

بررسی اپتیکی تفاوت‌های موجود در گیاهچه‌های درون شیشه‌ای با گیاهان سازگار شده *Nephrolepis exaltata* Schott cv. *Bostoniensis* سرخس بوستونی

مرضیه شفیعی حاجی‌آباد^۱ و رضا فتوحی قزوینی^۲

چکیده

گیاهچه‌های تولید شده در محیط درون شیشه‌ای به علت خصوصیات خاص مورفولوژیکی در هنگام انتقال به محیط خارج با تنش‌های محیطی روبرو می‌شوند. تعیین دقیق تفاوت‌های گیاهان درون شیشه‌ای با گیاهان سازگار یافته می‌تواند در سازگار کردن گیاهان با محیط خارج مفید باشد. اخیراً بررسی‌های اپتیکی به عنوان نوعی روش سنجش غیر تخریبی و سریع در تعیین دقیق این تفاوت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. این تحقیق به منظور تعیین تفاوت‌های آناتومیکی و مورفولوژیکی گیاهچه‌های درون شیشه‌ای با گیاهچه‌های سازگار شده به روش اپتیکی صورت گرفته است. در این مطالعه از گیاهچه‌های کشت بافتی و سازگار یافته سرخس بوستونی که در محیط کشت دارای نصف غلظت نمک‌های MS، ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تنظیم کننده رشد بنزیل آدنین BA ریشه‌دار شده بود، استفاده شد. در بررسی توپوگرافی سطح برگ‌ها از میکروسکوپ (AFM Atomic force microscope) با مد جریان ثابت استفاده شد. سپس تصاویر سه بعدی برای هر یک از نمونه‌ها تهیه و پردازش کامپیوتری به وسیله نرم‌افزار AFM انجام گرفت. به منظور بررسی و اندازه‌گیری طیف انعکاس و طیف عبور از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Jasco 151 CR استفاده شد. عکس‌های سه‌بعدی نشان داد که سطح برگ سرخس‌های کشت بافتی نسبت به برگ سرخس سازگار شده نزدیک به ۶ تا ۱۰ برابر صاف‌تر هستند. در مقایسه طیف انعکاس برگ‌های سرخس سازگار شده و سرخس کشت بافتی حداکثر تفاوت در دامنه طول موج‌های رنگ سبز (۵۴۵-۵۵۵ nm) و نوار مرزی رنگ قرمز (۶۷۰-۶۸۵ nm) بود.

واژه‌های کلیدی: مطالعات اپتیکی، کشت درون شیشه‌ای، میکروسکوپ AFM، سازگاری، سرخس بوستونی

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۱۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۸۸/۹/۲۲

۱- کارشناس ارشد علوم باغبانی، مربی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر، Marzieh_shafiee@yahoo.com

۲- دانشیار گروه علوم باغبانی دانشگاه گیلان

مقدمه و بررسی منابع

از آنجا که گیاهان در محیط درون شیشه‌ای^۱ قادر به تولید غذای خود نیستند، معمولاً در محیط کشت آن‌ها مقادیر بالایی از تنظیم‌کننده‌های رشد و مواد قندی فراهم می‌شود، لذا گیاهان حاصل هتروتروف یا دگرساز هستند. این شرایط به همراه رطوبت بالای محیط (در حد اشباع) باعث ایجاد گیاهچه‌هایی می‌شود که از نظر مورفولوژی، آناتومی و فیزیولوژی با گیاهان محیط خارج شیشه‌ای^۲ متفاوت اند (۹، ۱۵، ۱۶). این گیاهان هنگام انتقال به محیط بیرون که کاملاً با شرایط درون شیشه‌ای متفاوت است با استرس‌های محیطی مواجه می‌شوند، لذا همواره برای انتقال و کشت موفق گیاهان از محیط درون شیشه‌ای به محیط خارج یک دوره سازگاری نیاز است. در طول دوره سازگاری تغییراتی در ساختار برگ، روابط آبی در گیاهان، فتوسنتز و مقادیر رنگ‌دانه‌ها به وجود می‌آید. برای شناخت این تغییرات روش‌های متعددی وجود دارد. معمولی‌ترین روش، استخراج مواد از برگ با محلول‌های ارگانیک و تخمین با اسپکتروفوتومتر در محلول ارگانیک است. این روش معایبی هم دارد که مهم‌ترین آن‌ها نیاز به مواد شیمیایی خاص جهت تجزیه برگ بوده و امکان اندازه‌گیری تغییرات رنگ‌دانه‌ها به‌طور هم‌زمان در یک برگ وجود ندارد. اخیراً در مقابل روش استخراج رنگدانه به وسیله محلول از برگ، روش‌های اپتیکی که غیر تخریبی‌اند معرفی شده‌اند. این روش‌های جدید غیر تخریبی، ارزان، سریع بوده و حتی الامکان قابل اجرا در مزرعه می‌باشد (۴، ۱۷، ۱۱). از محاسن دیگر این روش‌ها امکان طیف‌نگاری در سنجش از دور است.

ویژگی اپتیکی برگ‌ها با فعالیت فتوسنتزی آن‌ها و نیز با تنظیم و مصرف انرژی گرمایی گیاه رابطه دارد. به علاوه این ویژگی‌ها در درک ترکیبات ساختار برگ مؤثر می‌باشند و تبیین ساختار برگ در شناسایی و توجیه انواع وظایف گیاه مهم هستند. غلظت کلروفیل *a* و *b* و کارتنوئیدها با پتانسیل فتوسنتزی گیاه و برآورد شرایط فیزیولوژیکی گیاه رابطه دارد (۱۱). تخمینی از غلظت رنگ‌دانه‌ها می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد دینامیک تنش‌های گیاهی فراهم سازد (۱۳).

اخیراً از طیف‌نگاری عبور و انعکاس به‌طور وسیعی برای تخمین رنگ‌دانه‌ها استفاده می‌شود. یکی از اهداف این

تحقیقات تعیین میزان انعکاس در سطوح برگ و کانوپی به منظور برآورد میزان رنگ‌دانه‌ها مخصوصاً کلروفیل و کارتنوئیدها در گیاهان است (۳، ۷).

جیلی^۱ و همکاران (۱۹۹۷) در مقایسه لایه کوتیکول در گیاهان درون شیشه‌ای و سازگار شده به محیط بیرون شیشه‌ای گیاه عشقه مشاهده کردند که لایه کوتیکولی در گیاهان درون شیشه‌ای بسیار نازک و توسعه نیافته است. آن‌ها از طیف انعکاس و جذب برای ارزیابی کلروفیل استفاده کرده و اعلام کردند که برای تخمین کلروفیل شاخص‌هایی که بر اساس انعکاس در ناحیه رنگ قرمز هستند، شاخص‌های بهتری به حساب می‌آیند.

بلکبورن^۲ (۱۹۹۸) طی تحقیقی از طیف اسپکتروفوتتری برای تعیین رنگ‌دانه‌ها استفاده شده و بهترین طول موج برای تعیین میزان کلروفیل *a* ۶۸۰ نانومتر، کلروفیل *b* ۶۳۵ نانومتر و برای کارتنوئیدها ۴۷۰ نانومتر شده است.

وود^۳ و همکاران (۱۹۹۲) طی تحقیقی بر روی برگ‌های گیاه ذرت از طیف عبوری ۴۳۰ نانومتر در قسمت‌هایی که عبور زیاد بود و از ۷۵۰ نانومتر در قسمت‌هایی که عبور کم بود برای تعیین میزان کلروفیل *a* و کلروفیل *b* استفاده کردند. آن‌ها همچنین همبستگی زیادی بین اندازه‌گیری‌های کلروفیل و غلظت نیتروژن گیاه به‌دست آوردند. در مقابل سمپرینگ^۴ و همکاران (۱۹۹۸) از طیف انعکاس استفاده نموده و دریافتند که طول موج‌های بین ۷۰۵ تا ۷۳۵ نانومتر و ۵۰۵ و ۵۴۵ نانومتر برای تخمین میزان کلی بیوماس مناسب هستند.

به‌طور کلی انعکاس در ناحیه مادون قرمز نزدیک^۵ (۱۳۵۰ تا ۷۵۰ نانومتر) عمدتاً تحت تأثیر ساختار برگ می‌باشد، در حالی‌که انعکاس در ناحیه مرئی (۷۰۰-۴۰۰ نانومتر) غالباً به وسیله رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی تعیین می‌شود و انعکاس در اواسط ناحیه مادون قرمز (۲۵۰۰ تا ۱۳۵۰ نانومتر) تحت تأثیر مقدار آب موجود در برگ می‌باشد (۸).

با توجه به موارد بیان شده این تحقیق به منظور تعیین تفاوت‌های آناتومیکی و مورفولوژیکی گیاهچه‌های درون

1. Gilly
2. Blackburn
3. Wood
4. Sembiring
5. Near Infrared : NIR

1. *in vitro*
2. *ex vivo*

شیشه‌ای با گیاهچه‌های سازگار شده به روش اپتیکی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

الف- تولید گیاهچه‌های درون شیشه‌ای و سازگار یافته

برای انجام این آزمون، گیاهچه‌های کشت بافتی در محیط کشت محتوی ۱/۲ غلظت نمک‌های MS^۱ (۱۸)، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۲ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد بنزیل آدنین^۱ در مدت ۶ هفته تولید شدند و پس از آن به مدت ۶ هفته دیگر به منظور افزایش طول شاخ و برگ‌ها و گسترش سیستم ریشه‌ای در محیط کشت دارای ۱/۲ غلظت نمک‌های MS^۲، ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد بنزیل آدنین کشت شدند. لوله‌های آزمایش در داخل اتاقک رشد دارای ۲۰۰۰ لوکس نور و در دمای ۲۷ درجه سلسیوس با طول روز ۱۶ ساعت روشنایی نگهداری شدند (۲).

نمونه‌های درون شیشه‌ای از گیاهانی که به مدت ۱۲ هفته در این محیط قرار داشتند و طول برگ آن‌ها حداقل ۶ تا ۸ سانتی‌متر بود تهیه شدند. برای تهیه نمونه‌های سازگار شده نیز گیاهچه‌ها از هفته دهم به محیط بیرون منتقل شدند، این گیاهچه‌ها در گلدان‌هایی با بستر پیت/پرلیت به نسبت ۳ به ۱ که به وسیله اتوکلاو (۱۲۱ درجه سلسیوس در ۱۵ دقیقه) ضدعفونی شده بود کشت شدند. در طی هفته اول انتقال به منظور حفظ رطوبت و کاهش استرس انتقال، لیوان‌های پلاستیکی یکبار مصرف روی گیاهچه‌ها قرار داده شدند. در این دوران گیاهان با آب مقطر آبیاری شدند. ضمن اینکه در دو مرحله کود کامل کریستالون سبز (۱۸-۱۸-۱۸) به صورت محلول و با غلظت ۲ در هزار به گلدان‌ها داده شد. دمای هوا برای سازگاری برابر دمای اتاق بود (۱). برای تهیه نمونه از گیاهچه‌هایی که بعد از خروج از محیط درون شیشه‌ای طولی معادل ۶-۸ سانتی‌متر داشتند استفاده شد.

ب- بررسی اپتیکی

به منظور انجام بررسی‌های اپتیکی از هر کدام از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای سرخس بوستونی (۱۲ هفته بعد از کشت در محیط درون شیشه‌ای) و سازگار شده، تعداد ۳ برگ به صورت تصادفی جدا و به‌عنوان نمونه انتخاب گردید. برای

بررسی توپوگرافی سطح برگ‌ها از میکروسکوپ AFM^۱ از مد^۲ جریان ثابت استفاده شد. در ابتدا قسمتی از پهنک برگ‌ها که مشابه بودند انتخاب و سپس چندین بار توسط آب دو بار یونیزه شده مورد شستشو قرار گرفتند و سپس قطعات برگ بر روی لام تثبیت شدند. اندازه تصاویر در پنجره‌های ۱۸μm × ۱۸μm تهیه گردید. سپس تصاویر سه بعدی برای هر یک از نمونه‌ها تهیه و پردازش کامپیوتری و تجزیه آماری داده‌ها به وسیله نرم‌افزار AFM انجام گرفت.

ج- تعیین میزان انعکاس و عبور نور از برگ و تخمین

رنگ‌دانه‌ها

به منظور بررسی و اندازه‌گیری مقدار انعکاس^۳ و عبور^۴ در برگ‌ها پس از آماده‌سازی اولیه که شامل چند مرحله شستشوی برگ‌ها به وسیله آب مقطر دوبار یونیزه شده بود، میزان انعکاس و عبور به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر^۵ مدل Jasco 151 CR سنجیده شد. میزان درصد عبور نسبت به هوا برای محدوده‌های مادون قرمز نزدیک و طیف مرئی^۶ تعیین گردید. این محدوده‌ها شامل طول موج‌های ۱۱۰۰-۳۰۰ نانومتر می‌باشد. آهنگ تغییر و ثبت طول موج ۱ نانومتر بر ثانیه (nm/sec) بود. به منظور اندازه‌گیری میزان انعکاس برگ از همان اسپکتروفوتومتر استفاده شد. مقدار انعکاس نمونه‌ها نسبت به آینه‌های آلومینیومی (که دارای بهترین بازتاب هستند) در محدوده مادون قرمز نزدیک و طیف مرئی در دامنه ۱۰۲۰-۴۲۰ نانومتر تعیین گردید. آهنگ ثبت طول موج ۱ نانومتر بر ثانیه بود. پس از سه مرتبه اندازه‌گیری و ثبت داده‌ها، میانگینی از داده‌ها تهیه و سپس نمودارهای انعکاس و عبور رسم گردید.

از روابط زیر برای تخمین رنگ‌دانه‌ها از داده‌های مربوط به انعکاس استفاده شد.

۱- تخمین کلروفیل از روش نسبت ساده تغییر یافته^۷ و با استفاده از فرمول ۱ انجام گرفت.

$$mSR_{705} = \frac{R_{750} - R_{445}}{R_{705} - R_{445}} \quad (\text{فرمول ۱})$$

1. Atomic force microscope
2. Mode
3. Reflectance
4. Transmittance
5. Spectrophotometer
6. Visible spectrum
7. Modified Simple Ratio: MSR

1. Benzyl Adenine

ضخیم برگ باعث انعکاس بیشتر برگ می‌گردد. در این تحقیق نیز چون در طول سازگاری بافت‌های کوتیکولی و اپیکوتیکولی سطح برگ‌های سرخس توسعه می‌یابد انتظار می‌رود که با افزایش ضخامت بافت‌های کوتیکولی و اپیکوتیکولی در برگ سرخس سازگار شده نسبت به درون شیشه‌ای میزان انعکاس به طور قابل ملاحظه‌ای اضافه گردد که موجب بیشتر شدن انعکاس در تمام طول موج‌ها (به‌ویژه در محدوده مادون قرمز نزدیک) در برگ سرخس سازگار یافته گردید.

برای بررسی دقیق‌تر طیف‌های عبور و انعکاس، دو محدوده طیف مرئی (۷۰۰-۴۰۰) و محدوده مادون قرمز نزدیک (۱۱۰۰-۷۰۰) به‌طور مجزا به شرح زیر در نظر گرفته شد.

الف- محدوده طیف مرئی (۷۰۰-۴۰۰ نانومتر)

در این محدوده از طول موج، انرژی نورانی توسط کلروفیل‌های a و b و سایر رنگ‌دانه‌ها به انرژی شیمیایی تبدیل می‌شود. بنابراین، این محدوده از طول موج مهم‌ترین بخش در فرآیند فتوسنتز می‌باشد (۴). با توجه به نمودار ۱ مشاهده می‌شود که میزان انعکاس (بازتابش) برگ سرخس سازگار شده بیشتر از برگ سرخس درون شیشه‌ای می‌باشد، در حالی که میزان عبور نور در برگ درون شیشه‌ای بیشتر از برگ سازگار شده است. البته این میزان در تمام محدوده‌ها یکسان نبود و حداکثر تفاوت بین برگ درون شیشه‌ای و سازگار شده در دامنه‌های ۳۸۵ تا ۴۵۰ نانومتر (رنگ آبی)، ۵۵۵-۵۴۵ نانومتر (رنگ سبز) و ۶۸۵-۶۷۰ نانومتر (رنگ قرمز)، بود. در طیف انعکاس نیز حداکثر تفاوت در این سه محدوده وجود داشت. رنگی‌های کاروتنوئید و کلروفیل رنگ آبی (۳۸۵-۴۵۰ نانومتر) را به خوبی جذب می‌کنند، به طوری که کاروتنوئید دارای حداکثر جذب در ۴۵۰ نانومتر است (۱۷). رنگ قرمز را فقط کلروفیل جذب می‌نماید. کلروفیل‌ها حداکثر جذب را در قرمز و آبی دارند ولی جذب در رنگ آبی به وسیله کلروفیل با جذب کاروتنوئید هم‌پوشانی دارد (۷، ۱۷، ۲۹). هم‌چنین به گزارش برخی محققین حداکثر جذب آنتوسیانین در حوالی ۵۵۰ نانومتر انجام می‌گیرد (۱۱، ۲۱). با توجه به رابطه:

$$100 = \text{درصد عبور} + \text{درصد انعکاس} + \text{درصد جذب (در گیاهان با برگ نازک و پراکنش داخلی کم)}$$

در محدوده طیف مرئی برگ سرخس‌های سازگار شده میزان جذب بیشتری نسبت به برگ سرخس درون شیشه‌ای دارند. در یک برگ سالم و سبز بالا بودن جذب در محدوده

۲- تخمین نسبت کاروتنوئید به کلروفیل با استفاده از شاخص انعکاس فتوشیمیایی^۱ که توسط گامون و همکاران (۱۹۹۲) ارائه گردیده است و با استفاده از فرمول ۲، صورت گرفت.

$$PRI = \frac{R_{531} - R_{570}}{R_{531} + R_{570}} \quad (\text{فرمول ۲})$$

۳- تخمین آنتوسیانین با استفاده از نسبت انعکاس برگ در طول موج قرمز به انعکاس برگ در طول موج سبز و به اقتباس از گامون و سورفوس (۱۹۹۹) صورت گرفت (فرمول ۳).

$$\frac{\sum_{i=700}^{699} Ri}{\sum_{i=500}^{599} Ri} = \frac{Red}{Green}$$

نتایج و بحث

تصاویر به‌دست آمده از میکروسکوپ AFM (شکل‌های ۲ و ۱) نشان داد که میزان اختلاف پستی و بلندی سطح برگ سازگار شده و درون شیشه‌ای به ترتیب ۰/۱۴ و ۰/۰۲۲ میکرومتر است. بنابراین سطح برگ‌های سرخس درون شیشه‌ای ۶ برابر صاف تر از برگ‌های سازگار شده بودند. طبق گزارشات بوخمن^۲ و همکاران (۱۹۹۲) و جیلی و همکاران (۱۹۹۷) با گذشت زمان و افزایش سازگاری، بافت‌های کوتیکولی کاملاً توسعه می‌یابند و ضمن افزایش ضخامت کوتیکول، مقدار واکس (موم) اضافه می‌گردند که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

نمودارهای ۱ و ۲ منحنی‌های انعکاس و عبور می‌باشند که دارای روندی مشابه بوده و شکل کلی آن به این صورت است که با افزایش طول موج میزان انعکاس و عبور تا ۵۵۰ نانومتر افزایش می‌یابد و سپس از میزان انعکاس کاسته می‌شود (تا ۶۷۸ نانومتر) ولی مجدداً از طول موج ۶۷۸ نانومتر به میزان انعکاس و عبور افزوده می‌گردد. این افزایش بخش‌هایی از محدوده مادون قرمز نزدیک (NIR) (۷۰۰ تا ۱۱۰ نانومتر) را هم در بر می‌گیرد.

طبق نظر نوا و بنینی^۳ (۱۹۹۶) واکس‌های اپیکوتیکولی روی سطح برگ انعکاس مادون قرمز نزدیک (۱۳۰۰-۷۰۰ نانومتر) را ۵ تا ۲۰ درصد افزایش می‌دهند. هم‌چنین کوتیکول

1. Photochemical Reflectance Index: PRI
2. Buschman
3. Noé and Bonini

طول موج‌های نزدیک به رنگ قرمز^۱ به مقدار کلروفیل، مراحل گل‌دهی و تنش گیاهی بستگی دارد. انعکاس در ناحیه مادون قرمز نزدیک (NIR) عمدتاً تحت تاثیر ساختار برگ است. یکی از پارامترهای تعیین‌کننده در مقدار انعکاس NIR مجموع سطح مشترک تماس دیواره سلولی است (۲۵). با توجه به این که در چون در گیاه سازگار شده بافت مزوفیل به طرف پارانشیم اسفنجی و نردبانی متمایز می‌گردد (۲۷، ۱۹)، با تمایز بافت مزوفیل به طرف پارانشیم اسفنجی و نردبانی فضای بین سلولی بیشتر می‌گردد و مقدار بیشتری از تابش NIR در داخل برگ گیر افتاده و این عامل موجب می‌گردد که میزان عبور در برگ سازگار شده (۱۱۰۰-۷۰۰ نانومتر) نسبت به برگ کشت بافتی کمتر گردد. در آزمایش ما این میزان تفاوت قابل توجه نبود که احتمالاً به خاطر طولانی نبودن زمان خروج گیاهچه‌ها از محیط درون شیشه‌ای و مدت سازگاری می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت در طول سازگاری به دلیل ایجاد تنش‌های محیطی تغییرات عمده ای در ساختار برگ سرخس اتفاق می‌افتد. نتایج اسپکتروفتومتری نشان داد که برخی از این تغییرات مربوط به رنگ‌دانه‌ها (کلروفیل، کاروتنوئید، آنتوسیانین) بودند که در میان رنگ‌دانه‌ها آنتوسیانین‌ها تغییرات محسوستری نسبت به کاروتنوئید و کلروفیل داشت. آزمایشات اپتیکی نیز روشن ساخت که در ساختار برگ سرخس سازگار یافته بافت اپیکوتیکولی و کوتیکول توسعه می‌یابند و همه این تغییرات گیاه را برای تحمل شرایط متغیر محیط آماده می‌سازد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از زحمات جناب آقای دکتر عباس آذریان دانشجوی سابق دکتری فیزیک دانشگاه صنعتی شریف که ما را در آزمایشات اپتیکی و تجزیه و تحلیل آن‌ها یاری نمودند صمیمانه قدردانی می‌کنیم.

مرئی به خاطر رنگ‌دانه‌ها (کلروفیل، کاروتنوئید، آنتوسیانین‌ها) است (۳). اما برای بررسی بیشتر توصیه می‌شود میزان تک تک رنگیزه‌ها مورد آزمون قرار گیرد.

با استفاده از شاخص طیفی (MSR و PRI) مشخص شد که میزان کلروفیل و میزان کلروفیل/کاروتنوئید در گیاهان سازگار شده نسبت به درون شیشه‌ای افزایش یافته، اما این افزایش معنی‌دار نبود (جدول ۱).

تخمین میزان کاروتنوئید برگ با استفاده از طیف انعکاس خیلی مشکل‌تر از تخمین کلروفیل است زیرا اولاً در برخی از طول موج‌ها بین جذب کلروفیل و کاروتنوئیدها هم‌پوشانی وجود دارد، ثانیاً میزان کلروفیل در اکثر برگ‌ها بیشتر از کاروتنوئید است (۱۷، ۲۰). لذا به جای میزان کاروتنوئید، میزان کلروفیل به کاروتنوئید و کلروفیل سنجیده می‌شود. تغییر در میزان کاروتنوئید در کشت درون شیشه‌ای به حضور یا عدم حضور ساکارز در محیط کشت بستگی دارد. در گیاهچه‌های رشد کرده در کشت خارج شیشه‌ای (بدون ساکارز) مقدار لوئین و بتاکاروتن افزایش یافته و در گیاهچه‌های رشد کرده در کشت درون شیشه‌ای (با ساکارز) مقدار آن ثابت یا متغیر است (۱۷، ۲۰). علاوه بر این برخی از محققین اشاره کرده اند که در طی دوران سازگاری میزان کلروفیل در گیاهان افزایش می‌یابد (۲۶، ۲۳، ۲۵، ۲۲). علت تفاوت نتایج این تحقیق با گزارشات این محقیق ممکن است به دلیل تفاوت زمان سازگاری باشد. لذا توصیه می‌شود این آزمایش با گیاهان سازگاری یافته در مدت زمان طولانی‌تر تکرار شود.

مقدار آنتوسیانین در سرخس سازگار شده (۰/۹۰۶) نسبت به سرخس درون شیشه‌ای (۰/۸۳۱) به میزان بیشتری افزوده شد به طوری که این افزایش در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). این نتایج با نتایج کوبین و میلر^۱ (۱۹۸۷)، چالکراسکات^۲ (۱۹۹۹) و پیترینی و ماساکی^۳ (۱۹۹۸) تطابق دارد و افزایش میزان آنتوسیانین در اثر دماهای پایین و نیز سایر تنش‌ها به عنوان عاملی در سازگاری گیاه گزارش شده است.

ب- محدوده طیف مادون قرمز نزدیک

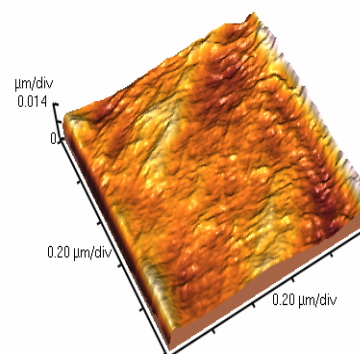
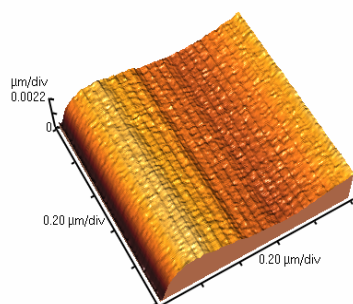
در انتقال از طول موج‌های قرمز به مادون قرمز نزدیک، میزان انعکاس به طور وسیعی افزایش می‌یابد. میزان انعکاس در

1. Cobbin and Miller
2. Chalker-Scott
3. Pietrini and Massacci

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر نوع نمونه برگ (گیاه سازگار یافته و یا رشد یافته در محیط درون شیشه‌ای) بر میزان رنگ‌دانه‌ها

تیمار	کلروفیل (SMSR)	(کلروفیل / کاروتنوئید و کلروفیل)	آنتوسیانین
سرخس سازگار شده	ns ۱/۴۸۵	ns ۱/۶۱۶	* ۰/۹۰۶
سرخس درون شیشه‌ای	ns ۱/۴۸۲	ns ۱/۴۸۳	* ۰/۸۳۱

ns: غیر معنی دار * : معنی دار در سطح ۵ درصد می باشد.



شکل ۲- تصویر سطح برگ گیاهان سازگار یافته سرخس

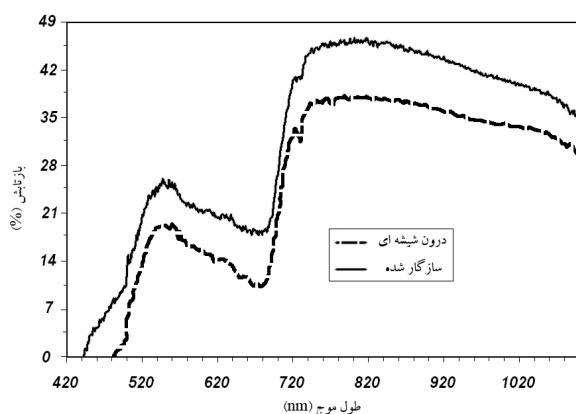
بوستونی تهیه شده با میکروسکوپ AFM

(مقیاس: ۱ میکرومتر × ۱ میکرومتر)

شکل ۱- تصویر سطح برگ گیاهان درون شیشه‌ای سرخس

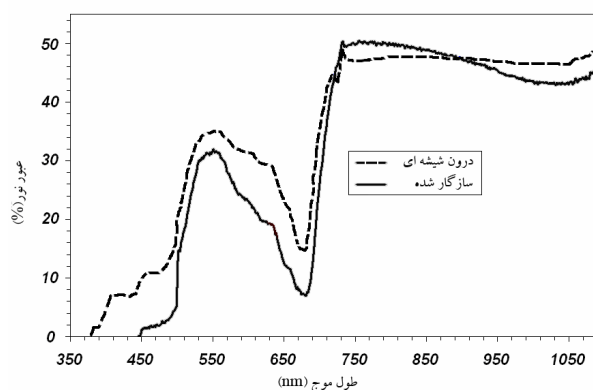
بوستونی تهیه شده با میکروسکوپ AFM

(مقیاس: ۱ میکرومتر × ۱ میکرومتر)



نمودار ۲- درصد انعکاس نور از دو نمونه برگ سرخس بوستونی در

طیف طول موج‌های ۴۲۰ تا ۱۰۲۰ نانومتر



نمودار ۱- درصد عبور نور از دو نمونه برگ سرخس بوستونی در طیف

طول موج‌های ۳۵۰ تا ۱۰۵۰ نانومتر

منابع

- ۱- حمید اوغلی، ی.، شفیعی حاجی آباد، م.، و آذریان، ح. ۱۳۸۴. بررسی اثرات کاربرد سوپرجاذب و بستریهای مختلف گلدانی بر سازگاری گیاهچه‌های کشت بافتی (سرخس بوستونی). اولین همایش تکنولوژی تولیدات گلخانه ای، رشت.

- ۲- شفیعی حاجی آباد، م. و حمیداوغلی، ی. و فتوحی قزوینی، ر. ۱۳۸۶. اثر غلظت‌های نمک‌های معدنی، ساکارز و بنزیل آدنین بر آغازش رشد درون شیشه‌ای رانرهای سرخس بوستونی. مجله علوم و فنون اصفهان، جلد ۱۱، شماره ۲، ص. ۲۳۰-۲۲۰.
3. Blackburn, G. A. 1998. Spectral indices for estimating photosynthetic pigment concentrations: a test using senescent tree leaves. *International Journal of Remote Sensing* 19: 657 - 675.
 4. Buschman, C., and Nagel, E. 1993. In vivo spectroscopy and internal optics of leaves as a basis for remote sensing vegetation. *International Journal of Remote Sensing* 14: 711 - 722.
 5. Chalker-Scott, L. 1999. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology* 70: 1 - 9.
 6. Cobbin, J., and Miller, M. H. 1987. Purpling in maize hybrids as influenced by temperature and soil phosphorus. *Agronomy Journal* 79: 123-131.
 7. Datt, B. 1998. Remote sensing of chlorophyll a, chlorophyll b, chlorophyll a + b, and total carotenoid content in Eucalyptus leaves. *Remote Sensing of Environment* 66: 111 - 121.
 8. Datt, B. 1999. A new reflectance index for remote sensing of chlorophyll content in higher plants: tests using Eucalyptus leaves. *Journal of Plant Physiology* 154: 30 - 36.
 9. Desjardins, Y. 1995. Photosynthesis in vitro on the factors regulating CO₂ assimilation in micropropagation systems. *Acta Horticulturae* 393: 45-61.
 10. Gamon, J. A., Pen˜ uelas, J., and Field, C. B. 1992. A narrow-wave band spectral index that tracks diurnal changes in photosynthetic efficiency. *Remote Sensing of Environment* 41: 35 - 44.
 11. Gamon, J. A., and Surfus, J. S. 1999. Assessing leaf pigment content and activity with a reflectometer. *New Phytologist* 143: 105 - 117.
 12. Gilly, C., Rohr, R., and Chamel, A. 1997. Ultrastructure and radiolabelling of leaf cuticles from ivy (*Hedera helix* L.) plants in vitro and during ex vitro acclimatization. *Annual Botany* 80: 139-145.
 13. Filella, I., Serrano, L., Serra, J., and Pen˜ uelas, J. 1995. Evaluating wheat nitrogen status with canopy reflectance indices and discriminant analysis. *Crop Science* 35:1400-1405.
 14. Knipling, E. B. 1970. Physical and physiological basis for the reflectance of visible and near-infrared radiation from vegetation. *Remote Sensing of Environment* 1: 155 - 159.
 15. Kozai, T., and Smith, M. A. L. 1995. Environmental control in plant tissue culture - general introduction and overview. In: Aitken-Christie, J., Kozai, T., Smith, M. L. (eds.): Kluwer Academic Publishers, Dordrecht - Boston - London. pp. 301-318.
 16. Kozai, T. 1991. Micropropagation under photoautotrophic conditions.- In: Debergh, P.C., and Zimmerman, R.H. (eds.): Micropropagation. technology and application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht - Boston - London. pp. 447-469
 17. Merzlyak, M. N., Gitelson, A. A., Chivkunova, O. B., and Rakitin, V. Y. 1999. Non-destructive optical detection of pigment changes during leaf senescence and fruit ripening. *Physiologia Plantarum* 106: 156-162.
 18. Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays *Agronomy Journal* 15: 473-427.
 19. Noé, N., and Bonini, L. 1996. Leaf anatomy of highbush blueberry grown in vitro and during acclimatization to ex vitro conditions. *Biology Plant* 38: 19-25.
 20. Pen˜ uelas, J., Baret, F., and Filella, I. 1995. Semi-empirical indices to assess carotenoids/chlorophyll a ratio from leaf spectral reflectance. *Photosynthetica* 31: 221 - 230.
 21. Pietrini, F., and Massacci, A. 1998. Leaf anthocyanin content changes in *Zea mays* L. grown at low temperature: significance for the relationship between the quantum yield of PSII and the apparent quantum yield of CO₂ assimilation. *Photosynthesis Research* 58: 213 - 219.
 22. Pospíšilová, J., Wilhelmová, N., Synková, H., Čatský, J., Krebs, D., Tichá, I., anáčková, B., and Snopek, J. 1998. Acclimation of tobacco plantlets to ex vitro conditions as affected by application of abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* 49: 863-869.
 23. Rival, A., Beulé, T., Lavergne, D., Nato, A., Havaux, M., and Puard, M. 1997. Development of photosynthetic characteristics in oil palm during in vitro micropropagation. *Journal of Plant Physiology* 150: 520-527.
 24. Sembiring, H., Raun, W. R., Johnson, G. V., Stone, M. L., Solie, J. B., and Phillips, S. B. 1998. Detection of nitrogen and phosphorus nutrient status in winter wheat using spectral radiance. *Journal of Plant Nutrition* 21 (6):1207-1233.
 25. Synková, H. 1997. Sucrose affects the photosynthetic apparatus and the acclimation of transgenic tobacco to ex vitro culture. *Photosynthetica* 33: 403-412.
 26. Trillas, M. I., Serret, M. D., Jorba, J., and Araus, J. L. 1995. Leaf chlorophyll fluorescence changes during acclimatization of the rootstock GF677 (peach & almond) and propagation of *Gardenia jasminoides* L.

- In: Carre, F., and Chagvardieff, P. (eds.): Ecophysiology and photosynthetic in vitro cultures. CEA, Centre d'Études de Cadarache, Saint-Paul-lez-Durance pp. 161-168.
27. Waldenmaier, S., and Schmidt, G. 1990. Histologische Unterschiede zwischen in-vitro- und ex-vitro-Blättern bei der Abhärtung von Rhododendron. Gartenbauwissenschaft 55: 49-54.
28. Wood, C. W., Reeves, D. W., Duffield, R. R., and Edmisten, K. L. 1992. Field chlorophyll measurements for evaluation of corn nitrogen status. Journal of Plant Nutrition 15:487-500.
29. Yoder, B. J., and Waring, R. H. 1994. The normalized difference vegetation index of small Douglasfir canopies with varying chlorophyll concentrations. Remote Sensing of Environment 49: 81 – 91.