

## مطالعه گل آغازی و نیاز سرمایی گیلاس (L. avium. prunus) ارقام سیاه دانشکده و فراسیدا

ناصر بوذری<sup>۱</sup>، کاظم ارزانی<sup>۲</sup> و حسن ابراهیم زاده<sup>۳</sup>

۱، دانشجوی دوره دکتری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات<sup>۲</sup>، دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

۳، استاد دانشکده علوم دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش مقاله ۸/۷/۸۳

### خلاصه

گل آغازی، ورود به مرحله رکود فیزیولوژیکی و خروج از آن از مهمترین مراحل نموی جوانه های گل به شمار می رود که مشخص نمودن زمان دقیق آن می تواند در مدیریت باغ تاثیر بسزایی داشته باشد. بدین منظور مطالعه ای روی دو رقم گیلاس به نامهای سیاه دانشکده و فراسیدا در سال ۱۳۷۹ در باغ تحقیقاتی موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج انجام گردید. جوانه های گل در فاصله زمانی خرداد تا اسفند ماه در ۸ نوبت جمع آوری و تغییرات پروتئین محلول و آنزیمهای پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در جوانه های گل تعیین گردید. نتایج نشان داد تغییرات پروتئین کل در فاصله ماه های تیر تا اسفندماه دارای اشکال متفاوتی بوده و ارتباط مشخصی با مراحل نموی جوانه های گل دارد بگونه ای که پس از رسیدن به یک ماکزیمم در فاصله اواخر خرداد تا تیر ماه شروع به کاهش نموده و در اواخر شهریور تا مهر ماه به حداقل خود در طول دوره رشد و نمو می رسد و پس از آن مجدداً با شروع فصل سرما و قرار گرفتن جوانه های گل در معرض دما های موثر در شکسته شدن خواب افزایش معنی داری در پروتئین جوانه ها مشاهده گردید. فعالیت آنزیم های مورد مطالعه نیز در فاصله ماههای خرداد تا اسفند بتدریج افزایش یافت بطوریکه با افزایش تجمع واحدهای سرمایی به حداکثر میزان خود در طول دوره رشد رسید. بطور کلی تغییرات پروتئین و فراوانی باندهای ایزوزیمی در سطوح مختلف زمان براساس مدل یابی از نوع درجه چهارم با ضریب تعیین بالای بوده بطوریکه براساس مدلهای حاصل می توان از این شاخصها بعنوان نشانگرهای گل آغازی و ورود به مرحله رکود و پایان آن استفاده نمود.

**واژه های کلیدی:** گیلاس، نیاز سرمایی، مارکرهای مولکولی

### مقدمه

مشخص نمودن زمان گل آغازی، شروع دوران رکود و پایان آن به دلیل تاثیرات بسیار زیادی که در عملیات مدیریت باغ می تواند داشته باشد در باغبانی بسیار پر اهمیت می باشد. گل آغازی در درختان گیلاس پس از شکوفه دهی و در اواخر بهار تا اوایل تابستان اتفاق می افتد این تغییرات در گیاهان مختلف با افزایش سنتز RNA، DNA و نیتروژن محلول در نقاط رویشی رخ می دهد (۲، ۶، ۱۸). بطور کلی می توان گفت که گل

آغازی بوسیله عوامل داخلی گیاه که تعادل در جذب و هورمون های داخلی می باشد کنترل می شود و عملیات مدیریت باغ میتواند تعداد و زمان انگیزش جوانه های گل را تحت تاثیر قرار بدهد (۵). بطور مثال یک درخت با قدرت رشدی کم می تواند گلهای فراوانی به بار بیاورد ولی عواملی مانند هرس شدید که سبب افزایش زیاد می شود گل آغازی و تعداد شکوفه های تولیدی را به شدت کاهش می دهد (۱۸). آبیاری زیاد که باعث طولانی شدن رشد جوانه های رویشی می شود می تواند باعث

فراوانی که نیاز دارد، بسیار هزینه بردار و کمی غیر دقیق خواهد بود. در پژوهش حاضر تغییرات پروتئین کل و آنزیم های پر اکسیدازوبلی فنل اکسیداز در فاصله ماههای خرداد تا اسفند در جوانه های گل دو رقم گیلان به نامهای "فرا سیدا" و "سیاه دانشکده" و دامنه دقیق شروع دوران استراحت و رفع نیاز سرمایی و گل آغزی با استفاده از مدل یابی با نتایج حاصل از شاخه های بریده شده دارای جوانه گل در خصوص نیاز سرمایی مورد مقایسه قرار گرفت. ضمناً با توجه به بررسی های انجام شده بر روی گیلان از این دیدگاه تا کنون مطالعه ای در مورد ورود به رکود عمیق و رفع نیاز سرمایی انجام نگرفته است بنابراین نتایج پژوهش حاضر از این نظر می تواند باب جدیدی را در مطالعات فیزیولوژیکی رکود و رفع نیاز سرمایی در گیلان آغاز نماید.

### مواد و روش ها

جوانه های گل دو رقم گیلان به نامهای "سیاه دانشکده" و "فرا سیدا" (از ارقام تجاری کشور فرانسه) موجود در باغ تحقیقاتی کمال آباد موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، از روی اسپوره های موجود در شاخه های دو و سه ساله بطور کاملاً تصادفی در هشت زمان و سه تکرار برداشت گردید. برداشت اسپورها از تمام قسمتهای درخت و شاخه های سالم بگونه ای انجام یافت که برای هر واحد آزمایشی ۱ گرم جوانه وجود داشته باشد.

تعداد جوانه های موجود روی هر اسپور برای رسیدن به یک گرم در ابتدای فصل بطور میانگین ۵۹ و در انتها ۳ عدد بود. انتخاب زمانها جهت برداشت جوانه های گل به گونه ای انجام گرفت تا با توجه به منابع علمی موجود، محدوده های از زمانهای قابل پیش بینی جهت گل آغزی و شروع دوران رکود و رفع نیاز سرمایی را در برداشته باشد.

به منظور استخراج پروتئین های محلول از بافر تریس کلریدریک اسید با pH برابر ۷ و به نسبت (W/V) ۱:۳ و پلی پیرولیدین ۰.۳٪ استفاده شد. همگناهای حاصل به مدت ۴۵ دقیقه و با شتاب ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید. سپس محلول حاصل از پارچه

تاخیر در زمان گل آغزی شود. پایه ها جدا از تاثیر آنها بر قدرت رشد می توانند زمان باز شدن گل و همچنین تعداد گل و در نتیجه تعداد جوانه های انگیزش یافته را تحت تاثیر قرار دهند. مواد شیمیائی تنظیم کننده رشد نیز می تواند بر روی گل آغزی موثر باشند (۱۸). گل آغزی در درختان گیلان پس از شکوفه دهی و در اواخر بهار تا اوایل تابستان با تشکیل برآمدگی هایی درمریستم انتهایی مشخص می گردد (۱۲). پس از کامل شدن اندامهای گل در اواخر تابستان این جوانه ها جهت باز شدن در بهار نیاز به یک مقدار مشخصی سرما قبل از دماهای گرم دارند (۱۱، ۱۶، ۱۸). سرمای ناکافی باعث کاهش تشکیل میوه از طریق شکوفه دهی نامنظم و ریزش تعدادی از جوانه های گل و همچنین عدم همزمانی گلدهی و یا همزمانی ضعیف ارقام اصلی با ارقام گرده دهنده می گردد (۱۰، ۱۸). با توجه به تاثیرات مختلف سرما به شکل مستقیم و غیر مستقیم بر خصوصیات کمی و کیفی میوه اطلاع از چگونگی وارد شدن گیاهان به رکود خروج از آن نیز بسیار با اهمیت می باشد. مشخص شده است که در گیاهان دارای نیاز سرمایی، جوانه ها دارای مقدار زیادی نشاسته می باشند که پس از پایان رکود استراحت و رفع نیاز سرمایی فرآیندهای تبدیل نشاسته به قند با افزایش دما و تنفس در آنها اتفاق می افتد (۱۱، ۱۵). همچنین فعالیت بعضی از آنزیم ها نظیر آمینو پپتیدازها در بذرها در حال رکود سیب گزارش شده است (۱۶). فدری و همکاران (۱۹۷۰) نیز مشخص نمودند که مقدار نیترژن و فسفر محلول به شدت بازگو کننده مرحله آزاد سازی از رکود بود ولی مقدار اسیدهای نو کلئیک همبستگی زیادی به این مرحله ندارد (۱۰). همچنین استفاده از ایزوزیمها در برنامه های به نژادی درختان میوه بیشتر در ارتباط با شناسائی گونه ها و بررسی مقاومتها ... میباشد که در این راستا استفاده از جایگاه های ایزوزیمی در برنامه های اصلاحی و مطالعات ژنتیکی بسیار مفید بوده است (۹). در حال حاضر یکی از روشهای رایج و کاربردی جهت اندازه گیری رکود و خروج از آن در گیاهان استفاده از مجموع ساعتهای سرمایی موثر یا واحدهای سرمایی می باشد. این روشها با توجه به اثرات موثر دماهای متناوب در مزرعه نسبت به دمای ثابت در شرایط کنترل شده و همچنین مواد گیاهی

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نیز مشخص نمود که بین سطوح مختلف زمان و رقم از لحاظ مقدار پروتئین در سطحی کمتر از ۰/۰۰۱ تفاوت معنی داری وجود دارد. همچنین اثرات برهمکنش رقم و زمان نیز به شدت معنی دار شده است بنابراین روند تغییرات پروتئین در زمان برای ارقام مختلف متفاوت می باشد.

از طرفی نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها به روش S.N.K نیز مشخص نمود که بیشترین میزان پروتئین مربوط به اواخر خرداد و اوایل ماه مرداد و کمترین میزان آن نیز مربوط به اوایل و اواسط خرداد و اسفند ماه می باشد. بررسی الگوهای بانندی تولید شده در پراکسیداز در ارقام مورد بررسی نشان دهنده دو جایگاه فعال در این آنزیم می باشد که به نام جایگاه های اول (Per1) و دوم (Per2) نامگذاری گردید. در جایگاه دوم (Per2) نحوه پراکندگی باندها براساس میزان حرکت نسبی آنها نشان دهنده هتروزیگوت بودن جایگاه ژن با سه زیر واحد می باشد. ایزوزیمهای با فعالیت ۰/۱۶ و ۰/۱۵ در این جایگاه فرم های هتروتریمی آنزیم را بیان می نمایند که در ارقام مورد بررسی از ماه مهر به بعد بر میزان کمیت و کیفیت آنها افزوده می گردد. آلوزیم هموتریمی با حرکت نسبی ۰/۱۷ نیز در ارقام و زمانهای مورد بررسی به طور متفاوتی ظاهر گشته بطوریکه در رقم "سیاه دانشکده" در فاصله ماههای مهر تا اسفند دارای فعالیت بیشتری نسبت به رقم "فراسیدا" بود. در حرکت نسبی برابر ۰/۰۹. نیز در تمام ارقام با افزایش زمانهای اندازه گیری از خرداد تا اسفند ماه بر فعالیت باندهای مشاهده شده افزوده گردید. در جایگاه اول این آنزیم (Per1) که از دو باند مونومری با حرکت نسبی ۰/۳ و ۰/۲۶ تشکیل یافته بود فعالیت در فاصله ماههای خرداد تا تیر در ارقام مورد بررسی مشاهده نشد و از ابتدای ماه آذر در رقم "سیاه دانشکده" و از اواخر دی ماه در رقم "فراسیدا" ظهور باندهای ایزوزیمی مشاهده گردید (شکل ۱ و ۲).

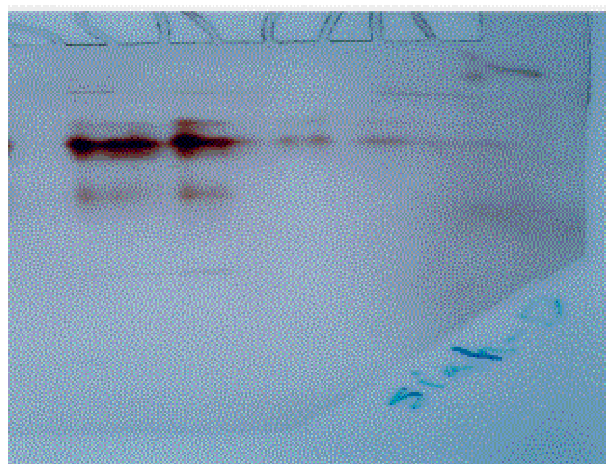
الگوی باندهای پلی فنل اکسیداز نیز مشخص کننده سه جایگاه در این آنزیم بود که به نام جایگاه های اول (Pox1) و دوم (Pox2) و سوم (Pox3) نامگذاری گردید. باندهای مشاهده شده در جایگاه اول به دلیل هتروزیگوت بودن ژنهای

تنزیب ۸ لایه عبور داده شد. مقدار پروتئین در عصاره استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و مطابق روش براد فورد (۱۹۷۶) انجام شد. الکترو فورز نیز در سیستم عمودی ناپیوسته بر روی ژل پلی اکریل آمید ۱۲/۵ درصد حاوی سدیم دودسیل سولفات با شدت جریان ثابت 500 میلی آمپر و به مدت ۲۴ ساعت مطابق روش هامس و همکاران (۱۹۹۰) صورت گرفت. آنالیز واریانس بر روی داده های حاصل از استخراج پروتئین براساس طرح فاکتوریل دو عاملی با متن کاملاً تصادفی مقایسه تیمارها با استفاده از روش S.N.K انجام گرفت.

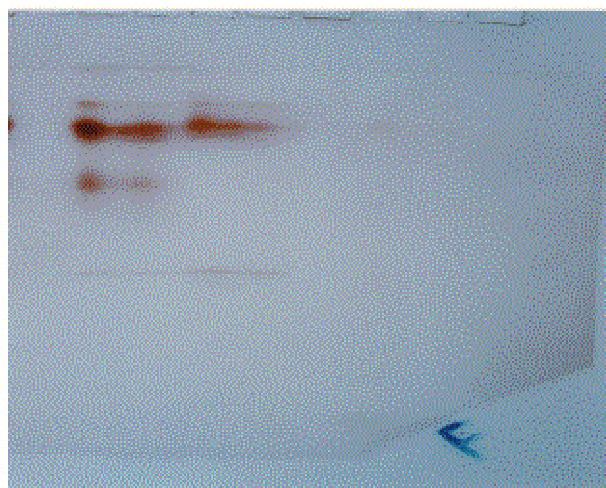
جهت مشخص نمودن نیاز سرمایی از شاخه های بریده شده دو و سه ساله به طول  $30 \pm 5$  سانتیمتر استفاده گردید. این شاخه ها در اوایل پاییز از درختان جدا و سپس در کیسه های کنفی قرار گرفت و پس از ۷۰۰، ۹۰۰ و ۱۱۰۰ ساعت سرما دهی در سردخانه با دمای  $1 \pm 5$  درجه سانتیگراد جهت رشد جوانه ها به دمای  $21 \pm 2$  در روز و در شب  $15 \pm 2$  درجه سانتیگراد انتقال یافتند. یادداشت برداری از جوانه ها هر سه روز یک بار انجام شد و ملاک بر طرف شدن نیاز سرمایی باز شدن ۵۰ درصد از جوانه های گل در مرحله نوک سبزی در نظر گرفته شد. آنالیز واریانس روی داده های حاصله براساس طرح فاکتوریل سه عاملی شامل تنش سرمایی در چهار سطح، زمان هشت سطح و دو رقم و با متن کاملاً تصادفی صورت گرفت و میانگین تیمارهای مورد بررسی نیز با استفاده از روش S.N.K مورد مقایسه قرار گرفت.

### نتایج

مقدار پروتئینهای سیتو پلاسمی جوانه های گل طی دوره رویش و پس از آن تغییرات محسوسی در ارقام مورد بررسی می نماید بطوریکه از اواخر خرداد همزمان با تمایز یابی طرح های اولیه گل میزان آن رو به افزایش و پس از رسیدن به یک بیشینه مجدداً در اواخر تابستان با شروع دوره رکود کاهش می یابد. در فاصله زمانی شروع دوران رکود و کاهش دما و آغاز رفع نیاز سرمایی در ماه های شهریور تا آبان مقدار پروتئین محلول در جوانه های گل تغییر محسوسی نشان نمی دهد و پس از آن مجدداً یک افزایش تدریجی در میزان آن مشاهده می شود (شکل های ۵ و ۷).



Time (min)	5.4	5.16	5.27	4.11	5.29	5.16	18.27	12.59
0.85	---	---	---	---	---	---	---	---
0.015	---	---	---	---	---	---	---	---
0.165	---	---	---	---	---	---	---	---
0.175	---	---	---	---	---	---	---	---
0.265	---	---	---	---	---	---	---	---
0.394	---	---	---	---	---	---	---	---
0.565	---	---	---	---	---	---	---	---

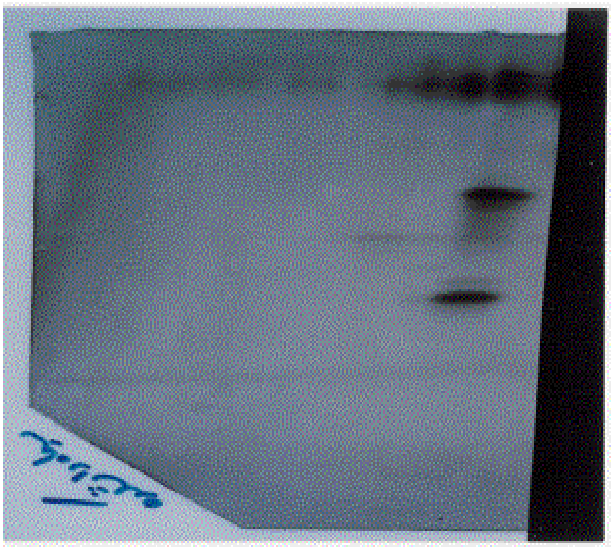


Time (min)	5.4	5.16	5.27	4.11	5.29	5.16	18.27	12.59
0.85	---	---	---	---	---	---	---	---
0.015	---	---	---	---	---	---	---	---
0.165	---	---	---	---	---	---	---	---
0.175	---	---	---	---	---	---	---	---
0.265	---	---	---	---	---	---	---	---
0.394	---	---	---	---	---	---	---	---
0.565	---	---	---	---	---	---	---	---

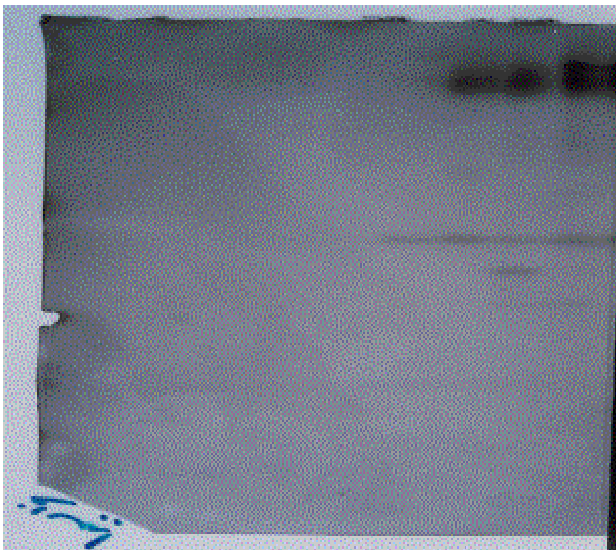
شکل ۱ و ۲ - الکتروفورز و طرح‌واره پراکسیداز در رقم سیاه دانشکده (بالا) و فراسیدا (پایین)

صورتیکه سایر آلوزیمها تنها در رقم "سیاه دانشکده" و آن هم در اسفند ماه قابل مشاهده می باشند (شکل ۳ و ۴). در جایگاه سوم (Pox3) این آنزیم نیز آلوزیم هموترامری در حرکت نسبی ۱۱۵۶/ تقریباً در هر دو رقم خصوصاً در ماههای آذر تا اسفند بیان شده است. در رقم "سیاه دانشکده" این نوار از اواسط خرداد ماه به شکل نسبتاً ضعیفی تا تیر ماه قابل مشاهده بود و پس از آن در مهر ماه از میزان فعالیت آن به شدت کاهش یافته بگونه ای که در سطح ژل هیچگونه باندهای قابل مشاهده نبود و مجدداً در اواخر پاییز (۱۳۷۹/۹/۱۰) با ظهور یک نوار نسبتاً پهن دارای فعالیت بیشینه ای میگردد. در رقم "فراسیدا" نیز باندهای نسبتاً ضعیف از اوایل خرداد ماه مشاهده و در پاییز با ظهور نوارهای پهن تا اواخر دوران زمستان به فعالیت خود

تشکیل دهنده آنها در نواحی مختلفی در سطح ژل مشاهده گردید بطوری که مجموعاً سه نوار مشاهده شده در حرکت نسبی ۰/۶۵ و ۰/۶۸ و ۰/۷۱ نشاندهنده فرمهای تریمری آنزیم بوده که احتمالاً یکی از فرمهای هموترامری به دلیل سرعت حرکت نسبی زیاد دچار کشیدگی فراوان گشته و قابل مشاهده نمی باشد. در جایگاه دوم (Pox2) با توجه به باندهای مشاهده شده در رقم "سیاه دانشکده" در اسفند ماه احتمالاً میتوان نتیجه گیری نمود که تعداد زیر واحد های آنزیمی تشکیل دهنده این جایگاه چهار تا میباشد که خود را به صورت یک نوار هموترامری در حرکت ۰/۳۴ و سه نوار هتروترامری ۰/۴۳ و ۰/۴۷ و ۰/۵۳ نشان می دهند. باندهای با حرکت نسبی برابر با ۰/۵۳ تقریباً در هر دو رقم بیان شده در



Wavelength (nm)	3.6	3.16	3.27	4.11	7.29	9.18	10.27	12.58
0.09								
0.1								
0.12								
0.14								
0.156								
0.24								
0.43								
0.47								
0.53								
0.65								
0.68								
0.71								



Wavelength (nm)	3.6	3.16	3.27	4.11	7.29	9.18	10.27	12.58
0.09								
0.1								
0.12								
0.14								
0.156								
0.24								
0.43								
0.47								
0.53								
0.65								
0.68								
0.71								

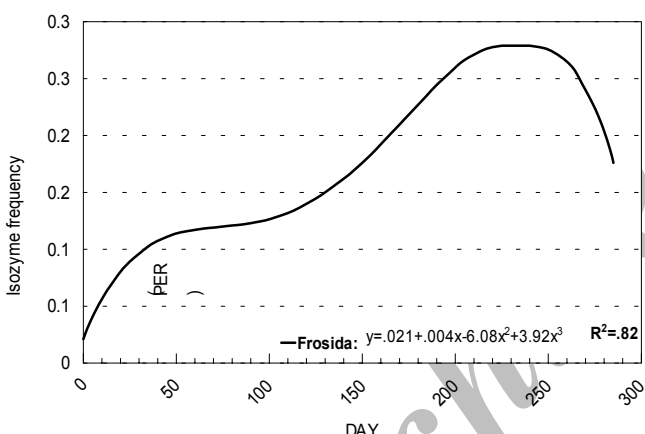
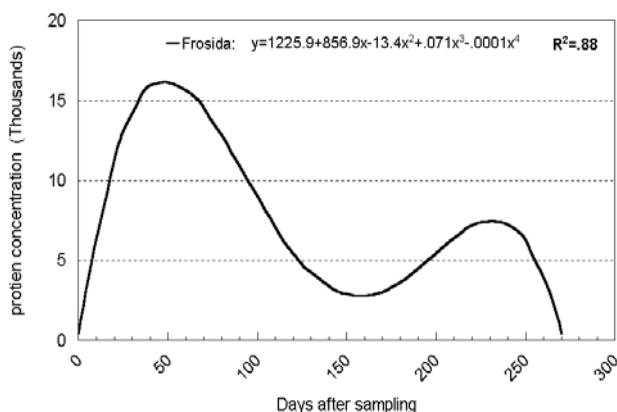
شکل ۳ و ۴- الکتروفورز و طرح واره پلی فنل اکسیداز در رقم سیاه دانشکده (بالا) و فراسیدا (پایین)

براساس مدل برآوردی تغییرات پروتئین در فاصله زمانی خرداد تا اسفندماه مشخص گردید که روند این تغییرات از نوع درجه چهارم بوده بطوریکه ۴۹ روز پس از نمونه گیری یعنی نیمه دوم تیرماه دارای یک افزایش اولیه بوده و پس از آن بتدریج از غلظت آن کاهش و در ۱۵۸ روز پس از نمونه گیری یعنی در اوایل آبان ماه به حداقل میزان خود در طول دوره رشد و نمو خواهد رسید. تغییرات پروتئین پس از این مرحله دارای یک روند افزایشی بوده بگونه ای که با افزایش ساعتهای سرمایی بر

ادامه می‌دهند. بطور کلی در اواسط تا اواخر دوران زمستان بر فعالیت باندهای ایزوزیمی در این جایگاه به طور قابل ملاحظه‌ای افزوده میگردد.

به منظور تعیین دامنه دقیق گل‌آغازی و شروع دوره رکود و رفع نیاز سرمایی با استفاده از تغییرات میزان پروتئین و فراوانی باندها در دو آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در زمانهای خرداد تا اسفند مدل‌های متعدد ریاضی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و از بین مدل‌های مورد بررسی آنهایی که دارای ضریب تعیین ( $R^2$ ) بیشتری بودند انتخاب گردیدند.

بطور کامل برطرف گردیده است. افزایش ساعتهای سرمایی پس از این مرحله تأثیری بر رفع نیاز سرمایی رقم نداشته بلکه تنها باعث افزایش سرعت باز شدن جوانه های گل تحت شرایط دماهای رشد شده است.



شکل ۵ و ۶- مدل و نمودار تغییرات پروتئین (بالا) و آنزیم پراکسیداز (پایین) در رقم فراسیدا نسبت به زمان

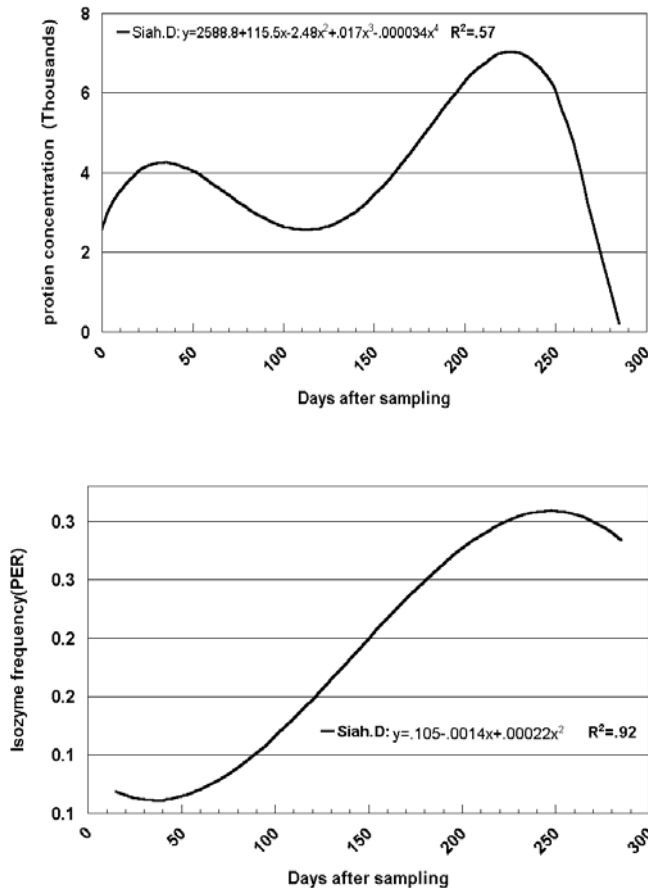
براساس مدل بدست آمده مشخص گردید که روند تغییرات پروتئین در طول دوره رشد و نمو دارای دوبیشنه می باشد بیشینه اول ۴۷ روز پس از نمونه گیری یعنی در اواسط تیرماه و همزمان با بنیان گذاری طرحهای اولیه گل تشکیل خواهد شد. پس از آن غلظت پروتئین بتدریج کاهش یافته و در شروع دوران رکود و آغاز رکود عمیق یعنی در ۱۱۳ روز پس از نمونه گیری به حداقل میزان خود در طول فصل می رسد.

میزان آن بتدریج افزوده و ۲۳۲ روز پس از نمونه گیری به سیکل ثانویه نقطه افزایشی خود خواهد رسید. حداکثر غلظت پروتئین در سیکل اولیه و ثانویه افزایشی به ترتیب درمقادیر ۱۶۱۵/۷ تا ۱۵۶۵۴/۲ و ۷۳۹۷/۲ تا ۷۲۴۴/۳ میکروگرم در میکرولیتر معنی دار نگردیده، بنابراین دامنه بنیان گذاری اندامهای گل در این رقم در ۴۰ تا ۵۰ روز پس از نمونه گیری یعنی در نیمه دوم تیر ماه و پایان دوران رکود در اواخر دیماه تا اواسط بهمن ماه خواهد بود. بر اساس همین مدل غلظتهای ۲۹۲۲/۵ لغایت ۲۹۱۰/۶ دارای حداقل تغییرات بود بنابراین دامنه استراحت عمیق جوانه های گل در فاصله دهه اول تا اواسط دهه سوم آبان ماه خواهد بود (شکل ۵). نتایج حاصله از تغییرات آنزیم پراکسیداز نیز منجر به مدل درجه دوم

$y = 0.021 + 0.004x - 6.08x^2 + 3.92x^3$  با ضریب تعیین ۰/۸۲ گردید. براساس این مدل روند تغییرات آنزیم تا ۴۵ روز پس از نمونه گیری دارای یک افزایش تدریجی بوده و سپس با یک شیب ملایم در ۲۳۸ روز پس از نمونه گیری یعنی در دهه سوم دی ماه پس از رفع نیاز سرمایی جوانه ها به حداکثر میزان خود در طول دوره رشد و نمو میرسد نتایج حاصله از همین مدل نیز مشخص نمود که در فاصله ۲۲۵ تا ۲۴۰ روز پس از نمونه گیری فراوانی باندهای ایزوزایمی معنی دار نگردیده. بنابر این دامنه رفع نیاز سرمایی این رقم بر اساس مدل برآوردی از این آنزیم در اواخر دی ماه تا اواسط بهمن ماه خواهد بود. آنزیم پلی فنل اکسیداز نیز در این رقم دارای یک مدل درجه دوم  $y = 0.063 - 0.0017x + 0.000027x^2$  با ضریب تعیین معنی دار شده گردید (۰/۸۴). در این آنزیم نیز روند تغییرات پس از تشکیل بنیان گذاری اندام های گل دارای یک سیکل افزایشی تا پایان دوران رکود گیاه می باشد.

نتایج حاصل از مقایسه سطوح مختلف سرمایی در این رقم بیانگر آن است که میزان باز شدن جوانه های گل با افزایش سطوح سرمایی بطرز چشمگیری زیاد می شود. بطوری که در سطح اول تیمار سرمایی (۵۰۰ ساعت سرمای موثر) تنها ۲۴ درصد از جوانه های گل باز شده مشاهده گردید در صورتیکه در سطح دوم تیمار سرمایی (۷۰۰ ساعت سرمای موثر) بیش از ۷۰ درصد از جوانه های گل باز شده و نیاز سرمایی این رقم

رسیده و در نتیجه ساعت‌های سرمایی در آنها کامل گردیده و نیاز سرمایی آنها بر طرف شده بود.



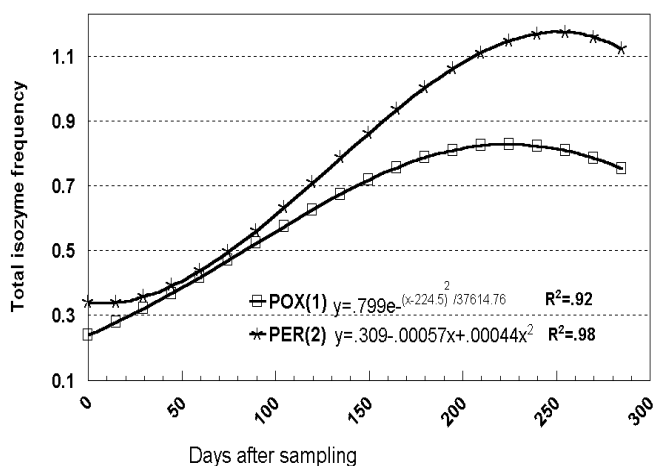
شکل ۷ و ۸- مدل و نمودار تغییرات پروتئین (بالا) و آنزیم پراکسیداز (پایین) در رقم سیاه دانشکده نسبت به زمان

### بحث

بررسی پروتئین‌های محلول در جوانه گل گیلاس تغییرات معنی‌داری را در طی مراحل نمو نشان داد. پروتئین کل در فاصله ماه‌های خرداد تا مرداد به طرز قابل توجهی افزایش می‌یابد این افزایش در ارقام مورد بررسی متفاوت بود بگونه‌ای که مقدار آن از سه تا هفت برابر متغیر بوده و حداکثر در رقم زود گلده و زود رس فراسیدا مشاهده می‌گردد. این افزایش در اثر فعالیت شدید تقسیم سلولی و تغییرات ساختمانی در مریستم رویشی و تبدیل آن به مریستم‌های زایشی که نیازمند به سنتز پروتئین‌های جدید و سایر آمینو اسیدهای ضروری جهت این فعل و انفعالات می‌باشد بوجود خواهد آمد (۲، ۶، ۷). اختلاف

تغییرات پروتئین پس از این تاریخ جالب توجه می‌باشد زیرا علیرغم حرکت گیاه بسوی دوران رکود بر میزان غلظت آن بتدریج افزوده می‌گردد بطوریکه مجدداً در ۲۳۲ روز پس از نمونه‌گیری یعنی در اواخر دی ماه به حداکثر میزان خود رسیده و بیشینه دوم تشکیل می‌شود. نقطه بیشینه اولیه و ثانویه و حداقل تغییرات پروتئین در دامنه غلظتهای ۶۱۶۲ و ۲۴۴۲/۲ و ۲۴۱۴/۵ و ۳۳۰۷/۵ و ۵۹۶۶/۱۰ و ۲۲۶۲/۷ و ۶۱۶۲ میکروگرم در میکرولیتر معنی‌دار تلقی نگردیده، بنابراین با توجه به اینکه در مسائل نیاز سرمایی و رکود و گل‌آغازی نمی‌توان یک نقطه را به عنوان شروع دوره معرفی نمود می‌توان با توجه به مدل تعیین شده دامنه گل‌آغازی و شروع دوران رکود عمیق و رفع نیاز سرمایی را به ترتیب ۳۰ تا ۴۰ و ۱۰۵ تا ۱۲۰ و ۲۲۵ تا ۲۴۰ روز پس از نمونه‌گیری اعلام نمود (شکل ۷ و ۸). بررسی تغییرات آنزیم پراکسیداز در طول زمان منجر به ارائه یک مدل درجه دوم با ضریب تعیین ۹۲ درصد گردید. براساس مدل حاصله این آنزیم ۱۵، ۴۵ روز پس از نمونه‌گیری دارای فعالیت معنی‌داری نبوده و پس از آن همزمان با شروع تشکیل بنیان‌گذاری گل فعالیت خود را بتدریج آغاز و پس از ۲۴۹ روز پس از نمونه‌گیری یعنی در اواخر بهمن ماه به حداکثر میزان خود می‌رسد. بنابراین، با توجه به مدل ارائه شده و تغییرات یکساخت این آنزیم در فاصله زمانی ۲۴۰ تا ۲۵۵ روز پس از نمونه‌گیری میتوان دامنه رفع نیاز سرمایی در این رقم را در دهه اول تا دهه سوم بهمن ماه عنوان نمود (شکل ۸). آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز نیز به طور کلی در این رقم همزمان با بنیان‌گذاری طرح‌های اولیه گلی فعالیت خود را آغاز و در اواخر دوران استراحت و پس از رفع نیاز سرمایی بر فعالیت آن افزوده گردید ولی با توجه به پائین بودن ضریب تعیین از ارائه مدل صرفنظر گردید (شکل ۹). نتایج حاصل از بررسی نیاز سرمایی قلمه‌های شاخه تحت شرایط کنترل شده نیز مشخص نمود که با افزایش ساعت‌های سرمایی بر میزان باز شدن ۵۰ درصد از جوانه‌های گل تحت شرایط فورسینگ افزوده می‌گردد. بطوریکه در ۵۰۰ و ۷۰۰ ساعت سرما دهی به ترتیب نیاز سرمایی این رقم برطرف نگردیده در حالیکه در تیمارهای بالاتر از آن میزان باز شدن جوانه‌های گل تحت شرایط دماهای رشد به بالاتر از ۵۰٪

ماه اکتبر تا ژانویه قرار گرفته بودند به طور پیوسته ادامه می یافت ولی این رشد در جوانه های محروم از سرما مشاهده نمی شد. آنها همچنین در طول اکتبر تا نوامبر کاهش نوکلئوتیدها و از ژانویه به بعد افزایش نوکلئوتیدها را در این جوانه ها مشاهده نمودند.



شکل ۹- مدل و نمودار تغییرات کل آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در ارقام مورد بررسی نسبت به زمان

آرورا و همکاران (۱۹۹۷) نیز افزایش پروتئین های ۸۱ و ۸۹ کیلو دالتونی و کاهش پروتئین های ۶۱ و ۱۸ کیلودالتونی را در ارقام *P. avium L cv Coeur de Pigeon* مشاهده نمودند. بررسی تغییرات پروتئین در اوایل پائیز تا اواخر زمستان مشخص نمود که مرحله حداکثر رکود در ارقام مورد بررسی بر اساس روند تغییرات پروتئین متفاوت بوده بگونه ای که در رقم "فراسیدا" ۱۵۸ روز در رقم "سیاه دنشکده" ۱۳ روز پس از نمونه گیری میزان پروتئین به حداقل و شدت رکود به حداکثر خود خواهد رسید پس از این مرحله در معرض گذاری جوانه های گل با سرما دهی موثر باعث افزایش تدریجی پروتئین خواهد شد. افزایش پروتئین در این مرحله احتمالاً بخاطر سنتز پروتئین های جدید و یا انتقال پروتئین های ذخیره ای ساقه یا ریشه به اندامها می باشد (۱۷). نتایج حاضر علاوه بر مشخص نمودن مرحله دقیق ورود گیاه به رکود که یکی از مهمترین نکات در مطالعات نیاز سرمایی می باشد (۱۱) مشخص می نماید که خروج گیاه از رکود به شکل تدریجی صورت خواهد گرفت و این خروج با افزایش

مشاهده شده در شروع سنتز پروتئین در ارقام مورد مطالعه می تواند نشان دهنده اختلاف در شروع بیوسنتز پروتئینهای آنزیمی و غیر آنزیمی لازم جهت رشد و نمو جوانه و رسیدن به بیشینه آن ناشی از فعال شدن متفاوت ژن های مسئول در این فرایند باشد بگونه ای که در رقم "فراسیدا" شروع افزایش سنتز این پروتئینها در دهه اول خرداد و در رقم "سیاه دانشکده" چندین روز قبل از این تاریخ مشخص گردیده است بر همین اساس دامنه گل انگیزی در این ارقام نیمه دوم تیرماه خواهد بود. این نتایج با بررسی های گایموند و همکاران (۱۹۹۸) در خصوص تعیین زمان گل انگیزی در گیلاس رقم بینگ با میکروسکوپ الکترونیکی مطابقت دارد. آنها مشخص نمودند که اولین تغییرات از مرحله رویشی به زایشی در دهه اول خرداد ماه و تمایز پریموردیای اندامهای زایشی در حدود سه تا چهار هفته بعد از آن یعنی در اواسط تیر ماه اتفاق می افتد. تغییرات پروتئین کل پس از طی دوران گل انگیزی در فاصله ماههای تیر تا اسفند ماه دارای اشکال متفاوت دیگری بوده و ارتباط مشخصی را با سایر مراحل نمو جوانه گل نشان می دهد بگونه ای که پس از رسیدن به یک ماکزیمم در اواخر خرداد تا تیر ماه مجدداً شروع به کاهش نموده و اواخر شهریور ماه تا مهر ماه به حداقل میزان خود در طول دوره رشد و نمو جوانه می رسد و پس از آن مجدداً با شروع فصل سرما و قرار گرفتن جوانه های گل در معرض دماهای موثر در شکسته شدن رکود افزایش معنی داری در پروتئین جوانه ها مشاهده می گردد. کاهش میزان پروتئین کل پس از طی دوره تمایز یابی اندامهای گل احتمالاً بخاطر کند شدن تقسیم سلولی در این مرحله و کاهش دما و آغاز مرحله ورود گیاه به رکود عمیق می باشد. نتایج حاصل از بررسی قلمه های شاخه در این مرحله یعنی اواخر مهر ماه تا اوایل آبان ماه تحت شرایط فورسینگ نیز هیچگونه فعالیت قابل مشاهده ای را در جوانه بوجود نیاورد.

ابراهیم زاده و همکاران (۱۳۷۷) نیز نشان دادند که پروتئینهای محلول جوانه انتهایی زعفران مزروعی در طی دوران خواب دارای روند کاهشی و پس از شکسته شدن رکود مجدداً دارای یک افزایش خواهد شد.

بونهوم و همکاران (۱۹۹۷) نیز مشخص نمودند که رشد طرحهای اولیه گل جوانه های هلو که در معرض دماهای سرد از



به حداکثر میزان خود رسید. از طرفی نتایج حاصل از بررسیهای تیمارهای سرمایی قلمه‌های شاخه به طرز بسیار جالب توجه ای نتایج فعالیت این آنزیم را مورد تأیید قرار داد. بگونه ای که در این بررسی مشخص گردید که رقم "سیاه دانشکده دارای نیاز سرمایی بالای بوده و تیمارهای ۷۰۰ ساعت سرمایی نیز جهت رفع نیاز سرمایی آن کافی نبود. درحالیکه رقم "فراسیدا" دارای کمترین میزان نیاز سرمایی بود و در تیمار کمتر از ۷۰۰ ساعت نیاز سرمایی آن برطرف گشت.

پلی فنل اکسیدازها نیز یکی از آنزیمهایی می باشد که از دیرباز در موجودات زنده ویژه گیاهان عالی شناخته شده اند و دارای نقش بسیار گسترده می باشند. بطور کلی مکانیسم هایی که باعث کاهش قدرت اتصال آنزیم به غشاء سلولی شده اند نظیر یخ بستن و آب شدن و به دنبال آنها تابش نور قرمز و غیره باعث افزایش فعالیت این آنزیم می شوند (۳). همچنین مشخص شده است که این آنزیم می تواند شاخص مراحل نمو معینی مانند ورود به مرحله آغازش گل باشد (۲). فعالیت این آنزیم در طی مراحل مختلف نمو در ارقام مورد بررسی شباهت بسیار زیادی با آنزیم پراکسیداز داشت به گونه ای که در معرض گذاری جوانه های گل در سرمای موثر جهت شکسته شدن رکود و رفع نیاز سرمایی باعث افزایش تدریجی این آنزیم گشته و در یک مقطع زمانی که مصادف با اوایل تا اواخر بهمن ماه می باشد بتدریج از فعالیت آن کاهش خواهد یافت (شکل ۲).

### سپاسگزاری

بدینوسیله از سرکارخانمها دکتر ابریشم چی و دکتر صبور و دکتر میقانی و آقایان دکتر رهنما و دکتر میر معصومی به خاطر مساعدت در امور آزمایشگاهی و آقای مهندس غفاری به دلیل راهنمایی در مسائل آماری و همچنین از مسئولین باغ تحقیقاتی موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تشکر می شود.

### REFERENCES

۱. ابراهیم زاده، ح.، پ. ابریشم چی و ع. صبور. ۱۳۷۷. بررسی تغییرات اونتوژنتیکی زعفران مزروعی (*Crocus sativus* L.) از طریق مطالعه پروتئینهای محلول بنه و جوانه. نهال و بذر جلد (۲): ۱۴-۲۸
۲. ابریشم چی، پ. ۱۳۷۹. بررسی متابولیسم تشکیل گل در گیاه زعفران مزروعی. رساله دکترای تخصصی، فیزیولوژی گیاهی. دانشکده علوم. دانشگاه تهران.

ساعتهای سرمای موثر به مرحله تکامل خود در اواخر دی تا اواسط بهمن ماه خواهد بود.

پراکسیدازها دارای نقش بسیار گسترده در گیاهان عالی می باشند و مشخص گردیده است که این آنزیم ارتباط نزدیکی با مراحل نمو گیاه دارد (۳، ۱۴). مشخص شده است که بین فعالیت کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز و سازگاری به سرما در گیاهان مختلف ارتباط مثبتی وجود دارد (۳). سرما دهی همچنین باعث فعالیت آنزیمهای متحمل به دمای پایین مانند پراکسیداز خواهد شد (۱۶). کمر همکاران (۱۹۹۳) نیز تغییرات فصلی آنزیم پراکسیداز را در سه گیاه سیب زمینی، کوکب و سیر بررسی نمودند و مشخص نمودند که در پائیز و زمستان در الگوی ایزوژیم های پراکسیدازی تغییرات فاحشی بوجود خواهد آمد و دمای پائین باعث افزایش فعالیت پراکسیدازها می شود و بیشترین فعالیت پراکسیدازها در ابتدای فصل زمستان رخ می دهد.

نتایج حاصل از بررسی آنزیم پراکسیدازها در طی مراحل مختلف رشد و نمو یعنی قبل از بنیان گذاری اندامهای گل و در زمان شروع دوران رکود و پس از آن منجر به ارائه یک مدل درجه دوم با ضریب تعیین بسیار بالا گشت بطوریکه در تمام ارقام مورد بررسی ارتباط نزدیکی بین فعالیت این آنزیم و دوره های سرمادهی موثر و رفع نیاز سرمایی در جوانه گل مشخص گردید. نتایج حاصل همچنین مشخص نمود که همزمان با بنیان گذاری اندامهای گل فعالیت این آنزیم آغاز گشته و به تدریج با افزایش پروده های سرمایی میزان آن افزایش یافته و در زمانهای متفاوتی به حداکثر میزان خود در کلیه ارقام مورد بررسی خواهد رسید بگونه ای که در رقم زود گلده و زود رس "فراسیدا" پس از ۲۳۸ روز فراوانی ایزوژیمهای پراکسیدازی به حداکثر میزان خود رسید در حالیکه در رقم تقریباً دیر گلده و دیر رس "سیاه دانشکده" فراوانی این آنزیم ۲۴۹ روز پس از نمونه گیری

### منابع مورد استفاده

۳. صالحی شانجانی، پ. ۱۳۷۵. کشت بافت و بررسی اثر عوامل محیطی بر متابولیسم فرآورده های ثانوی و تغییرات کمی و کیفی پروتئینی، ایزوزایمی پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در ارس. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم. دانشگاه تهران .
4. Arora, R., M. E. Wisniewski, & L.J. Rowland. 1997. Low temperature-induced expression of dehydrins in deciduous fruit crops and their relation to cold acclimation and / or dormancy. *Acta Hort.* 441:175-181.
  5. Bernier, G., J.M. Kinet, & R.M. Sachs. 1998. The physiology of flowering .C.R.C press. Vol II Chapter 3 and 5.
  6. Bhargava, S.C., K.G. Wasnik, & T.C. Pokhriay. 1978. Changes in soluble and protein nitrogen in relation to floral induction and inhibition in '*Salvia occidentalis*'. *Indian J. Exp. Biol.* 16:415-416.
  7. Bonhomme. M., R. Rageau, & J.P. Richard. 1997. Dormancy of peach floral buds: biological and tentative biochemical approaches. *Acta Hort.* 441:167-173.
  8. Bradford, M.M. 1976 . A rapid and sensitive method for quantitaion of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
  9. Byrne, D.H. & T.G. Littleton. 1989. Characterization of isozyme variability in apricots . *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114(4): 674-678.
  10. Chaudhry, W.M., T.C. Broyer, & L.C.T. Young. 1970. Chemical changes associated with the breaking of the rest period in vegetative buds of *pyrus Communis*. *Plant Physiol.* 23: 1157-1169.
  11. Felker, F.C. & H.A. Robitaille. 1985. Chilling accumulation and rest of sour cherry flower buds. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110:227-232.
  12. Guimond, C.M., P.K. Andrews & G.A. Long . 1998 . Scanning electron microscopy of floral initiation in sweet cherry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123:509-512.
  13. Hames, B.D. & D. Rickwood. 1990 . Gel electrophoresis of proteins. A practical approach second edition, Oxford University press, New York, pp : 290 .
  14. Kammerer, S., W. Praznik, G. Jessner, R. Ebermann & S.A.A. Korori. 1993. Seasonal changes of peroxidase isoenzymes and activity of fruction containing plant. *Plant Peroxidase III International Symposium.*
  15. Keller, J.D & W. H. Loescher. 1989. Nonstructural carbohydrate partitioning in perennial of sweet cherry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114:969-975.
  16. Saure, M.C. 1985. Dormancy release in deciduous fruit trees. *Hort Rev.* 7:239-300.
  17. Wang, S.Y., M. Faust & G.L. Steffens. 1985. Metabolic changes in cherry flower associated with breaking of dormancy in early and late blooming cultivars. *Plant Physiol.* 65:89-94.
  18. Webster, A.D. & N.E. Looney .1996. Cherries, crop physiology, production and uses. *CAB Interational* pp : 513 .