استفاده از فلورسانس کلروفیلی برای مطالعه رفتار روزنه‌های هوایی در گیاهان تحت تنش خشکی

An investigation on the possibility of use of chlorophyll fluorescence to study the stomatal behaviour in plants under drought stress

Received: 02.09.2009 / Accepted: 17.02.2010

دریافت: ۱۳۸۸/۶/۱۱/ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۱/۲۸

A.H. Rezaei Nejad✉: Assistant Prof., Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Korramabad, Iran
(E-mail: rezaeinejad.hossein@gmail.com)

J. Harbinson: Assistant Prof., Horticultural Supply Chains Group, Plant Sciences, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands

U. van Meeteren: Associate Prof., Horticultural Supply Chains Group, Plant Sciences, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands

Abstract

Stomata play a key role in the control of plant water relations and photosynthesis. A rapid non-destructive method to study the stomatal behaviour in aerial parts of plants is important for researchers in plant sciences and agricultural fields. Stomata close in response to drought stress. Stomatal closure causes lower availability of CO_2 inside the leaf and thus a decrease in the rate of carboxylation. Thus, a measurement of relative quantum yied for electron transport by photosystem II (Φ_{PSII}) under a non-photorespiratory condition may be used to detect the closure of stomata. In this research we aimed to study the relationship between Φ_{PSII} and stomatal closing behaviour in *Tradescantia virginiana* under water stress and rehydration using a chlorophyll fluorescence imaging system. Results showed that in leaves from well-watered plants and in an atmosphere of 2% O_2 and normal CO_2, Φ_{PSII} was high (0.69) before excision, but 2 h dessication after excision Φ_{PSII} decreased significantly (0.33), and with the transition to high CO_2 Φ_{PSII} almost completely recovered to the value of the control images (0.66). Moreover, Φ_{PSII} increased significantly from 0.27 to 0.64 during rehydration of the dessicated leaves. Direct measurement of stomatal aperture in control and dessicated plants (7 and 1 µm, respectively) confirmed the high correlation between Φ_{PSII} under low O_2 concentration and stomatal closure as well as the effectiveness of chlorophyll fluorescence imaging system in the study of stomatal behaviour. Therefore, this new non-destructive method could be used to study stomatal closing behaviour and patchiness in different parts of a leaf.

Keywords: Stomata, chlorophyll fluorescence, drought stress, rehydration

عبدالحسین رضایی‌نژاد✉: استادیار گروه تولیدات گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان
(E-mail: rezaeinejad.hossein@gmail.com)

جرمی هربینسن: استادیار گروه باغبانی دانشگاه واخنینگن هلند

اولکه ون میترن: دانشیار گروه باغبانی دانشگاه واخنینگن هلند

چکیده

روزنه‌های هوایی، با کنترل تبادلات گازی اندام‌های فتوسنتز کننده گیاهان، نقشی اساسی در اکثر فعالیت‌های فیزیولوژیکی گیاه دارند. مطالعه رفتار سلول‌های روزنه در قسمت‌های مختلف اندام فتوسنتز کننده بدون تخریب آن اندام و در زمانی کوتاه از نیازهای مهم پژوهشگران علوم گیاهی و کشاورزی است. در شرایط تنش خشکی با بسته‌شدن روزنه‌ها میزان دی‌اکسیدکربن داخل برگ کاهش یافته و فتوسنتز کاهش می‌یابد. بنابراین، عکسبرداری از عملکرد کوانتومی انتقال الکترون در فتوسیستم II فتوسنتز (Φ_{PSII}) بایستی بتواند میزان باز و بسته بودن روزنه‌ها را برآورد کند به شرط اینکه از تنفس نوری جلوگیری شود. به همین منظور، این تحقیق با هدف مطالعه رابطه بین Φ_{PSII} و رفتار روزنه‌های هوایی در گیاه برگ بیدی در شرایط تنش خشکی و جذب آب مجدد (rehydration) با استفاده از دستگاه عکسبرداری فلورسانس کلروفیلی انجام شد. نتایج این تحقیق نشان داد که قبل از جدا کردن برگ از گیاه مادری خوب آبیاری شده (شاهد)، در شرایط اکسیژن ۲٪ و دی‌اکسیدکربن معمولی (۰/۰۳۵ درصد)، میزان Φ_{PSII} زیاد (۰/۶۹) بود و با جدا کردن برگ و ایجاد شرایط تنش خشکی به مدت دو ساعت میزان آن به طور معنی‌داری کاهش (۰/۳۳) یافت و با استعمال دی‌اکسیدکربن ۵٪ روی همان برگ تحت تنش میزان Φ_{PSII} به اندازه شاهد افزایش (۰/۶۶) یافت. همچنین میزان Φ_{PSII} در برگ تحت تنش بعد از جذب آب مجدد از ۰/۲۷ به ۰/۶۴ افزایش یافت. علاوه بر این، اندازه‌گیری مستقیم میزان باز بودن دهانه روزنه‌ها در حالت شاهد (۷ میکرومتر) و تنش خشکی (۱ میکرومتر)، صحت رابطه قوی بین Φ_{PSII} در شرایط اکسیژن پایین و رفتار روزنه‌های هوایی و امکان استفاده از تصاویر فلورسانس کلروفیلی را برای مطالعه رفتار روزنه‌ها تایید کرد. بنابراین، در این روش نوین، با ایجاد تصویری از Φ_{PSII} در شرایط اکسیژن پایین می‌توان بدون تخریب برگ رفتار روزنه‌ها را در نقاط مختلف برگ مطالعه کرد.

واژه‌های کلیدی: روزنه‌های هوایی، فلورسانس کلروفیلی، تنش خشکی، جذب آب مجدد

مقدمه

روزنه‌های هوایی نقشی اساسی در روابط آبی و فتوسنتز گیاه دارند و عکس‌العمل آن‌ها به شرایط مختلف محیطی از عوامل اساسی موثر در رشد، نمو و تولید محصولات زراعی و باغی می‌باشد. باز و بسته‌شدن روزنه‌های هوایی نتیجه اثر متقابل فاکتورهای فیزیولوژیکی و شرایط محیطی است (Heterington & Assmann 1993, Kearns & Assmann 1993, Woodward 2003, Rezaei Nejad & van Meetern 2005). روش‌های معمول مطالعه رفتار روزنه‌ها شامل روش‌های میکروسکوپی و پرومتری است. روش‌های میکروسکوپی شامل جداکردن اپیدرم برگ و یا روش‌های کپی‌برداری است که فقط اطلاعات مربوط به آن نقطه از برگ را نشان می‌دهد (Smith *et al.* 1989, Rezaei Nejad & van Meetern 2005) و در روش‌های پرومتری هم فقط عدد متوسطی از هدایت روزنه‌ای مربوط به قسمتی از برگ داده می‌شود که در داخل محفظه دستگاه بوده ضمن اینکه هدایت روزنه‌ای همیشه گویای رفتار مستقیم روزنه‌ها نیست (Weyers & Meidner 1990). در سالهای اخیر، اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیلی برای بررسی عملکرد فتوسنتز در بسیاری از گیاهان تحت تنش خشکی مورد مطالعه قرار گرفته است (Lu & Zhang 1998, Meyer & Genty 1999, Lichtenthaler & Babani 2000, Maxwell & Johnson 2000). تحت تنش خشکی، روزنه‌های هوایی بسته شده تا از خروج بیشتر آب از گیاه از طریق تعرق جلوگیری کنند. از طرف دیگر با بسته‌شدن روزنه‌ها ورود دی‌اکسیدکربن به برگ کاهش یافته و فتوسنتز کاهش می‌یابد (Massacci & Cornic 1996, Cornic 2000). در نتیجه عملکرد نسبی کوانتومی انتقال الکترون در فتوسیستم II (Φ_{PSII}) کاهش می‌یابد. بنابراین، از نظر تئوری با اندازه‌گیری Φ_{PSII} امکان مطالعه چگونگی بسته‌شدن روزنه‌ها وجود دارد. اما در هوای معمولی به علت تنفس نوری عملا کاهش Φ_{PSII} متناسب با کاهش فتوسنتز نیست. در همین راستا تحقیقات نشان داده است که در هوای با اکسیژن ۲٪ یا کمتر تنفس نوری انجام نمی‌شود (Genty *et al.* 1990). علاوه بر این، اگر کاهش در Φ_{PSII} فقط به خاطر بسته‌شدن روزنه‌ها باشد، قاعدتا قراردادن گیاه تحت تنش در شرایط با غلظت بالای دی‌اکسیدکربن (به طوری‌که دی‌اکسیدکربن بتواند از روزنه‌های بسته عبور کند) بایستی Φ_{PSII} را به حالت شاهد برگرداند. بنابراین، هدف از این تحقیق بررسی امکان مطالعه رفتار روزنه‌های هوایی در گیاه تحت تنش خشکی با استفاده اندازه‌گیری Φ_{PSII} بوده و نشان داده شده است که با استفاده از یک دستگاه تصویربرداری فلورسانس کلروفیلی تحت شرایط اکسیژن پایین امکان بررسی رفتار روزنه‌ها در گیاه در شرایط تنش خشکی و رفع تنش وجود دارد.

روش بررسی

در این تحقیق از گیاه زینتی برگ بیدی (*Tradescantia virginiana*) استفاده گردید. این گیاه با دارا بودن روزنه‌های درشت و امکان تکثیر و رشد سریع به عنوان یک گیاه مدل در تحقیقات مربوط به روزنه‌های هوایی استفاده می‌شود (Franks & Farquhar 2001). گیاه مذکور به روش تقسیم بوته و به صورت گلدانی در اتاقک رشدی با دمای پیوسته ۰/۵ ± ۲۱ درجه سلسیوس، رطوبت ۵ ± ۵۵ درصد و شدت نور ۱۰ ± ۱۲۰ $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ و با آبیاری مرتب پرورش داده شد. پس از شش هفته از برگ‌های جوان بالغ آن برای آزمایش استفاده گردید. برای اندازه‌گیری در حالت بدون تنش (شاهد)، از برگ‌ها در حالتی که متصل به گیاه مادری بودند استفاده گردید. سپس برای ایجاد حالت تنش خشکی، برگ‌ها از قاعده قطع و از گیاه مادری جدا شدند. برای رفع تنش خشکی و جذب آب مجدد (rehydration)، قاعده برگ درون بشر حاوی آب معمولی قرار داده شد. برای جذب بهتر آب توسط برگ و تا حد امکان حذف حباب‌های هوای مکیده شده به داخل آوندهای چوبی در حین قطع برگ و بعد از آن در شرایط تنش خشکی، سه سانتی متر پایین برگ درون آب قطع گردید.

برای اندازه‌گیری Φ_{PSII} از یک دستگاه تصویربرداری فلورسانس کلروفیلی (FluorCam 700MF, Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic) مجهز به دوربین CCD و متصل به کامپیوتر و نرم‌افزار مربوطه (FluorCam Software, version 5.0) استفاده گردید که با گرفتن دو عکس متوالی از Φ_{PSII} در حالت تعادل نوری (F_s) و اشباع نوری (F'_m) و محاسبه Φ_{PSII} براساس فرمول شماره ۱، تصویر نهایی Φ_{PSII} ثبت گردیده و داده‌های لازم جهت تولید نمودار فراوانی نقاط برگ (Frequency Distribution Histogram) در طیف‌های مختلف Φ_{PSII}، میانگین Φ_{PSII} و انحراف معیار (Standard Deviation) به دست آمد (Genty *et al.* 1989). میزان Φ_{PSII} بین صفر تا یک می‌باشد.

فرمول شماره ۱: $\Phi_{PSII} = (F'_m - F_s)/ F'_m$

شدت نور پیوسته 100 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ توسط لامپ‌های نارنجی (Orange light-emitting diodes) و اشباع نوری با شدت 2500 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ توسط لامپ هالوژن ۲۵۰ وات تامین گردید. برای تنظیم ترکیب گازی هوا از سیلندرهای گاز نیتروژن، اکسیژن و دی‌اکسیدکربن متصل به کنترل‌کننده‌های جریان گاز و دستگاه ثبات جریان گاز استفاده و ترکیب گازی تولید شده به یک محفظه (cuvette) غیرقابل نفوذ به هوای بیرونی که در زیر دستگاه تصویربرداری قرار داشت فرستاده می‌شد. جهت اندازه‌گیری، قسمتی

از برگ درون محفظه قرار گرفته و به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط نور با شدت 100 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ قرار داده تا حالت پایدار در انتقال الکترون ایجاد گردد و سپس اندازه‌گیری انجام شد. در زمان اندازه‌گیری دمای داخل محفظه ۱ ± ۲۲ درجه سلسیوس بود. همچنین رطوبت نسبی هوای ورودی به داخل محفظه ۲ ± ۴۰ درصد بود. ابتدا اندازه‌گیری‌ها در شرایط هوای با اکسیژن کم (۲٪)، دی‌اکسیدکربن معمولی (۰/۰۳۵ درصد) و مابقی نیتروژن انجام گرفت. با توجه به اینکه نوک برگ‌های مورد نظر بیرون از محفظه و در شرایط هوای معمولی بود تصویر دو قسمت برگ در ترکیب‌های گازی مختلف ثبت گردید. همچنین برای بررسی صحت رابطه بین رفتار روزنه‌ها و Φ_{PSII}، اندازه‌گیری‌ها در شرایط اکسیژن پایین (۲٪) و دی‌اکسیدکربن بالا (۵٪) نیز انجام گردیدند.

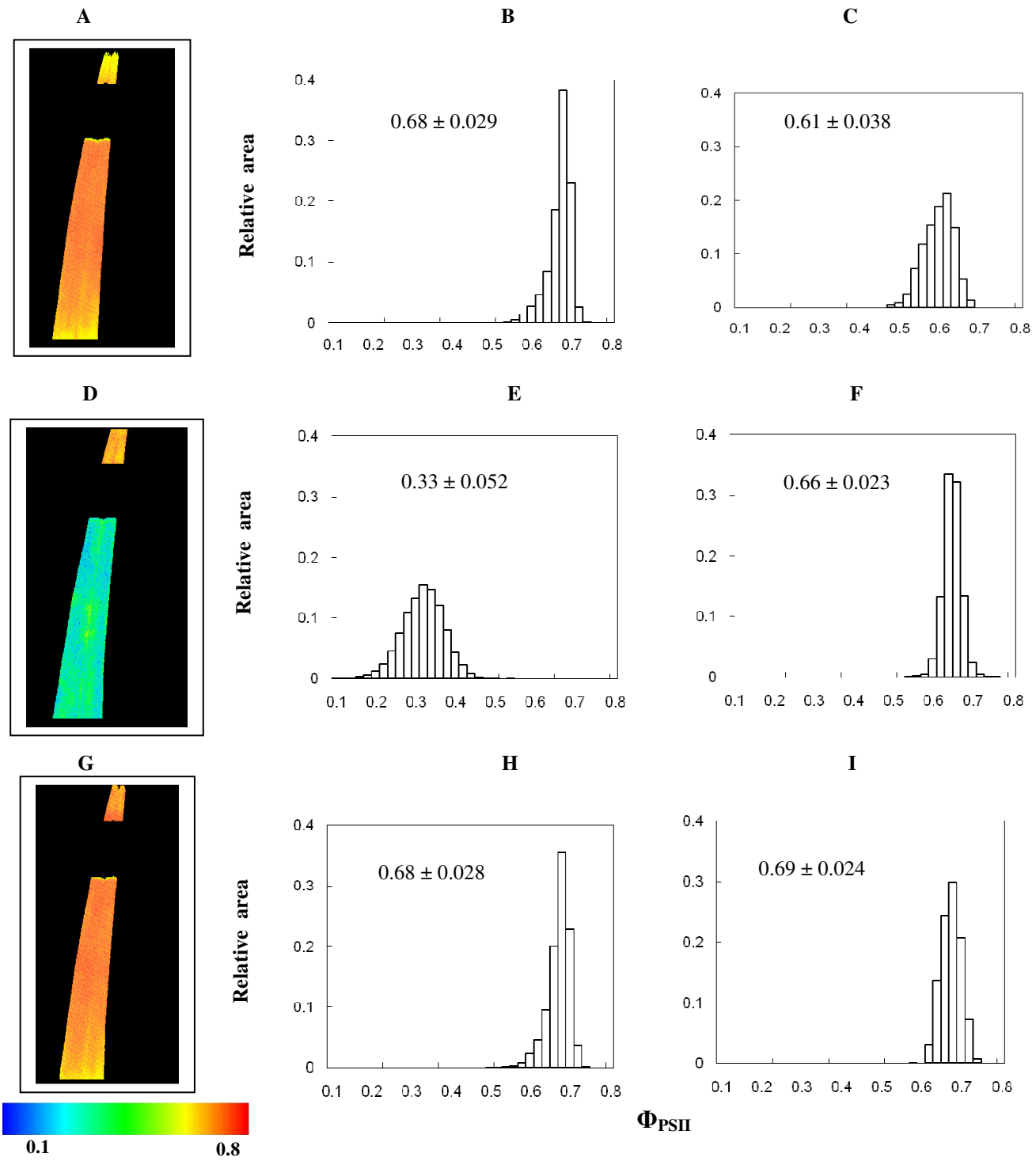
شاهد و تنش خشکی (دو ساعت بعد از جدا شدن برگ از گیاه مادری) از طریق روش کپی‌برداری انجام گرفت (Smith *et al.* 1989). اندازه‌گیری‌ها با استفاده عکس‌های حاصل از یک دوربین مدار بسته (Nikon, DMX-1200) متصل به یک میکروسکوپ نوری (Leica, Aristoplan) با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ انجام گردید. از قسمت زیرین سمت راست یک سوم مانده به نوک برگ در هر برگ یک کپی برداشته و به طور تصادفی ۱۰ روزنه برای اندازه‌گیری عکسبرداری شد. برای آنالیز عکس‌ها از برنامه UTHSCSA IMAGE TOOL استفاده گردید.

در این آزمایش ۱۰ گیاه به طور تصادفی از اتاق رشد انتخاب و از هر گیاه یک برگ بالغ جوان برای اندازه‌گیری‌ها مورد استفاده قرار گرفت. هر گیاه به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. در شکل ۲A و ۲B، آنالیز یک‌طرفه واریانس (One-way ANOVA) انجام شد و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون توکی انجام گرفت. در شکل ۲C، رگرسیون خطی انجام شد. آنالیز داده‌ها و رسم نمودارها توسط برنامه‌های Excel و Prism 4 صورت گرفت.

نتیجه و بحث

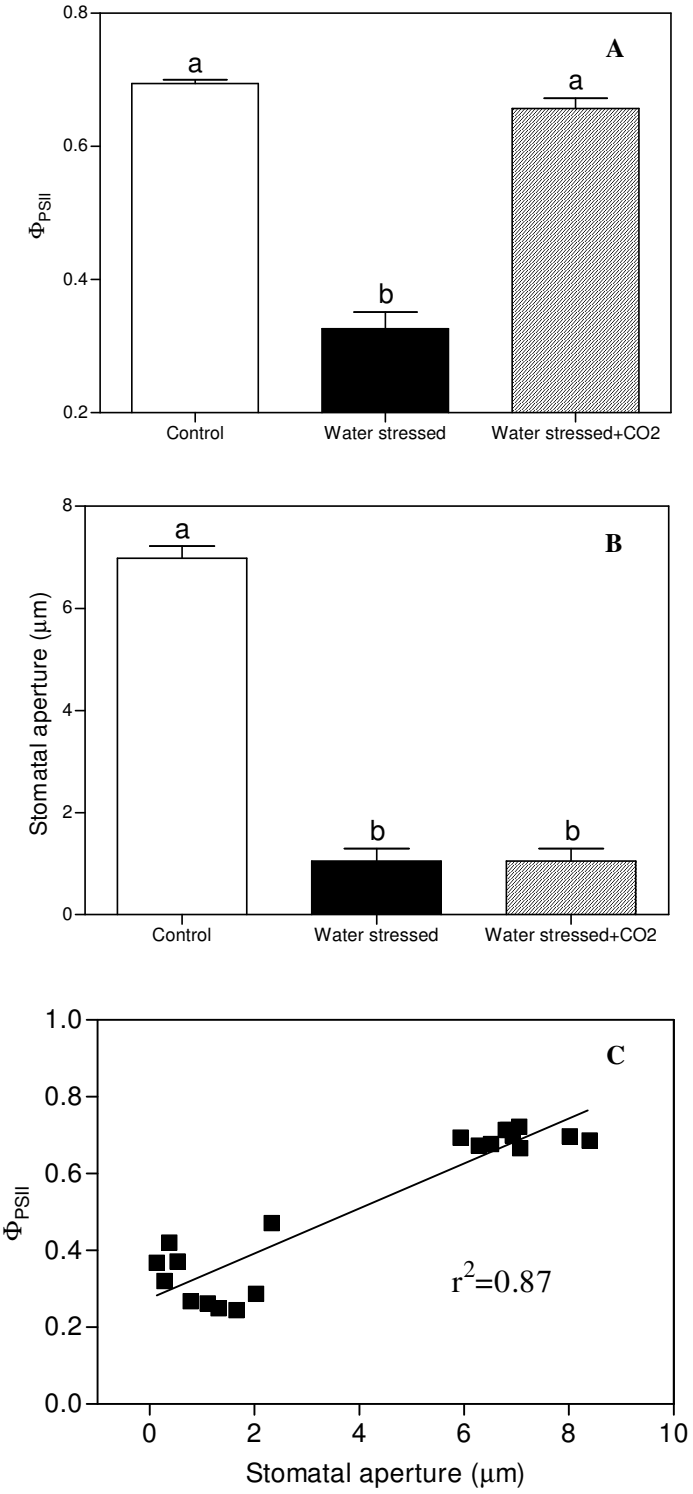
در شکل ۱، تصاویری از Φ_{PSII} برگ گیاه برگ بیدی در شرایط بدون تنش (شاهد) و تنش خشکی نشان داده شده است. قسمت A نشان‌دهنده تصویر Φ_{PSII} برگ در حالتی است که برگ به گیاه مادری متصل بوده و در شرایط تنش خشکی نیست. قسمت پایین برگ درون محفظه در شرایط اکسیژن پایین (۲٪) و قسمت نوک برگ بیرون از محفظه و در هوای معمولی است جایی که تنفس نوری در حال انجام است. بالا بودن میزان Φ_{PSII} در قسمت پایین برگ نشانگر باز بودن روزنه‌ها در شرایط شاهد است. قسمت‌های B و C نمودار فراوانی نقاط را در طیف‌های مختلف Φ_{PSII} به ترتیب برای قسمت‌های پایین و نوک برگ نشان می‌دهدکه حاکی از بالا بودن فراوانی نقاط با Φ_{PSII} در محدوه ۰/۵ تا ۰/۷ می باشد. در قسمت D تصویر Φ_{PSII} همان برگ را در حالی نشان می‌دهد که به مدت دو ساعت با جدا شدن از گیاه مادری در حالت تنش خشکی قرار گرفته است. قسمت پایین برگ که در شرایط اکسیژن پایین قرار داشته است دارای میزان Φ_{PSII} پایین بوده که نشان‌دهنده بسته بودن روزنه‌ها در شرایط تنش خشکی است. نمودار فراوانی آن (E) نیز نشان‌دهنده فراوانی بالای نقاط با Φ_{PSII} حدود ۰/۲ تا ۰/۴ است. در حالی‌که نوک همان برگ که در شرایط تنش خشکی با روزنه‌های بسته قرار داشته، اما در شرایط هوای معمولی بوده با توجه به انجام تنفس نوری و تغذیه فتوسنتز با تولید CO_2 هنوز دارای Φ_{PSII} بالایی است و نمودار آن (F) نشان‌دهنده فراوانی بالای نقاط با Φ_{PSII} حدود ۰/۵ تا ۰/۷ است. رضایی‌نژاد و ون میترن (۲۰۰۵) نشان دادند که با قطع برگ در گیاه برگ بیدی محتوای نسبی آب کاهش یافته و روزنه‌ها بعد از دو ساعت به طور کامل بسته می شوند. همچنین، رضایی‌نژاد و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که با کاهش محتوای نسبی آب و پتانسیل آب میزان Φ_{PSII} تحت اکسیژن پایین کاهش می‌یابد. همچنین رضایی‌نژاد و ون میترن (۲۰۰۷) مشاهده کردند که با قرار دادن قاعده برگ گیاه برگ بیدی در آب حاوی هورمون آبسیزیک اسید که از عوامل شناخته شده بسته‌شدن روزنه‌هاست میزان Φ_{PSII} تحت اکسیژن پایین کاهش می‌یابد. همه این موارد نشانگر رابطه قوی Φ_{PSII} در شرایط اکسیژن پایین با باز و بسته‌شدن روزنه‌هاست. اما برای اطمینان از این رابطه می‌توان از ترکیب هوای حاوی اکسیژن پایین و دی‌اکسیدکربن بسیار بالا استفاده کرد. در این شرایط دی‌اکسیدکربن بر مقاومت روزنه‌ای غلبه کرده و در اختیار سلول‌های فتوسنتزکننده قرار می‌گیرد (Meyer & Genty 1999). در نتیجه، اگر پایین بودن میزان Φ_{PSII} وابسته به کمبود دی‌اکسیدکربن ناشی از بسته بودن روزنه‌ها و بالا بودن مقاومت روزنه‌ای تحت شرایط تنش باشد بایستی میزان آن با استفاده از دی‌اکسیدکربن بالا در ترکیب هوای اطراف برگ افزایش یابد. این موضوع در قسمت‌های G، H و I شکل ۱ نشان داده شده است. در این شکل تصویر Φ_{PSII} همان برگ نشان داده شده که دو ساعت در حالت تنش خشکی بوده و سپس به مدت پنج دقیقه در شرایط دی‌اکسیدکربن بالا (۵٪) قرار گرفته است. در این حالت میزان Φ_{PSII} شبیه به حالت شاهد است.

تیمار تنش خشکی بر میزان Φ_{PSII} بود ($P<0.0001$). مقایسه میانگین‌ها (شکل ۲A) نشان داد که میانگین میزان Φ_{PSII} در حالت شاهد تفاوت بسیار معنی‌داری با حالت تنش خشکی در حالت اکسیژن پایین به علاوه دی‌اکسیدکربن معمولی (۰/۰۳۵) داشت ($P <0.001$) ولی بین Φ_{PSII} در حالت شاهد و حالت تنش خشکی در حالت اکسیژن پایین به علاوه دی‌اکسیدکربن بالا (۵٪) تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P >0.05$). همچنین نتایج تجزیه واریانس



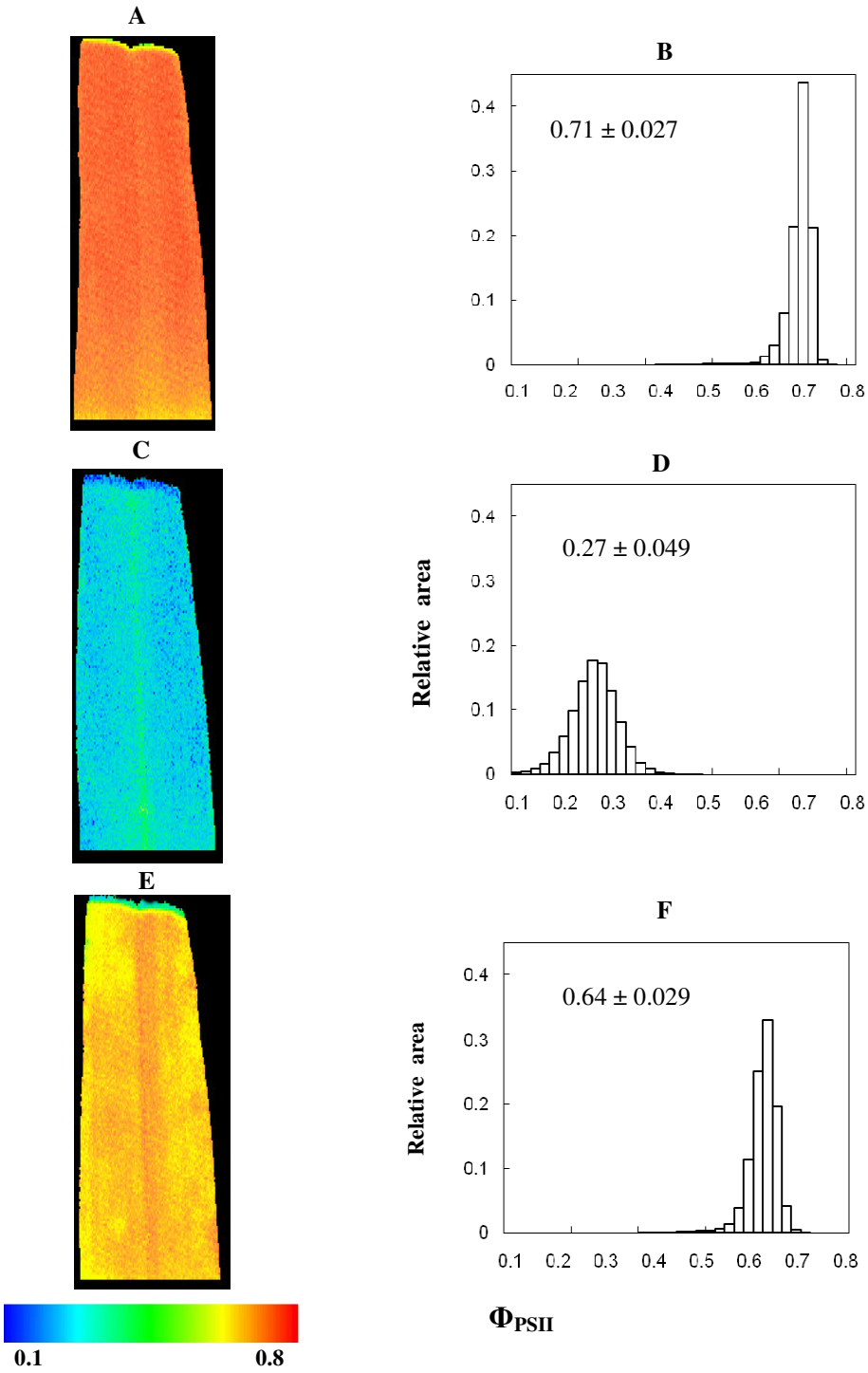
شکل ۱- تصاویر Φ_{PSII} در برگ گیاه برگ بیدی در حالت‌های شاهد (بدون تنش خشکی) در شرایط اکسیژن پایین (۲٪) به علاوه دی‌اکسیدکربن معمولی (۰/۰۳۵ درصد) (A)، دو ساعت تنش خشکی در شرایط اکسیژن پایین به علاوه دی‌اکسیدکربن معمولی (D) و دو ساعت تنش خشکی در شرایط اکسیژن پایین به علاوه دی‌اکسیدکربن بالا (۵٪) (G). نوک برگ‌ها خارج از محفظه ترکیب گازی یعنی در شرایط هوای معمولی بوده است. B، E و H نشان‌دهنده نمودار فراوانی نقاط برگ در طیف‌های مختلف Φ_{PSII} به ترتیب مربوط به قاعده برگ در تصاویر A، D و G می‌باشد. همچنین C، F و I نشان‌دهنده نمودار فراوانی نقاط برگ در طیف‌های مختلف Φ_{PSII} به ترتیب مربوط به نوک برگ در تصاویر A، D و G می‌باشد. میانگین Φ_{PSII} و انحراف معیار روی نمودارها نشان داده شده است. در پایین مقیاس رنگی مربوط به Φ_{PSII} در تصاویر نشان داده شده است.

Fig. 1. Images of Φ_{PSII} in *Tradescantia virginiana* leaves for control (without desiccation) under low O_2 concentration (2%) plus normal CO_2 concentration (0.035%) (A), after 2hr of desiccation under low O_2 concentration plus normal CO_2 concentration (D) and after 2hr of desiccation under low O_2 concentration plus high CO_2 concentration (5%) (G). The tips of the leaves were located outside the cuvette in normal air. B, E, H show the frequency distribution histograms of Φ_{PSII} of the basal parts of leaves (inside the cuvette) corresponding to the images of A, D and G, respectively. Moreover, C, F and I show the frequency distribution histograms of Φ_{PSII} of the tips leaves (outside the cuvette) corresponding to the images of A, D and G, respectively. Average values of Φ_{PSII} ± standard deviation are indicated above the histograms. Colour scale of Φ_{PSII} is shown below the images.



شکل ۲- مقایسه میانگین میزان Φ_{PSII} (A) و میزان باز بودن دهانه روزنه‌ها (B) در برگ گیاه برگ بیدی در حالت‌های شاهد (بدون تنش خشکی) در شرایط اکسیژن پایین (۲٪) به علاوه دی‌اکسیدکربن معمولی (۰/۰۳۵٪)، دو ساعت تنش خشکی در شرایط اکسیژن پایین به علاوه دی‌اکسیدکربن معمولی و دو ساعت تنش خشکی در شرایط اکسیژن پایین به علاوه دی‌اکسیدکربن بالا (۵٪). شکل C نشان‌دهنده رابطه بین Φ_{PSII} و میزان باز بودن دهانه روزنه‌ها در شرایط شاهد و دو ساعت تنش خشکی است.

Fig. 2. Mean comparisons of Φ_{PSII} (A) and stomatal aperture (B) in *Tradescantia virginiana* leaves for control (without desiccation) under low O_2 concentration (2%) plus normal CO_2 concentration (0.035%), after 2hr of desiccation under low O_2 concentration plus normal CO_2 concentration and after 2hr of desiccation under low O_2 concentration plus high CO_2 concentration (5%). Panel (C) shows the relationships between Φ_{PSII} and stomatal aperture for control and 2hr of desiccation.



شکل ۳- تصاویر Φ_{PSII} در برگ گیاه برگ بیدی در حالت‌های شاهد (بدون تنش) (A)، سه ساعت تنش خشکی (C) و سه ساعت تنش خشکی به علاوه یک ساعت جذب آب مجدد (E) در شرایط اکسیژن پایین (۲٪) و دی‌اکسیدکربن معمولی (۰/۰۳۵ درصد). B، D و F نشان‌دهنده نمودار فراوانی نقاط برگ در طیف‌های مختلف Φ_{PSII} به ترتیب مربوط به برگ در تصاویر A، C و E می‌باشد. میانگین Φ_{PSII} و انحراف معیار روی نمودارها نشان داده شده است. در پایین مقیاس رنگی مربوط به Φ_{PSII} در تصاویر نشان داده شده است.

Fig. 3. Images of Φ_{PSII} in *Tradescantia virginiana* leaves for control (without desiccation) (A), after 3hr of desiccation (C) and after 3hr of desiccation plus 1hr of rehydration (E) under low O_2 concentration (2%) plus normal CO_2 concentration (0.035%). B, D and F show the frequency distribution histograms of Φ_{PSII} of the leaves corresponding to the images of A, C and E, respectively. Average values of Φ_{PSII} ± standard deviation are indicated above the histograms. Colour scale of Φ_{PSII} is shown below the images.

نشان‌دهنده تاثیر بسیار معنی‌دار تیمار تنش خشکی بر میزان باز بودن دهانه روزنه بود ($P<0.0001$). روزنه‌ها در حالت شاهد (بدون تنش خشکی) کاملا باز بوده و در حالت تنش بسته شده‌اند (شکل ۲B). میانگین میزان باز بودن دهانه روزنه‌ها در حالت شاهد ۷ میکرومتر و بعد از دو ساعت تنش خشکی به ۱ میکرومتر کاهش یافت. داده‌های میزان باز بودن دهانه روزنه‌ها در تیمار خشکی و تیمار خشکی به علاوه دی‌اکسیدکربن ۵٪ تکرار شده‌اند تا بتوان دید که با وجود بسته بودن روزنه‌ها در حالت تنش خشکی افزایش میزان دی‌اکسیدکربن در شرایط اکسیژن پایین قادر به نفوذ به داخل برگ شده و باعث افزایش فعالیت فتوستنز و در نتیجه افزایش Φ_{PSII} می‌شود (شکل ۲B). بنابراین، اندازه‌گیری مستقیم میزان باز بودن دهانه روزنه‌ها هم نشان از تایید نتایج حاصل از تخمین رفتار روزنه‌ها در اندازه‌گیری‌های Φ_{PSII} در شرایط اکسیژن پایین دارد. همچنین نتایج نشان‌دهنده رابطه قوی ($r^2 = 0.87$) بین Φ_{PSII} و میزان باز بودن دهانه روزنه‌هاست (شکل ۲C).

شکل ۳ نشان‌دهنده تصویر Φ_{PSII} و نمودار فراوانی آن در برگ گیاه برگ بیدی در شرایط شاهد یا بدون تنش (A و B)، سه ساعت تنش خشکی (C و D) و سپس جذب آب مجدد (rehydration) به مدت یک ساعت (E و F) در شرایط اکسیژن پایین و دی‌اکسیدکربن معمولی است. در قسمت A و B برگ متصل به گیاه مادری با روزنه‌های باز دارای Φ_{PSII} بالا بوده و بیشتر نقاط برگ دارای Φ_{PSII} حدود ۰/۶ تا ۰/۸ هستند. در قسمت C و D سه ساعت پس از جدا شدن برگ از گیاه مادری روزنه‌ها کاملا بسته شده و در نتیجه Φ_{PSII} به شدت کاهش یافته و بیشتر نقاط برگ دارای Φ_{PSII} حدود ۰/۱ تا ۰/۴ هستند. قسمت E و F نشان‌دهنده همان برگ است که به مدت یک ساعت درون آب قرار گرفته و با جذب آب مجدد و باز شدن روزنه‌ها Φ_{PSII} در آن افزایش یافته است. بنابراین، با توجه به نتایج این تحقیق امکان استفاده از تصاویر Φ_{PSII} برگ در شرایط اکسیژن ۲٪ برای بیان رفتار روزنه‌ها وجود دارد. از مزایای این روش نسبت به روش‌های معمول مطالعه باز و بسته‌شدن روزنه‌های هوایی مانند روش‌های میکروسکوپی (جدا کردن اپیدرم و روش کپی‌برداری)، بررسی سریع رفتار روزنه‌ها در عکس‌العمل به شرایط محیطی مختلف از جمله تنش‌ها بدون تخریب برگ بوده، ضمن اینکه می‌توان همگنی یا ناهمگنی رفتار روزنه‌ها در نقاط مختلف یک برگ را به راحتی مطالعه و آنالیز کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از وزارت علوم، تحقیقات و فناوری جمهوری اسلامی ایران به خاطر حمایت مالی از این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

Assmann, S.M. 1993. Signal transduction in guard cells. Ann. Rev. Cell Biol. 9: 345–375.

Cornic, G. 2000. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture not by affecting ATP synthesis. Trends in Plant Sci. 5: 187–188.

Cornic, G. & Massacci, A. 1996. Leaf photosynthesis under drought stress. Pp. 347–366. *In*: Baker, N.R. (ed.). Advances in photosynthesis: photosynthesis and the environment. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Franks, P.J. & Farquhar, G.D. 2001. The effect of exogenous abscisic acid on stomatal development, stomatal mechanics and leaf gas exchange in Tradescantia virginiana. Plant Physiol. 125: 935–942.

Genty, B., Briantais, J.M. & Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochim. Biophysic. Acta 990: 87–92.

Genty, B., Harbinson J. & Baker, N.R. 1990. Relative quantum efficiencies of photosystem I and II of leaves in photorespiratory and non-photorespiratory conditions. Plant Physiol. Biochem. 28: 1–10.

Hetherington, A.M. & Woodward, F.I. 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. Nature 424: 901–908.

Kearns, E.V. & Assmann, S.M. 1993. The guard cell-environment connection. Plant Physiol. 102: 711–715.

Lichtenthaler, H.K. & Babani, F. 2000. Detection of photosynthetic activity and water stress by imaging the red chlorophyll fluorescence. Plant Physiol. Biochem. 38: 889–895.

Lu, C. & Zhang, J. 1998. Effects of water stress on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition in wheat plants. Aust. J. Plant Physiol. 25: 883–892.

Maxwell, K. & Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. J. Exp. Bot. 51: 659–668

Meyer, S. & Genty, B. 1999. Heterogeneous inhibition of photosynthesis over the leaf surface of *Rosa rubiginosa* L. during water stress and abscisic acid treatment: induction of a metabolic component by limitation of CO_2 diffusion. Planta 210: 126–31.

Rezaei Nejad A., Harbinson, J. & van Meeteren, U. 2006. Dynamics of spatial heterogeneity of stomatal closure in *Tradescantia virginiana* altered by growth at high relative air humidity. J. Exp. Bot. 57: 3669–3678.

Rezaei Nejad, A. & van Meeteren, U. 2005. Stomatal response characteristics of *Tradescantia virginiana* grown at high relative air humidity. Physiol. Plantar. 125: 324–332.

Rezaei Nejad, A. & van Meeteren, U. 2007. The role of abscisic acid in disturbed stomatal response characteristics of *Tradescantia virginiana* during growth at high relative air humidity. J. Exp. Bot. 58: 627–636.

Smith, S., Weyers, J.D.B. & Berry, W.G. 1989. Variation in stomatal characteristics over the lower surface of *Commlina communis* leaves. Plant Cell Environ. 12: 653–659.

Weyers, J.D.B. & Meidner, H. 1990. Methods in Stomatal Research, 1st edition. Longman Scientific & Technical, Harlow, Pp. 129–155.