میکروکلیمای درون شیشه و اثرات فیزیولوژیکی آن بر کشت بافت گیاهان

سعید کرم زاده[1] ، بروس آزبورن[2]، و گراهام ویلسون[3]

۱- استادیار پژوهش موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

۲- استاد دپارتمان علوم گیاهی، دانشگاه ملی ایرلند، دوبلین

۳- استاد دپارتمان علوم گیاهی، دانشگاه ملی ایرلند، دوبلین

چکیده

شناخت شرایط محیطی درون شیشه می تواند به رفع نارساییهای رشد گیاهچه‌ها در روش کشت بافت و بالا بردن بازده تولید در این روش کمک نماید. به این منظور، گیاهچه‌های گیلاس وحشی در ظرفهای کشت بافت و با دو نوع در پوش مختلف ، معمولی (NVC) و یا درپوش فیلتردار (VC)، مورد مطالعه قرارگرفتند. میزان غلظت گاز CO_2 به طور کلی در ظرفهای کشت کمتر از اتمسفر بود ولی این میزان در NVC کاهش بیشتری را نشان داد.در این حال افزایش شدّت نور به مصرف بیشتر CO_2 ودر نتیجه کاهش بیشتر غلظت آن در ظرفهای کشت منجر گردید. هر چند با وجود این تفاوت در غلظت CO_2 ، میزان توان فتوسنتزی گیاهچه‌ها در ظرفهای VC تفاوت معنی داری را نشان نداد. در این آزمایش میزان رطوبت نسبی درون ظروف کشت در تیمار VC حدود ۱۷در صد کمتر از ظرفهای NVC بود. میزان تعرق و هدایت روزنه ای نیز در برگهای تیمار VC به مراتب کمتر از NVC بود که به اثرات کاهش رطوبت نسبی، در بسته تر شدن روزنه‌های برگ مربوط است. پایین تر بودن میزان هدایت روزنه ای تیمار VC در کاهش تلفات آب بویژه در زمان انتقال گیاهچه‌ها به محیط خارج شیشه، و افزایش زنده مانی از اهمیّت بسیاری برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: کشت بافت، میکروکلیما، ظرف کشت، گیلاس وحشی، فیزیولوژی، فتوسنتز، روزنه، CO_2 و رطوبت نسبی (RH)

مقدمه :

ریز ازدیادی[1] یکی از شاخه‌های بیوتکنولوژی است که طی آن تکثیر ژنوتیپهای برتر به روش کشت درون شیشه ای (*in vitro*) انجام می گیرد. شرایط محیطی درون شیشه بطورمعمول مشخصه هایی از قبیل: اتمسفری با هوای اشباع از بخار آب، شدت نوربسیار کم، تبادل گازی محدود با محیط بیرون، درجه حرارت ثابت، و استفاده از مواد تنظیم کننده رشد و هیدراتهای کربن در محیط کشت دارد. این شرایط از جمله عواملی هستند که می توانند اعمال حیاتی گیاه را تحت تاثیر قرار داده و موجب نارساییهایی در رشد گیاهان گردند (Preece و Sutter ،۱۹۹۱: Donnelly و Tisdall، ۱۹۹۳). شناخت محیط رشد گیاهچه‌ها و میکروکلیمای درون شیشه و تعیین میزان تاثیر این عوامل بر رشد طبیعی و مناسب گیاهچه‌ها می تواند به رفع مشکلات روش کشت بافت و بالا بردن بازده تولید وتکثیر در این روش کمک شایانی بنماید.

غلظت گازها در محیط کشت: بمنظور جلوگیری از پژمردگی برگها و آلودگی آنها، کشت بافت گیاهی در ظرفهای شیشه ای در بسته انجام می شود که در نتیجه آن تبادل گازی اکسیژن(O_2) و دی اکسید کربن (CO_2)، بین اتمسفر داخل و خارج از شیشه محدود می شود (Buddendorf-Joosten ،۱۹۹٤). گزارشها نشان می دهند که غلظت CO_2 در ظرفهای کشت حاوی گیاهچه، که درپوش آنها به طورکامل بسته شده باشد، به نوع گونه گیاهی کشت شده در آنها بستگی دارد، ولی اغلب در طی دوره روشنایی حدود نقطه موازنه نوری یعنی کمتر از ۱۰۰μ mol mol^{-1} می باشد که بطور قابل توجهی از غلظت CO_2 اتمسفر (۳۵۰ μ mol mol^{-1}) کمتر است (Fujiwara و همکاران، ۱۹۸۷). حتی در آن دسته از ظرفهای کشت که در پوش آنها چندان محکم بسته نشده و یا درپوشی نفوذ پذیر دارند، غلظت CO_2 بطور معمول از mol mol^{-1}

1 - Micropropagation

۲۰۰μ کمتر است و منجر به کاهش فتوسنتز می شود (Kozai, ۱۹۹۱ : Kozai و Iwanami, ۱۹۸۸ : Jackson و همکاران، ۱۹۹٤ ; Donnelly و Vidaver، ۱۹۸٤).

غلظت زیاد گاز اتیلن در ظرفهای کشت بطور کامل در بسته، نیز گزارش شده است (Reghetti و همکاران، ۱۹۸۸ : Jona و Gribaudo، ۱۹۹۰). بعضی از حالتهای غیر عادی در گیاهچه‌ها مثل شیشه ای شدن[1] را به غلظت زیاد اتیلن در هوای درون شیشه مربوط دانسته اند. این پدیده به نوبه خود می تواند فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه، از جمله فتوسنتز وتعرّق، را تحت تأثیر قرار دهد.

رطوبت نسبی: اتمسفر درون ظرفهای کشت بافت اغلب از رطوبت اشباع است (RH ~٪۱۰۰). این عامل می تواند در زمان انتقال گیاهچه‌ها از درون ظرف کشت به خاک، در عدم توانایی گیاهان به کنترل تلفات آب نقش مهمّی را داشته باشد. از طرفی به نظر می رسد که میزان تعرق برگها بدلیل RH زیاد بطورعموم کم باشد (Kozai، ۱۹۹۱). هر نوع عاملی که بتواند تعرق را در شرایط درون شیشه افزایش دهد می تواند رشد، زنده مانی و سازگاری گیاهان را بعد از انتقال به محیط خارج از شیشه، برای مثال با ایجاد یک شیب رطوبتی بین درون برگ و اتمسفر درون شیشه، را بهبود بخشد. این امکان را عده ای از محققان با بکارگیری روشهایی جهت پایین آوردن رطوبت نسبی درون ظرف کشت، آزمایش و تایید کرده اند. از جمله این روشها، استفاده از درپوش نفوذ پذیر برای ظرف کشت (Cassells و Roche، ۱۹۹٤ : Sallanon و Maziere ، ۱۹۹۲، Ghashghahi و همکاران، ۱۹۹۲)، افزایش غلظت آگار یا شکر در محیط کشت و یا استفاده از مواد رطوبت گیر (Z iv و همکاران، ۱۹۸۳ : Marin و Gella ، ۱۹۸۷، Wardle و همکاران، ۱۹۸۳)، و خنک نمودن محیط کشت با استفاده از

1 - Vitrification

قفسه‌های سرد شده (Roberts و همکاران، ۱۹۹٤ : Vanderschaeghe و Debergh ،۱۹۸۷) می باشد.

از دلایل مهمّی که برای پژمردگی و نارسایی رشد گیاهچه‌ها در زمان انتقال به خاک گزارش شده است، عدم کارکرد درست روزنه‌های برگ می باشد (Cassells و Walsh ،۱۹۹٤، Brainerd و Fuchigami ،۱۹۸۲، Blanke و Belcher، ۱۹۸۹). عوامل بسیاری می توانند در این ناتوانی روزنه‌ها دخالت داشته باشند. از جمله روشن گردیده است که رطوبت نسبی زیاد در ظرف کشت می تواند موجب این نارسایی شود. گیاهچه‌های گل داوودی در ظرف کشت با RH کمتر از ۹٤٪ به جای ۱۰۰٪ رشد داده شدند، و این عمل واکنش روزنه‌ها را نسبت به محرکهای محیطی بهبود بخشید(Smith. و همکاران، ۱۹۹۰).

تابش نور: به نظر می رسد که به دلایل اقتصادی میزان تابش نور در شرایط *in vitro* اغلب تنها در محدوده ۷۰- ۱۲ μ mol Photon $m^{-2}s^{-1}$ نگه داشته می شود، که این میزان بسیار کمتر از نور طبیعی روزانه می باشد (Donnelly و Tisdall, ،۱۹۹۳، Lee و Wetzstein , ۱۹۸۸). Lees (۱۹۹٤) نتایج متفاوتی را از اثرات میزان نور در گونه‌های مختلف گزارش نموده است. برای مثال، افزایش شدت نور بین ۲۰ تا ۸۰ (μ mol Photon $m^{-2}s^{-1}$) در محیط *in vitro* رشد گیاهچه‌های دافنه[1] را افزایش داد، رشد کلماتیس را کاهش داد و اثر ناچیزی بر گیاه زینتی هوستا[2] داشت.

[1]- Daphne
[2]- Hosta

مواد و روشها

در ایـن مطالعـه بـه منظور بررسی عوامل اکولوژیکی و شرایط محیطی کشت درون شیشه و اثر آنها بر بعضی فرایندهای فیزیولوژیکی، گیاه گیلاس وحشی[1] (*Prunus avium* L.) بـه عـنوان نمونه انتخاب گردید. بعد از جدا نمودن جوانه‌های یکی از کلنهای ایـن درخـت از غـرب کشـور ایرلند به استقرار و تکثیر آنها با روش کشت بافت اقدام گـردید. بـه منظور استقرار و تولید ساقه‌های جوان، جوانه‌ها در محیط MS تغییر یافته (Murashige و Skoog، ۱۹۶۲) حـاوی ۱ mg L^{-1} IBA و ۱ mg L^{-1} BAP و ۰/۱ mg L^{-1} GA_3 و بعـد بـرای ریشـه زایـی بـه محیط کشت حاوی تنها ۱ mg L^{-1} هورمـون IBA منـتقل گـردیدند. در هردو محیط کشت شاخه و ریشه زایی از ۲۰ گرم در لیـتر سـاکارز و ۷/۵ گـرم در لیـتر آگـار استفاده گردید. گیاهچه‌های اولیّه به مدّت ٤ هفـته در محیـط کشت شاخه زایی و ۳تا٤ هفته در محیط کشت ریشه زایی مستقر و در اتاقک رشد با شرایط ۲۵ درجه سانتیگراد روز و ۱۸ درجه سانتیگراد شب و دوره نوری ۱٦ ساعته و تحت تابش ۵۰μ mol photon m^{-2} s^{-1} (در سطح گیاه) رشد داده شدند. در ایـن مراحل از نوعی ظرف معمولی کشت بافت[2] با حجم ۱۰۰ ml و با درپوش پلی پروپیلن[3] (SIGMA-ALDRICH, USA) که محتوی حدود ۲۰ ml محیط کشت بود استفاده گردید (تصویر شماره ۱).

---

[3] -Wild cherry
[4] -Baby food jar
[5] - Magenta B-Cap, polypropylene

تصویر شماره ۱. نمونه ای از ظرفهای کشت حاوی گیاهچه‌های گیلاس وحشی با درپوش معمولی (NVC) و درپوش فیلتردار (VC)

گیاهچه ها. از مرحله ریشه زایی به دو دسته تقسیم گردیدند. دسته اوّل در ظرفهای کشت با همان در پوش معمولی (NVC با حداقل تبادل‌های گازی[1]) و دسته دوّم در ظرفهای کشت با درپوش پلی پروپیلن حاوی فیلتر[2]، با قطر فیلتر ۱۰ mm و اندازه روزنه‌های آن ۰/۲۲μm، (VC با امکان مقداری تبادل‌های گازی[3]) نگهداری و از اواخر هفته سوّم پارامترهای مورد نظر اندازه گیری گردیدند. دراین مراحل ۸ گیاهچه به طور تصادفی انتخاب وتوان فتوسنتزی برگها، تعرق و واکنش روزنه‌ها به تغییرات نور با دستگاه IRGA[4] (PP-Systems CIRAS, Hert, UK) و به کمک محفظه برگ پارکینسون اندازه گیری شد. غلظت گاز CO_2 در ظرف کشت با استفاده از دستگاه آنالیز گاز (Gaspace2, Analyser, Systech Instruments Ltd., UK)، رطوبت

[1] - Non-Vented Cap
[2] - Magenta B-Cap vented
[3] - Vented Cap
[4] - Analyzer Infra Red Gas

نسبی در اتاقک رشد و در ظرف کشت با استفاده از دستگاه ذخیره اطلاعات[۱] (Orion components, UK)، و میزان تابش نوری با دستگاه نورسنج PARمتر (Skye instrument Ltd. UK) سنجیده گردید. برای مقایسه تیمارها از آنالیز آماری Ttest و نرم افزار (MS Exell 7.0) استفاده شد.

نتایج

غلظت گاز CO_2 در درون ظرفهای کشت محتوی گیاهچه‌های گیلاس وحشی تغییراتی را در طی شبانه روز نشان داد. بطوریکه این غلظت همواره در طی دوره روشنایی با تابش (۵۰μ mol photon m^{-2} s^{-1}) کمتر از دوره تاریکی بود (جدول شماره۱). در ظرف کشت با در پوش فیلتر دار (VC) اختلاف کمتری بین غلظت گاز CO_2 در دوره تاریکی و روشنایی دیده شد و این غلظت در طول دوره تاریکی mol ۳۵۰ μ mol^{-1} بود. زمانی که میزان تابش نوری بر گیاهچه‌ها از ۵۰ به photon m^{-2} s^{-1} ۲۰۰ μ mol افزایش داده شد، غلظت CO_2 در ظرف کشت با در پوش معمولی (NVC) به ۲۰۰ μ mol mol^{-1} رسید، در حالی که این غلظت در ظرف کشت (VC) بدون تغییر باقی ماند(جدول شماره ۱). همچنین در طی دوره روشنایی میزان رطوبت نسبی (RH) در ظرف کشت (NVC) نزدیک به نقطه اشباع (۹۵٪) بود، در حالی که این میزان در ظرف کشت (VC) به مراتب کمتر و حدود (۷۸٪) بود (جدول شماره۳).

[5] - Tiny talk data logger

جدول شماره ۱ . میزان گاز CO_2 تحت رژیمهای مختلف نوری در ظرفهای کشت، محتوی گیاهچه‌های گیلاس وحشی، با دو نوع در پوش معمولی (NVC) و درپوش فیلتردار (VC)

نوع درپوش	غلظت گاز CO2 (μ mol mol^{-1})		
	تاریکی	نور با شدّت ۵۰ μ mol photon m^{-2} s^{-1}	نور با شدّت ۲۰۰ μ mol photon m^{-2} s^{-1}
NVC	٤٦٠	۳۰۰	۲۰۰
VC	۳۵۰	۳۰۰	۳۰۰

نتایج اندازه گیریهای انجام شده بر روی گیاهچه‌های *in vitro* در ظرفهای کشت VC و NVC نشان دادند که تفاوت معنی داری بین حداکثر توان فتوسنتزی (Pm) آنها دیده نمی شود، هر چند NVC از Pm زیادتری برخوردار بود (جدول شماره۲). همچنین میزان تعرق و هدایت روزنه ای برگها در تیمار VC از تیمار NVC به میزان قابل توجّهی کمتر بود. در این حال میزان بازده فتوسنتزی مصرف آب برگها (WUE) در تیمار VC از NVC بیشتر بود، هرچند که این اختلاف به طور آماری معنی دار نبود (جدول شماره۲).

جدول شماره ۲ . میزان توان فتوسنتزی (Pm)، هدایت روزنه ای، تعرق، و بازده فتوسنتزی مصرف آب (WUE) گیاهچه‌های گیلاس وحشی در ظرفهای کشت با دو نوع در پوش معمولی (NVC) و درپوش فیلتردار (VC)

نوع درپوش	Pm μ mol m^{-2} s^{-1}	هدایت روزنه ا ی m mol m^{-2} s^{-1}	تعرق m mol m^{-2} s^{-1}	WUE $molCO_2$ $mmol^{-1}$ μ H_2O
NVC	۴/۴ ns	۳۳۳ *	۳/۶ *	۱/۶ ns
VC	۳/۱	۵۴	./۹۶	۳/۱

ns = غیر معنی دار * = معنی دار در سطح پنج درصد، $P \leq 0.05$

بحث و نتیجه گیری

به طور کلی بر اساس آزمایشهای پیشین، میزان توان فتوسنتز (Pm) برگهای گیاهچه‌های گیلاس وحشی در شرایط *in vitro* از محیط *ex vitro* به مراتب کمتر است (Karamzadeh,۱۹۹۸). غلظت گاز CO_2 ، هوا تاثیر مستقیمی بر میزان Pm گیاهان دارد. دراین آزمایش، هر چند در دوره تاریکی به دلیل تنفس و آزاد شدن CO_2 ، این غلظت در ظرف کشت و با تیمار NVC ،افزایش نشان داد ولیکن در دوره نوری حدود ۵۰μ mol mol^{-1} از غلظت CO_2 اتمسفر (۳۵۰ μ mol mol^{-1}) کمتر بود (جدول شماره۱). با افزایش شدت نور و تحریک فتوسنتز میزان غلظت گاز CO_2 در ظرف کشت حتی حدود ۱۵۰μ mol mol^{-1} از غلظت CO_2 اتمسفر کاهش نشان داد (جدول شماره۱). این میزان کاهش در غلظت CO_2 می تواند رشد و فتوسنتز گیاهچه‌ها را در شرایط *in vitro* تحت تاثیر قرار دهد. محققان دیگری نیز چنین کاهشی را گزارش نموده و با تغییر و افزایش غلظت گاز CO_2 در ظرف کشت،

توانستند رشد و فتوسنتز گیاه را افزایش دهند (Kozai ،۱۹۹۱، Jackson و همکاران، ۱۹۹٤، Fujiwara و همکاران، ۱۹۸۷). هر چند، در این آزمایش تفاوت معنی داری بین Pm در دوتیمار VC و NVC دیده نشد. این امکان وجود دارد که تبخیر بیشتر و اتلاف قابل ملاحظه آب از محیط کشت[1] در تیمار VC (جدول شماره ۳)، و در نتیجه افزایش غلظت املاح مانع بروز واکنش بهتر فتوسنتزی گیاه نسبت به تغییرات CO_2 شود.

جدول شماره ۳. میزان RH در ظرف کشت و اتاقک رشد و اتلاف آب از سطح محیط کشت، در ظرفهای کشت با دو نوع در پوش معمولی (NVC) و درپوش فیلتردار (VC)

نوع درپوش	رطوبت نسبی RH (روزانه)		تلفات آب از محیط کشت (بعد از ۳ هفته)		
	در ظرف کشت	در اطاقک رشد	وزن اولیه محیط کشت gr.	وزن بعد از ۳ هفته gr.	در صد تلفات آب
NVC	٪۹۵	٪۵۲	۱۸	۱۷/۳	٪٤
VC	٪۷۸	٪۵۲	۱۷/۹	۱٤/٦	٪۱۸/٤

برای جلوگیری از بروز اثرات تبخیر از محیط کشت در زمانی که از ظرفهای کشت با درپوش فیلتر دار (NVC) استفاده می شود یکی از دو راه زیر پیشنهاد می گردد. نخست در صورت امکان در اتاقک رشد رطوبت نسبی را در حد زیادتری نگه داریم و

[1] - Culture medium

به این ترتیب تا حدودی از شیب رطوبتی شدید بین درون و بیرون ظروف کشت جلوگیری نماییم. دوّم بهتر است محیط کشت هر دو هفته یکبار عوض شود.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از وزارت جهاد سازندگی و وزارت علوم، تحقیقات و فن آوری به دلیل حمایتهای خود در انجام این طرح، و از اعضای هیات علمی و کارکنان گروه علوم گیاهی دانشگاه ملی ایرلند (UCD) به دلیل راهنماییها و همکاریهای موثرشان تشکر و قدردانی می نمایم.

منابع

Beruto, M. and P. C. Debergh, **1991**. Differences in availability of water to *in vitro* cultures using different brands of agar. Acta Horticulturae, 289: 331-333.

Blanke, M. M. and A. R. Belcher, **1989**. Stomata of apple leaves cultured *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 19: 85-89

Brainerd, K. E. and L. H. Fuchigami, **1982**. Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, manitol, ABA, and CO_2. Journal of Experimental Botany, 33: 388-392.

Buddendorf-Joosten, J. M. C., **1994**. Components of the gaseous environment and their effects on plant and development *in vitro*. In: Physiology growth and development of plants in culture (eds., Lumsden, P. J., J. R. Nicholas, and W. J. Davies), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 165-190.

Cassells, A. C. and T. D. Roche, **1994**. The influence of the gas permeability of the vessel lid and growth-room light intensity on the characteristics of Dianthus microplants *in vitro* and *ex vitrium*. In: Physiology, growth and development of plants in culture. (eds., Lumsden, P. J., J. R. Nicholas and W. J. Davies), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 204-214

Cassells, A.C. and C. Walsh, **1994**. The influence of gas permeability of the cultured lid on calcium uptake and stomatal function in Dianthus microplant. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 37: 171-178.

Donnelly, D. J. and L. Tisdall, **1993**. Acclimatization strategies for micropropagated plants. In: Micropropagation of Woody Plants. (ed., Ahuja, M. R.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp.153-1666

Donnelly, D. J. and W. E. Vidaver, **1984**. Pigment content and gas exchange of red raspberry *in vitro* and *ex vitro*. Journal of American Society of Horticulture Science, 109: 177-181.

Fujiwara, K., T. Kozai, and I. Wantabe, **1987**. Fundamental studies on environments in plant tissue vessel (3) Measurements of carbon dioxide gas concentration in closed vessels containing tissue cultured plantlets and estimates of net photosynthetic rates of the plantlets. Journal of Agricultural Meteorology, 43: 21-30.

Ghashghahi, J., F. Brenckmann, and B. Saugier, **1992**. Water relations and growth of rose plants cultured *in vitro* under various relative humidities. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 30: 51-57.

Jackson, M. B., A. R. Belcher, and P. Brain, **1994**. Measuring shortcoming in tissue culture aeration and their consequences for explant development. In: Physiology, growth and development of plant in culture. (eds., Lumsden, P.P., J.R. Nicholas, and W. J. Davies), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 191-203.

Jona, R., and I. Gribaudo, **1990**. Ethylene production in tissue culture of peach, almond hybrid, tomato, sweet cherry and grape. Acta Horticulturae, 280: 445-449.

Joyce, P. M., J. Huss, R. McCarthy, A. Pfeifer, and E. Hendrick, **1998**. Growing broad leaves. COFORD, Dublin.

Karamzadeh, S., **1998**, Ph.D. thesis, Department of Botany, National University of Ireland (UCD)

Kozai, T., **1991**. Photoautotrophic micropropagation. *In vitro* Cell Development Biology, 27p, 47-51.

Kozai, T., and Y. Iwanami, **1988**. Effects of CO_2 enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet carnation in tissue culture during the preparation stage. Journal of Japan Society of Horticulture Science, 57: 279-288.

Lee, N. and H. Wetzsein, **1988**. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro* and *in vivo* developed sweetgum leaves. Journal of American Society of Horticulture Science, 113: 167-171.

Lees, R. P., **1994**. Effects of the light environment on photosynthesis and growth *in vitro*. In: Physiology, growth and development of plants in culture (eds., Lumsden, P.J., J.R. Nicholas, and

W.J. Davies,), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 31-46.

Marin, J. A., and R. Gella, **1987**. Factors affecting acclimatization of micropropagated *Prunus cerasus* L. In: Symposium on plant micropropagation in horticultural industries, (eds., Ducate, G., M. Jacob, and A. Simeon), Presses Universitaires, Liege, Belgium, pp.92-100

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

Preece, J. E. and E. G. Sutter, **1991**. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field, In: Micropropagation – Technology and application. (Debergh, P.C., and R. H. Zimmerman), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

Reghetti, B., E. Magnanini, and M. Maccaferri, **1988**. Ethylene and other volatile substances produced by *in vitro* cultured *Prunus avium*. Acta Horticulturae, 227: 402-404

Roberts, A. V., E. F. Smith, S. Walker, D. Mattews and J. Mottley, **1994**. Stage III techniques for improving water relation and autotrophy in micropropagated plants. In: Physiology, growth and development of plants in culture. (eds., Lumsden, P.J., J. R. Nicholas, and W. J. Davies) Kluwer Academic Publisher, The Netherlands, pp. 314-322

Robinson, M. F., A. A. Very, D. Sanders, and T. A. Mansfield, **1997**. How can stomata contribute to salt tolerance? Annals of Botany, 80: 387-393

Sallanon, H. and Y. Maziere, **1992**. Influence of growth room and vessel humidity on the *in vitro* development of rose plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 30: 121-125

Santamaria, J. M., W. J. Davies, and C. J. Atkinson, **1993**. Stomata of micropropagated Delphinium plants respond to ABA, CO_2, light and water potential, but fail to close fully. Journal of experimental Botany, 44 : 399-407

Short, K. C., J. Warburton, and A. V. Roberts, **1987**. *In vitro* hardening of cultured cauliflower and chrysanthemum plantlets to humidity. Acta Horticulturae, 212: 329-334

Smith, E. F., A. V. Roberts, and J. Mottely, **1990**. Preparation *in vitro* of chrysanthemum for transplantation to soil. 3. Improved resistance to desiccation conferred by reduced humidity. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 21, 133-140

Vanderschaeghe, M. and P. C. Debergh, **1987**. Technical aspects of the control of the relative humidity in tissue culture containers. In: Plant micropropagation in horticultural industries, (eds., Ducate, G., M. Jacob, and A. Simeon), Presses Universitaires, Liege, Belgium, pp.68-78

Wardle, K., E. B. Dobbs, and K. C. Short, **1983**. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. Journal of American Society of Horticulture Science, 108: 386-389

Ziv, M., A. Schwarts, and D. Fleminger, **1987**. Hardening aspects of micropropagated carnation plants having malfunctioning stomata. In: Plant micropropagation in horticultural industries, (eds., Ducate, G., M. Jacob. and A. Simeon), Presses Universitaires, Liege, Belgium, pp. 47-54

Microclimate in tissue culture vessels and its physiological effects on plantlets

Saeed. Karamzadeh[1], Bruce A., Osborne[2] and Graham Wilson[2]

Abstract

Understanding the environmental conditions in vessels of tissue cultured plantlets could help us to prepare optimum conditions, and hence improve the production efficiency in micropropagation. Plantlets of wild cherry were studied in culture vessels, using two different types of caps, conventional non-vented cap (NVC) and filtered vented cap (VC). CO_2 concentrations in vessels, in general, were lower, compared with atmospheric CO_2, but more reduction in concentration was observed in NVC. When the light intensity was increased, more depletion of CO_2 in the vessels was measured. However, no significant differences in photosynthetic performance (Pm) were observed in plantlets under two treatments. Transpiration rate and stomatal conductance of plantlets in VC were lower and this could be due to improvement in stomatal functioning. This improvement, in turn, has been attributed to lower relative humidity (RH). In this experiment RH in VC vessels was 17% lower than NVC.

Key words: Tissue culture, culture vessel, microclimate, physiology, stomata, photosynthesis, CO_2, and RH

[1] Scientific member of Research Institute of Forests & Rangelands, Tehran, Iran
[2] Academic members of Botany Department, University College Dublin, Ireland