه‌ای، گیاهان فتوسنتز انجام می‌دهند و میزان سرعت فتوسنتز و عملکرد کوانتومی گیاهچه‌ها تا حد زیادی بستگی به توانایی و انعطاف گیاه در رویارویی با تنش و ایجاد سازگاری نسبی یاخته‌های گیاهی برای مقابله با تنش‌های موجود در شرایط درون‌شیشه‌ای با رطوبت بسیار بالا و نابسامانی‌های عملکردی روزنه‌ها دارد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت در شرایط مورد پژوهش، هرچه گیاهچه‌های فالانوپسیس با سازوکار فتوسنتزی CAM اختیاری، برای مدت زمان طولانی‌تری در شرایط درون‌شیشه‌ای قرار گیرند، توانایی انعطاف‌پذیری بالاتری با شرایط تنش‌زا داشته و هدررفت گرمایی کمتری از خود نشان

داده و در نتیجه عملکرد فتوسنتزی بالاتری در مدت زمان طولانی‌تر در شرایط درون‌شیشه‌ای خواهند داشت. البته قطعیت این نظر نیاز به پژوهش‌های بیشتری درباره تعیین زمان بهینه زیرکشت خواهد داشت.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همراهی جناب آقای مهندس محسن یادگاری، کارشناس محترم آزمایشگاه گروه باغبانی دانشگاه تربیت مدرس و مسئولین محترم آزمایشگاه فتوسنتز دانشکده فناوری کشاورزی دانشگاه تهران در جهت پیشبرد آزمایش‌های این پژوهش، سپاسگزاری می‌شود.

References منابع

Aliniaeifard, S. & Meeteren. U.V. (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), 6529-42.

Aliniaeifard, S., Maleki Asayesh, Z., Driver, J. & Vahdati, K. (2020). Stomatal features and desiccation responses of Persian walnut leaf as caused by *in vitro* stimuli aimed at stomatal closure. *Trees: Structure and Function*, *34*, 1219-1232.

Baker N.R. (2008). Chlorophyll fluorescence: a prove of photosynthesis *in vivo*. *Annual Review of Plant Biology*, *59*, 89-113.

Beer, S., Bjork, M. & Beardall, J. (2021). Basic Concepts and Key Parameters of Chlorophyll Fluorescence. In: Research Methods of Environmental Physiology in Aquatic Sciences. Gao, K., Hutchins, D.A. & Beardall, J. (Eds.) *Springer*, *Singapore*, *1*, 221-229.

Busch, F.A., Sage, T.L., Cousins, A.B. & Sage, R.F. (2012). C3 plants enhance rates of photosynthesis by reassimilating photorespired and respired CO_2. *Plant, Cell & Environment*, *36*(1), 200-212.

Fracheboud, Y. & Leipner, J. (2003). The Application of Chlorophyll Fluorescence to Study Light, Temperature, and Drought Stress. In: Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence. DeEll, J.R., Toivonen, P.M.A. (Eds.) *Plant Biology*. *Springer*, *Boston*, pp 125–150.

Fujiwara, K. & Kozai, T. (1995). Physical microenvironment and its effects. In: Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. J. Aitken-Christie, Kozai, T. & Smith, M.A.L. (Eds). *Kluwer Academic. Netherlands*, pp 319-369.

Gago, D., Vilavert, S., Bernall, M.Á., Sánchez, C., Aldrey, A. & Vidal, N. (2021). The effect of sucrose supplementation on the micropropagation of *Salix viminalis* L. shoots in semisolid medium and temporary immersion bioreactors. *Forests*, *12*(10), 1408.

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, 990*, 87-92.

Ghanbari, M., Modarres-Sanavy, S.A.M. & Mokhtassi-Bidgoli, A. (2019). Is time important in response of morpho-physiological parameters in Withania coagulans L. landraces to water deficit stress? *Industrial Crops and Products*, *128*, 18-28.

Green, T.G.A., Schroeter, B., Kappen, L., Seppelt, R.D. & Maseyk, K. (1998). An assessment of the relationship between chlorophyll a fluorescence and CO_2 gas exchange from field measurements on a moss and lichen. *Planta*, *206*, 611-618.

Hazrati, S., Tahmasebi-Sarvestani, Z., Modarres-Sanavy, S.A.M., Mokhtassi-Bidgoli, A. & Nicola. S. (2016). Effects of water stress and light intensity on chlorophyll fluorescence parameters and pigments of *Aloe vera* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, *106*, 141-148.

Hikosaka, K. & Noda. H. N. (2018). Modeling leaf CO_2 assimilation and photosystem II photochemistry from chlorophyll fluorescence and the photochemical reflectance index. *Plant, Cell & Environment*, *42*(2), 730-739.

Karamzadeh, S., Osborne, B. A. & Wilson, G. (2000). Microclimate in tissue culture vessels and its physiological effects on plantlets. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, *4*(1), 26-40. (In Persian).

Kozai, T. (1991). Photoautotlophic micropropagation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *27*, 47-51.

Kumar, K. & Rao, I. (2012). Morphophysiologicals problems in acclimatization of micropropagated plants in-*ex vitro* conditions-A Review. *Journal of Ornamental Plants*, *2*(4), 271-283.

Luttge, U. (2004). Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). *Annals of Botany*, *93*, 629-652.

Maleki Asayesh, Z.,Aliniaeifard, S. & Vahdati, K. (2021). Stomatal morphology and desiccation response of Persian walnut tissue culture plantlets influenced by the gelling agent of *in vitro* culture medium. *Journal of Nuts*, *12*(1), 41-52.

Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, Sh.I. & Lee, Y.C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, *339*(1), 69-72.

Maxwell, K. & Johnson, G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, *51*(345), 659-668.

Muhammad, I., Shalmani, A., Ali, M., Yang, Q.H., Ahmad, H. & Bai Li, F. (2021). Mechanisms regulating the dynamics of photosynthesis under abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 1-25.

Muller, P., Li, X.P. & Niyogi, K.K. (2001). Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiology*, *125*, 1558-1566.

Murchie, E.H. & Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, *64*(13), 3983–3998.

Nguyen, Q. T. & Kozai, T. (1998). Environmental Effects on the Growth of Plantlets in Micropropagation. *Environment Control in Biology*, *36*(2), 59-75.

Pollet, B., Steppe, K. & Labeke, M.C.V. (2009). Diurnal cycle of chlorophyll fluorescence in *Phalaenopsis*. *Photosynthetica*, *47*, 309-312.

Ramazan, S., Ahmad Bhat, H., Zargar, M.A., Ahmad, P. & John, R. (2021), Combined gas exchange characteristics, chlorophyll fluorescence and response curves as selection traits for temperature tolerance in maize genotypes. *Photosynthesis Research*, *150*(1-3), 213-225.

Ritchie, R.J. (2006). Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynthesis Research*, *89*, 27-41.

Rodrigues, M., Paiva, P.D.O., Freitas, R.T., Mansur, T.D.O.F., Paiva, R. & Barbosa, J.P.R.A.D. (2015). Growth and photosynthetic responses during ex vitro acclimatization of *Etlingera elatior* (Jack) rm smith (torch ginger). *Acta Scientiarum Agronomy*, *37*(4), 495-504.

Sun, D. & Wang, Q. (2018). Linear Relationships between Photosynthetic Rate and Photochemical Energy Expressed by PAR ×Fv/Fm. *American Journal of Plant Sciences*, *9*, 125-138.

Tiwari, H., Agarwal, R. & Bhatt, P. (1998). Photosynthesis, stomata resistance and related characteristics as influenced by potassium under normal water supply and water stress condition in rice. *Indian Journal of Plant Physiology*, *3*(4), 314-316.

Triques, K., Rival, A., Beulé, T., Morcillo, F., Hocher, V., Verdeil, J.L. & Hamon, S. (1998). Changes in photosynthetic parameters during *in vitro* growth and subsequent acclimatization of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos. *Acta Horticulturae*, *461*, 275-282.

Warren, C. 2008. Rapid measurement of chlorophylls with a microplate reader. *Journal of Plant Nutrition*, *31*(7), 1321–1332.

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 24 (2): 275-286 (2023)
Research article

Effect of *in vitro* Culture Period on the Photosynthesis of *Phalaenopsis amabilis* Plantlets

Sedigheh Shokri[1], Alireza Babaei[1], Nima Ahmadi[1], Ali Mokhtassi-Bidgoli[2], Sasan Aliniaeifard[3]

1. Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University
2. Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University
3. Department of Horticulture, College of Aburaihan, University of Tehran

* Corresponding Author, Email: (arbabaei@modares.ac.ir)

Phalaenopsis amabilis with facultative CAM photosynthetic mechanism is one of the most valuable ornamental plants in the world. This plant's most common method of propagation is through its *in vitro* culture. In tissue culture plants, photosynthesis is strongly affected by many factors. The role of photosynthesis of *in vitro* plantlets in their performance and acclimation is still unknown. In the present study, photosynthetic performance was investigated based on gas exchange and fluorometry in *Phalaenopsis* under *in vitro* conditions for two periods, including short-term (2 weeks) and long-term (8 weeks), and four times of recording during the day. The aim was to investigate the stomatal and photosynthetic behavior of *Phalaenopsis* plantlets under these conditions. According to the obtained results based on the gas exchanges and chlorophyll fluorometry, the rate of photosynthesis and the quantum yield of plantlets *in vitro* significantly affected the ability of plantlets to regenerate and create relative adaptation in plant cells under high humidity conditions. Photosynthetic and quantum performances in the long-term culture period were better than their performance in the short-term, while non-photochemical quenching (NPQ) and heat loss were decreased in the plantlets grown in the long-term culture period. The total chlorophyll and carotenoid content were also higher in the long-term than in the short-term. The performance of the stomata was disturbed due to high humidity for a long-term period. So, the effect of the stomata on photosynthesis in the plantlets was almost ineffective under *in vitro* conditions. Therefore, the finding showed flexibility, better photosynthetic and physiological performance for *Phalaenopsis* plantlets under in vitro conditions, and better adaptation to stress.

Keywords: Chlorophyll fluorescence, Gas exchange, Orchid, Photosynthesis, Tissue culture.