

مقایسه فراساختار و ترکیبات سیتوشیمیایی خامه‌های خود و دگر تلقیح رقم Bravo cool water mix (خودسازگار) و Bravo purple star (خودناسازگار) گیاه اطلسی (*Petunia hybrida*)

حکیمه علومی*^۱ و فرخنده رضائزاد^۲

۱- کرمان، پردیس دانش ماهان، مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، پژوهشکده علوم محیطی گروه اکولوژی.

۲- کرمان، دانشگاه شهید باهنر، دانشکده علوم، بخش زیست شناسی. پست الکترونیکی

oloumi.ha@gmail.com

چکیده

خودناسازگاری یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های گیاهی است که توسط آن گیاه از باروری مامه یا گامت ماده توسط گرده خودی ممانعت می‌کند و در نتیجه برون‌زادی را تشویق می‌کند. در این مطالعه، پس از گرده‌افشانی مادگی رقم خودناسازگار Bravo purple star و رقم خودسازگار Bravo cool water mix گیاه اطلسی با گرده‌های خودی و غیرخودی، ترکیبات سیتوشیمی بافت خامه خود و دگر تلقیح با استفاده از رنگ‌های آبی تولوئیدن، پرئودیک اسید شیف (به ترتیب برای رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها)، سیاه سودان و رودامین B هگزیل استر (برای رنگ‌آمیزی لپیدها) مورد مطالعه قرار گرفت. فراساختار لوله گرده خودی و غیرخودی نیز در رقم خودناسازگار Bravo purple star در بافت خامه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) بررسی شد. همچنین الگوی الکتروفورزی پروتئین‌ها به روش SDS PAGE و مقدار پروتئین کل، ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز با روش اسپکتروفوتومتری مطالعه شد. تفاوت قابل توجهی در سیتوشیمی بافت گذر خامه‌های خود و دگر تلقیح هر دو رقم مشاهده نشد. خودتلقیحی منجر به تغییرات فراساختاری لوله گرده و بافت گذر خامه خودتلقیح رقم خودناسازگار Bravo purple star شد. الگوی الکتروفورزی پروتئین‌ها در خامه‌های دو رقم مورد مطالعه تفاوت نشان داد. براساس نتایج، به نظر می‌رسد که خودتلقیحی بر فرایندهای متابولیکی سلول تاثیر می‌گذارد. این تغییرات متابولیکی می‌تواند منجر به بروز ناهنجاری‌های فراساختاری در لوله گرده و بافت خامه ناسازگار رقم خودناسازگار Bravo purple star شود که در نهایت رد گرده خودی را باعث می‌شود.

واژه های کلیدی: گیاه اطلسی، محتوای پروتئین، ترکیبات فنلی، خودناسازگاری، رنگ آمیزی سیتوشیمیایی، فراساختار

خامه

مقدمه

گونه‌ای، سیستم خودناسازگاری برای مهار درون‌زادی و تشویق برون‌زادی در بیشتر از ۷۰٪ از گونه‌های نهاندانگان عمل می‌کند [۱]. در خودناسازگاری گامتوفیتی خامه‌ای جورشکل که در تیره‌های سیب زمینی، نخود، رز و میمون دیده شده، اگر هاپلوتیپ گرده با یکی از هاپلوتیپ‌های مادگی جور شود، گرده به عنوان گرده خودی شناخته

در گیاهان مکانیسم‌های کنترل‌کننده قوی برای محدود کردن تلقیح، بین و درون گونه‌ها به منظور به حداکثر رساندن کیفیت دانه وجود دارد. در تلقیح درون

* عهده دار مکاتبات

شناسی اولیه رشد لوله ناسازگار باشد. بنابراین لوله‌های گرده ناسازگار که درون بافت گذر نفوذ کرده‌اند، دیواره‌های بسیار ضخیم‌تری را نشان می‌دهند [۷].

همچنین گزارش شده است گرده‌افشانی ناسازگار منجر به تغییر وضعیت متابولیک کلاله و بافت‌های خامه می‌شوند، بنابراین تغییر در میزان رادیکال‌های آزاد و در نتیجه میزان یا فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها، در شرایط خودناسازگاری دور از انتظار نیست. بیان شده است که واکنش SI در مادگی می‌تواند به دلیل تنش ناشی از تجمع رادیکال‌های فعال اکسیژن القاء شود [۸]. Neog و Singh (۲۰۰۴)، افزایش در فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و اسید فسفاتاز را در شرایط گرده‌افشانی ناسازگار در گیاه *Camellia sinensis*، گزارش کردند. آنها بیان کردند که این آنزیم‌ها، می‌توانند به طور مستقیم از رشد لوله گرده خودی ممانعت کنند و در نتیجه تغییر در فعالیت این آنزیم‌ها، نشان‌دهنده تغییرات بیوشیمیایی است که تحت تاثیر مکانیسم خودناسازگاری قرار گرفته و در سرانجام وضعیت متابولیک سلول را تغییر می‌دهد [۹].

گیاه *Petunia hybrida* از بسیاری از جنبه‌های خودناسازگاری مورد تحقیق قرار گرفته است. گل‌های بزرگ این گیاه برای گرده‌افشانی کنترل شده مناسب بوده، همچنین به مقدار کافی مادگی و بساک برای بررسی‌های بیوشیمیایی در اختیار محقق قرار می‌دهد. گیاه اطلسی به عنوان یکی از جنس‌های مناسب برای پرورش واریته‌های جدید است که با استفاده از بررسی ژنتیکی و بیوشیمیایی انواعی با رنگ‌های جدید از آن به وجود آمده است. رقم‌های متعددی از *P. hybrida* برای اهداف تحقیقاتی و تجاری به وجود آمده است. مانند سایر گونه‌های تیره بادمجان که تاکنون مطالعه شده‌اند، خودناسازگاری در گیاه *P. hybrida* گامتوفیتی با یک لوکوس S چندآلی می‌باشد.

به دلیل اهمیت مطالعات خودناسازگاری در تولید گیاهان دورگه، تنوع زیستی و اهداف تجاری، مطالعه حاضر با هدف‌های زیر انجام گرفت: بررسی و مقایسه ترکیبات سیتوشیمیایی خامه‌های خود و دگر تلقیح رقم‌های خودسازگار و خودناسازگار با استفاده از رنگ‌آمیزی سیتوشیمیایی، مطالعه تاثیر برهم‌کنش‌های ناسازگار بر فراساختار خامه و برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی شامل

شده و رشد لوله آن در خامه متوقف می‌شود. مطالعات مولکولی متعددی برای جواب به این سوالات که چطور مادگی گرده غیرخودی و خودی را تشخیص می‌دهد و چطور بازشناسی گرده خودی منجر به مهار رشد لوله گرده می‌شود انجام گرفته است [۲]. مشخص شده که پروتئین‌های S (به ویژه ریبونکلئازهای S یا S-RNase) برای رد گرده در خامه ضروری می‌باشند [۳]. در گونه‌های با کلاله مرطوب مثل تنباکو و اطلسی، قدرت پذیرش گرده وابسته به ترشحات غنی از پروتئین، آمینواسیدهای آزاد، لیپیدها و کربوهیدرات‌های ترشح شده از کلاله می‌باشد که محیط مناسبی برای فرایندهایی مانند پذیرش و بازشناسی گرده و کنترل دسترسی آب فراهم می‌کند. این محیط همچنین برای رشد پاتوژن‌های گیاهی مانند قارچ‌ها و باکتری‌ها مناسب می‌باشد [۴]. بخش لپیدی ترشحات، حاوی بسیاری از اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع بوده که به طور معمول به شکل تری آسیل گلیسرید می‌باشد. ترکیبات عمده دیگر شامل فنل‌ها، پروتئین‌ها، آنزیم‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و پلی ساکاریدها است. لیپیدهای متفاوتی روی آبگیری دانه گرده تاثیر می‌گذارند، بنابراین پیشنهاد می‌شود که لیپیدها احتمالاً با سطح دانه گرده (اگزین، انتین یا غشاء پلاسمایی) برای تغییر نفوذپذیری آن به آب، برهم‌کنش می‌دهند [۵].

مطالعات گیاه *Lycopersicon peruvianum* نشان داده است که در شرایط خودناسازگاری نه تنها توقف رشد لوله‌های گرده ناسازگار در خامه دیده می‌شود بلکه تغییرات فراساختاری در بافت خامه و لوله گرده ناسازگار از جمله ناپدید شدن لایه داخلی سلول و تجزیه شدن لوله انجام می‌گیرد. بیان شده که ناپدید شدن لایه داخلی، احتمالاً ناشی از شکسته شدن آن به ذرات متعددی باشد که به درون سیتوپلاسم لوله آزاد می‌شوند. به نظر می‌رسد که طبیعت فرایند تجزیه لوله‌های گرده ناسازگار شبیه همین فرایند در زمان ورود لوله گرده به درون قرینه در حال تجزیه باشد. بنابراین کمپلکس S در خامه می‌تواند مشابه آنچه که در ناحیه سفت در تلقیح سازگار به طور طبیعی اتفاق می‌افتد، به عنوان یک القاء کننده فرایند تجزیه لایه داخلی لوله گرده در نظر گرفته شود [۶]. همچنین گزارش شده که رسوب لایه فیبریلی خارجی در نوک لوله با یک سیتوپلاسم متراکم از علائم ریخت

شد. به این منظور مقاطع تهیه شده به مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه در رنگ آبی تولوئیدن قرار داده شدند، سپس عمل چسباندن لامل انجام گرفت. رنگ آبی تولوئیدن از حل نمودن ۰/۵ گرم آبی تولوئیدن در ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با $\text{pH} = 7/2$ تهیه گردید. به منظور رنگ آمیزی لیپیدها از رنگ سیاه سودان B استفاده شد. مقاطع پس از آبدهی به مدت ۲ دقیقه در اتانول ۷۰٪ قرار گرفتند و سپس با استفاده از رنگ سیاه سودان به مدت یک ساعت در دمای 60°C رنگ آمیزی شدند. لامها قبل از عمل چسباندن، به مدت یک تا دو دقیقه در اتانول ۷۰٪ رنگبری شدند. به منظور تهیه این رنگ، ۰/۳ گرم سیاه سودان در ۱۰۰ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ (نسبت جرمی به حجمی) حل شد و سپس به مدت سه ساعت در دمای 60°C به قرار گرفت و پس از صاف شدن مورد استفاده قرار گرفت. به منظور رنگ آمیزی لیپیدها مقاطع در رودامین B هگزیل استر (۳۰ میلی مولار) به مدت ۱۰-۵ دقیقه فرو برده شدند و سپس لامل روی لام قرار داده شدند. کربوهیدراتها با رنگ آمیزی با PAS قابل رویت می‌باشند. در ابتدا مقاطع در محلول اشباع دی‌نیتروفنیل هیدرازین برای مهار کردن آلئیدها به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند، سپس در پرپودیک اسید آبی (۱٪) به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. لامها سپس در رنگ فولگن به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و بعد با سدیم متاسولفیت ۰/۵٪ برای دو دقیقه و به دنبال آن با آب مقطر به مدت ۲۰ دقیقه، شسته شدند. از هر نمونه از هر رنگ آمیزی، حدود ۱۰ لام مورد مطالعه با میکروسکوپ نوری Olympus مدل AH2 قرار گرفت. پس از مطالعه لامها با میکروسکوپ، از نمونه‌های مناسب عکسبرداری شد.

مطالعه فراساختار خامه پس از گرده‌افشانی در رقم خودناسازگار Bravo purple star و رقم خودسازگار Bravo cool water mix با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM): خامه‌های گل‌های تلقیح شده با گرده خودی و غیرخودی از رقم Bravo purple star، ۴۸ ساعت پس از گرده‌افشانی، جدا شدند. خامه‌ها در مخلوط گلوآل‌دئید ۳٪ و پارافرمال‌دئید ۱٪ در بافر فسفات ۰/۲ مولار و $\text{pH} = 7/2$ به مدت ۵ ساعت در حرارت آزمایشگاه تثبیت شدند. پس از شستشو با بافر شوینده (بافر

محتوای ترکیبات مقدار پروتئین کل و میزان ترکیبات فنلی، فعالیت برخی آنزیم پلی فنول اکسیداز در خامه خود و دگرتلقیح رقم‌های خودسازگار و خودناسازگار گیاه اطلسی.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۸۸-۱۳۸۷ در بخش زیست شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام گرفت. مراحل انجام آزمایش به شرح ذیل می‌باشد.

تهیه بذر، کشت گیاه و شرایط گرده‌افشانی: دانه رقم‌های *P. Bravo purple star* و *P. hybrida* از شرکت Syngenta seeds B.V از کشور هلند، تهیه و در شرایط مزرعه‌ای کشت داده شدند و پس از گلدهی، کلاله‌های ۳۰ گل از هر رقم با دانه گرده بساک‌های تازه شکفته همان گل گرده‌افشانی شدند. همچنین در هر رقم ۳۰ گل ابتدا اخته و سپس با استفاده از دانه گرده پایه‌های سایر رقم‌ها مورد گرده‌افشانی قرار گرفتند. برای جلوگیری از گرده‌افشانی طبیعی در گل‌هایی که به طور مصنوعی گرده‌افشانی شده بودند، انتهای گلبرگ‌ها بسته شد [۱۰].

بررسی‌های سیتوشیمیایی: پس از گرده‌افشانی در رقم خودناسازگار Bravo purple star و رقم خودسازگار Bravo cool water mix از رنگ آمیزی سیتوشیمیایی برای مقایسه میزان پروتئین، لیپیدها و کربوهیدرات‌ها در بافت‌های خودتلقیح و دگرتلقیح کلاله و خامه هر دو رقم انجام گرفت. به این منظور ۴۸ ساعت پس از گرده‌افشانی، مادگی‌ها از گل‌ها جدا و پس از تثبیت با FAA، و انجام مراحل شستشو، آگیری، شفاف سازی، پارافین‌دهی و قالب‌گیری مطابق با روش زیر برش‌های میکروتومی تهیه گردید. برای تهیه تثبیت‌کننده FAA، از ۰/۲ میلی لیتر فرمالدئید تجارتي ۳۷٪، ۱۷ میلی لیتر اتانول ۹۶٪ و ۱-۰/۵ میلی لیتر استیک اسید خالص (گلاسیال) استفاده شد. سپس برش‌ها روی لام تثبیت و پس از پارافین زدایی و آبدهی رنگ آمیزی شد. از هر رقم تعداد ۱۰ مادگی برای مطالعه توسط هر نوع رنگ استفاده شد [۱۱]. رنگ آمیزی با رنگ‌های سیتوشیمیایی به روش‌های ذیل انجام گرفت: از آبی تولوئیدن به عنوان رنگ کننده عمومی پروتئین‌ها و پلی‌آنیون‌های اسیدی استفاده

کاری برادفورد افزوده و بی‌درنگ پس از آن ورتکس گردید. پس از حدود ۵ دقیقه جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر (Varian Cary 50, USA) در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. سنجش پروتئین در هر نمونه خود و دگر تلقیح رقم خودسازگار و خودناسازگار با ۴ تکرار انجام گرفت. جهت تهیه محلول ذخیره معرف ۳۵۰ میل‌گرم کوماسی برلیانت بلو G250 در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ به مدت ۱ ساعت حل و سپس قطره قطره ۲۰۰ میلی‌لیتر فسفریک اسید ۸۵٪ به آن افزوده شد. برای تهیه محلول کاری برادفورد ۱۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪، ۳۰ میلی‌لیتر فسفریک اسید ۸۵٪ و ۳۰ میلی‌لیتر محلول ذخیره معرف در یک ظرف مخلوط شد و در پایان حجم کل محلول به کمک آب مقطر به ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره یک، صاف شد. از آلومین گای برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO):

مخلوط واکنش شامل بافر تریس ۰/۲ مولار با pH=۷/۶ و پیروگالول ۰/۰۲ مولار بود. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی شروع شد. در حضور آنزیم پلی فنل اکسیداز، پیروگالول موجود در مخلوط واکنش، به پورپوروگالین تبدیل می‌شود. کاهش در جذب پیروگالول در ۴۲۰ نانومتر، پس از ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نسبت به زمان شروع واکنش، محاسبه گردید. تغییرات جذب در مدت ۱ دقیقه محاسبه شد. سپس با استفاده از ضریب خاموشی پیروگالول ($\text{mMol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (۶/۲) و فرمول $A = \epsilon bc$ ، مقدار برجای مانده پیروگالول در مخلوط واکنش به دست آمد. یک واحد آنزیمی پلی فنل اکسیداز شامل مقدار پیروگالولی است که در مدت ۱ دقیقه به پورپوروگالین تبدیل می‌شود [۱۳]. فعالیت آنزیمی برحسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۱۰۰ میکرولیتر (به دست آمده از روش Bradford, 1976) عصاره محاسبه گردید.

اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی: مقدار ۰/۱ گرم

از بافت خامه گرده‌افشانی شده با گرده خودی و غیر خودی از رقم خودسازگار و خودناسازگار در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ سائیده و به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در تاریکی نگهداری شد. سپس به ۱ ml از محلول روئی، ۱ ml اتانول

فسفات ۰/۲ مولار، pH=۷/۲)، نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در ۴°C در تتراکسیداسمیوم ۱٪ در بافر فسفات ۰/۱ مولار قرار داده شدند. پس از دو بار شستشو با آب مقطر در سری الکل‌های ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ (دوبار)، هر یک به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه آبیگری شدند [۶]. نمونه‌های آبیگری شده دو بار در ۱ و ۲ اکسید پروپیلن و هر بار به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس ضمن استفاده از درجات رو به افزایش اسپور به در محیط رزینی اسپور فرو برده شدند. در نهایت قالب‌ها جهت پلی مریزه شدن در آون ۶۰°C قرار داده شدند. پس از پلی مریزاسیون، نمونه‌ها در قالب‌های پلاستیکی قالب‌گیری شدند و به کمک چسب، روی کپسول‌های رزینی چسبانده شدند. سپس با تیغ‌های شیشه‌ای قرار گرفته روی اولترامیکروتوم (Ultramicrotome Leo 912, Germany) از محل مناسب نمونه برش‌های ۶۰-۹۰ نانومتری و برای مطالعات میکروسکوپ الکترونی استفاده شدند. نمونه پس از قرار گرفتن روی گریدهای مربوطه، به وسیله میکروسکوپی الکترونی گذاره متصل به کامپیوتر (Leo 906 E, Germany) مطالعه و عکس برداری شدند. تعداد ۱۰ نمونه از مادگی‌های خود و دگر تلقیح رقم Bravo purple star برای مشاهده میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) استفاده گردید.

استخراج عصاره پروتئینی و سنجش پروتئین

کل: مقدار ۰/۱ گرم از خامه‌های گرده‌افشانی شده با گرده خودی یا غیر خودی در رقم‌های Bravo purple star و Bravo cool water mix، در ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷/۲ که شامل ۱ میلی‌مول اتیلن دی آمین تترااستیک اسید (EDTA)، فیل متان سولفونیل فلورید (PMSF) ۱ میلی‌مولار و پلی وینیل پیرولیدون (PVP) ۱ درصد بود، سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار (Centrifuge 5804R, Germany) شرکت Eppendorf (۱۴۰۰۰ دور و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت. از محلول روئی برای مطالعه سنجش پروتئین (الگوی الکتروفورزی و مقدار کمی پروتئین‌های کل) استفاده گردید. سنجش پروتئین با استفاده از روش Bradford (۱۹۷۶) [۱۲] انجام شد. مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره پروتئینی به ۱ میلی‌لیتر بافر

water mix نشان داد بنابراین محتوای کربوهیدراتی مادگی در رقم Bravo purple star بیشتر است. تفاوتی در رنگ‌پذیری به PAS بین خامه‌های خود و دگرتلقیح دو رقم مشاهده نشد. شدت رنگ‌پذیری به رنگ‌های آبی تولوئیدن، سیاه سودان، رودامین B هگزیل استر و PAS در خامه‌های خودتلقیح و دگرتلقیح هر دو رقم خودسازگار و خودناسازگار مشابه بود و نوع گرده‌افشانی بر ترکیب ترشحات خارج سلولی تاثیر قابل مشاهده نداشت. همچنین بیشترین رنگ‌پذیری در بخش کللاه‌ای هر دو رقم مشاهده شد. شدت رنگ‌پذیری در مسیر گذر بافت خامه نیز بیشتر از سلول‌های بیرونی در طول خامه بود.

فرا ساختار سلول‌های مسیرگذر و لوله گرده پس از خود و دگرتلقیحی در رقم خودناسازگار Bravo purple star: در ریزنگاره‌های الکترونی خامه دگرتلقیح رقم Bravo purple star، سلول‌های خامه دایره‌ای شکل بودند. این سلول‌ها دارای ذرات نشاسته بودند. همچنین دیواره این سلول‌ها در میکروگراف الکترونی، نازک و الکترون روشن (electron lucent) دیده می‌شد. در سیتوپلاسم سلول‌ها واکوئل‌های کوچک، قابل مشاهده بودند (شکل ۱، الف). لوله گرده دارای مقطع دایره‌ای شکل بود و با محتویات سیتوپلاسمی و دیواره الکترون روشن دیده می‌شد (شکل ۱، ب).

سلول‌های بافت گذر خامه خودتلقیح، دایره‌ای شکل با سیتوپلاسم در حال تجزیه بودند که رسوبات ناشی از تجزیه سیتوپلاسم به صورت ذرات الکترون متراکم (electron dense) نزدیک دیواره مشاهده شد (شکل ۲، الف، ب). دیواره سلولی در لوله گرده خودی در بافت گذر، ضخیم و چند لایه‌ای شده به طوری که دهانه لوله گرده در حال مسدود شدن بود (شکل ۲، ب و ج).

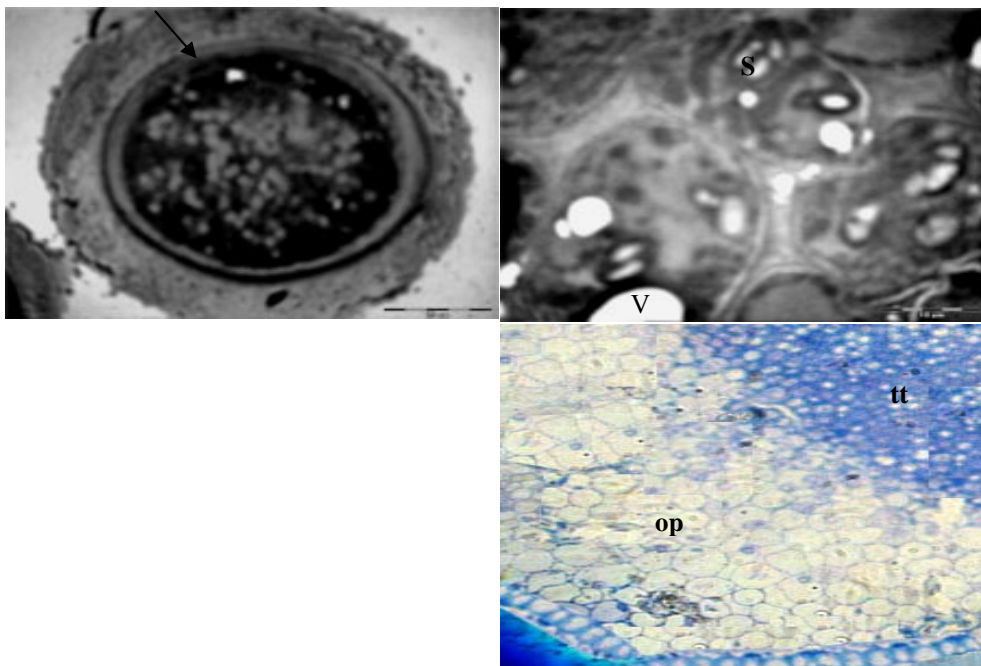
۹۵٪ اضافه و با آب دوبار تقطیر، حجم محلول به ۵ml رسانیده شد. مقدار ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین ۵۰٪ و ۱ml کربنات سدیم ۵٪ به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱ ساعت در تاریکی نگهداری شد. سپس جذب هر نمونه در ۷۲۵ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت ترکیبات فنلی، از منحنی استاندارد گالیک اسید استفاده شد. [۱۴].

تحلیل داده‌ها: برای مطالعات بیوشیمیایی آزمایش‌های مربوط به فعالیت آنزیمی، مقدار پروتئین و محتوای ترکیبات فنلی با ۴ تکرار انجام گرفت. میانگین گروه‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (version 15) توسط آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۵، مورد تجزیه واریانس یک عاملی قرار گرفت. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel 2003 رسم شد.

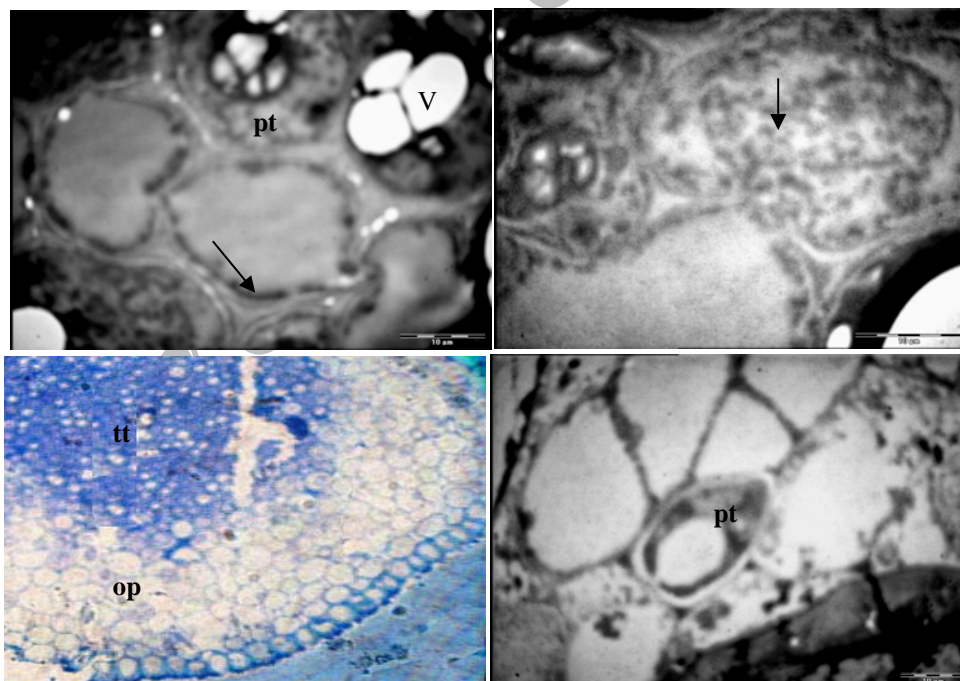
نتایج

سیتوشیمی بافت خامه رقم خودناسازگار Bravo purple star و رقم خودسازگار Bravo cool water mix: مطالعات سیتوشیمیایی به منظور بررسی طبیعت شیمیایی بافت خامه انجام گرفت. ترکیبات پروتئینی خامه با آبی تولوئیدن به رنگ آبی و ترشحات لیپیدی با رنگ سیاه سودان، به رنگ سیاه و با رودامین B هگزیل استر، به رنگ قرمز دیده می‌شوند. ترشحات کربوهیدراتی مادگی نیز با پرئودیک اسید (PAS) به رنگ ارغوانی ظاهر می‌شوند.

نتیج، نشان‌دهنده مقادیر بالایی از پروتئین‌ها و لیپیدها در بافت خامه هر دو رقم بود. رنگ‌پذیری به آبی تولوئیدن و سیاه سودان در رقم Bravo cool water mix با شدت بیشتری مشاهده شد. شدت رنگ‌پذیری به آبی تولوئیدن و سیاه سودان در انتهای خامه هر دو رقم نسبت به ابتدای خامه کمتر بود. بافت‌های خامه رقم‌های Bravo cool water mix و Bravo purple star به طور مشابهی با رودامین B هگزیل استر، رنگ شدند و تفاوتی در رنگ‌پذیری به رودامین B هگزیل استر بین دو رقم مشاهده نشد. میزان رنگ‌پذیری به رودامین در انتهای خامه هر دو رقم نسبت به ابتدای خامه کمتر بود. بافت‌های خامه رقم Bravo purple star رنگ‌پذیری بیشتری به PAS در مقایسه با رقم Bravo cool



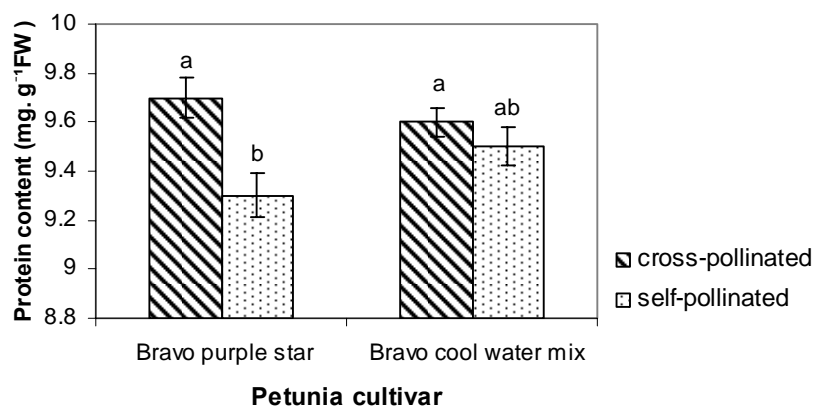
شکل ۱- ریزنگاره الکترونی خامه دگر تلقیح رقم خودناسازگار **Bravo purple star**. الف: سلول‌های بافت گذر که در آن محتویات سیتوپلاسمی شامل واکوئل‌های (V) کوچک و ذرات نشاسته قابل مشاهده بود. (S: ذرات نشاسته‌ای) ب: لوله گرده مدور با سیتوپلاسم متراکم و دیواره ضخیم در مادگی. ه: مقطع عرضی خامه با ضخامت ۹۰ نانومتر که در آن بافت گذر (tt) و بخش پیرامونی (op) نشان داده شده است (بزرگنمایی ۴۰X).



شکل ۲- ریزنگاره الکترونی خامه خودتلقیح رقم خودناسازگار **Bravo purple star**. الف: سلول‌های بافت گذر که در آن محتویات سیتوپلاسمی قابل تشخیص نبود و سیتوپلاسم در حال تجزیه بود. ب: سیتوپلاسم تجزیه شده که ذرات ناشی از تجزیه سیتوپلاسم در نزدیک دیواره قابل مشاهده بود (نوک پیکان). در برخی سلول‌ها واکوئل‌ها (V) در حال بزرگ شدن مشاهده شد. لوله گرده (pt) با دیواره ضخیم و چندلایه نیز در این بافت مشاهده می‌شود. ج: سلول فاقد محتویات سیتوپلاسمی با یک لوله گرده ناسازگار (pt) که دیواره آن ضخیم و چندلایه شده است و محتویات سیتوپلاسمی در آن دیده نمی‌شود. د: مقطع عرضی خامه با ضخامت ۹۰ نانومتر که در آن بافت گذر (tt) و بخش پیرامونی (op) نشان داده شده است (بزرگنمایی ۴۰X).

خامه دگرتلقیح رقم Bravo purple star تفاوت معنی داری نشان نداد. در رقم Bravo cool water mix محتوای پروتئین کل بین خامه تلقیح شده با گرده خودی یا گرده غیر خودی تفاوت نداشت (شکل ۳).

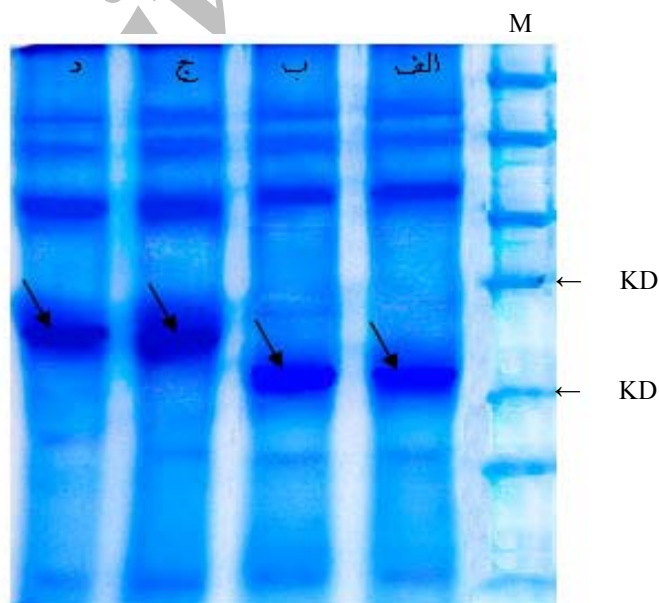
بررسی کمی و کیفی پروتئین های خامه: مقدار پروتئین کل در خامه خودتلقیح رقم Bravo purple star در مقایسه با خامه دگر تلقیح همین رقم کاهش نشان داد. محتوای پروتئین خامه خود و دگرتلقیح رقم Bravo cool water mix در مقایسه با پروتئین کل



شکل ۳- محتوای پروتئین (mg g⁻¹FW) در خامه خود و دگرتلقیح رقم های Bravo purple star و Bravo cool water mix گیاه اطلسی. داده ها شامل میانگین ± خطای استاندارد می باشند.

water mix فاقد این نوار پروتئینی بود. همچنین رقم Bravo cool water mix دارای نوار پروتئینی دیگری در محدوده ۳۰ کیلودالتون بود. تفاوتی بین نوار الکتروفورزی خامه خودتلقیح و دگرتلقیح دو رقم مشاهده نشد (شکل ۴).

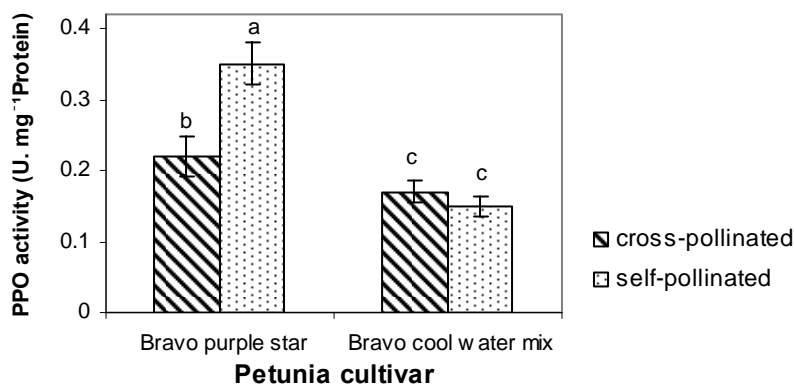
الگوی الکتروفورزی خامه خود و دگرتلقیح رقم های Bravo purple star و Bravo cool water mix در محدوده بین ۲۵ تا ۳۵ کیلودالتون با یکدیگر تفاوت داشت. رقم Bravo purple star دارای نوار پروتئینی با وزن مولکولی ۲۷ کیلودالتون بود اما رقم Bravo cool



شکل ۴- الگوی الکتروفورزی خامه خود و دگرتلقیح. الف و ب: به ترتیب خامه خودتلقیح و دگرتلقیح رقم خودناسازگار Bravo purple star. ج و د: به ترتیب خامه خودتلقیح و دگرتلقیح رقم Bravo cool water mix. Bravo purple star دارای نوار پروتئینی با وزن مولکولی ۲۷ کیلودالتون و رقم Bravo cool water mix دارای نوار پروتئینی با وزن مولکولی ۳۰ کیلودالتون بود. (M: نشانگر وزن مولکولی پروتئین).

Bravo cool water mix در مقایسه با فعالیت آن در خامه دگر تلقیح رقم Bravo purple star کمتر بود. فعالیت این آنزیم در رقم Bravo cool water mix با نوع گرده‌افشانی تغییر نکرد (شکل ۵).

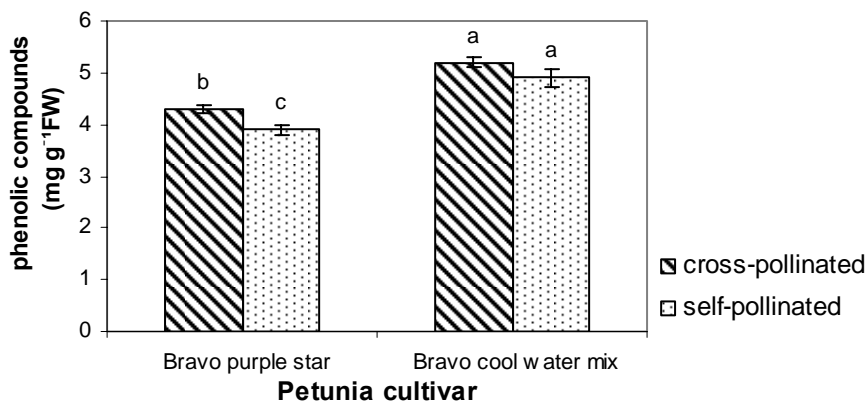
آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO): فعالیت آنزیم PPO در خامه خود تلقیح رقم Bravo purple star در مقایسه با خامه دگر تلقیح همین رقم افزایش نشان داد. فعالیت PPO در خامه خود و دگر تلقیح رقم



شکل ۵- فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (U. mg⁻¹ Protein) در خامه خود و دگر تلقیح رقم‌های Bravo و Bravo purple star و Bravo cool water mix گیاه اطلسی. داده‌ها شامل میانگین ± خطای استاندارد می‌باشند.

فنی در رقم Bravo cool water mix نداشت. محتوای ترکیبات فنی در رقم Bravo cool water mix بیشتر از رقم Bravo purple star بود (شکل ۶).

میزان ترکیبات فنی: در شرایط خودتلقیحی، محتوای ترکیبات فنی در رقم Bravo purple star کاهش یافت. نوع گرده‌افشانی تاثیری بر میزان ترکیبات



شکل ۶- محتوای ترکیبات فنی (mg g⁻¹ FW) در خامه خود و دگر تلقیح رقم‌های Bravo cool water و Bravo purple star گیاه اطلسی. داده‌ها شامل میانگین ± خطای استاندارد می‌باشند.

هستند) می‌باشد و حذف این ترکیبات ترش‌چی با استفاده از سلول‌کش‌ها منجر به توقف رشد لوله گرده می‌شود [۱۵]. ترشحات کلاله‌های مرطوب غنی از لیپید (مثل خانواده سیب زمینی) یا غنی از کربوهیدرات (مثل خانواده سوسن) می‌باشد [۱۱]. ترشحات کلاله‌ای رویش طبیعی و

بحث

سیتوشیمی بافت خامه رقم‌های Bravo cool water mix و Bravo purple star: محیط خارج سلولی مادگی در طول مسیر رشد لوله گرده، غنی از پلی‌ساکاریدها، لیپیدها و پروتئین‌ها (که گاهی گلیکوزیده

متعددی را در ترشحات مادگی بیان کردند. براساس نتایج آنها بالاترین میزان این ترشحات در کلاله مشاهده شد و به تدریج از میزان آن در بخش پایینی خامه کاسته می‌شود. آنها بیان کردند که ترشحات کلاله‌ای و به ویژه ترکیبات لیپیدی از سلول‌های اپیدرمی و پرزها به خارج سلول و سطح پوستک آزاد می‌شوند [۱۸]. گزارش شده است که در مادگی، لوله‌گرده از طریق مولکول‌های موجود در سطح دیواره و نیز ترکیبات موجود در فضای خارج سلولی به سلول‌های بافت مادگی متصل می‌شود. علاوه بر پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها نیز به فضای خارج سلولی ترشح شده و فضای شیمیایی و فیزیکی مناسبی را برای رشد لوله‌گرده فراهم می‌کنند. در شرایط "درزیه" مولکول‌های موجود در سطح سلول‌گرده با ترکیبات مادگی که رشد لوله‌گرده را به سمت تخمدان هدایت می‌کنند، برهم‌کنش می‌دهد [۱۵].

Herrero و Dickinson (۱۹۸۱) بیان می‌کنند که ترکیبات سیتوشیمیایی مشابه در کلاله و خامه خود و دگرتلقیح نشان دهنده نقش غیرفعال این ترکیبات در بروز برهم‌کنش‌های خودناسازگاری در گیاه اطلسی می‌باشد، همچنان که در این مطالعه نیز با توجه به تفاوت دو رقم در نوع ترکیبات پروتئینی، لیپیدی و پلی‌ساکاریدی، تفاوتی در رنگ‌پذیری خامه خود و دگرتلقیح به رنگ‌های سیتوشیمیایی مشاهده نشد. بنابراین به نظر می‌رسد که ترشحات کلاله‌ای و ترکیبات خارج سلولی نقش مهمی در بروز برهم‌کنش‌های خودناسازگاری در این گیاه نداشته باشد [۷].

فرا ساختار سلول‌های مسیرگذر و لوله‌گرده پس از خود و دگرتلقیحی در رقم Bravo purple star: سلول‌های بافت خامه‌گرده‌افشانی شده با لوله‌گرده خودی رقم Bravo purple star، دایره‌ای شکل بودند. این سلول‌ها دارای ذرات نشاسته بودند. همچنین دیواره این سلول‌ها نازک و الکترون روشن بود. در سیتوپلاسم سلول‌ها واکوئل‌های کوچک، قابل مشاهده بودند. لوله‌گرده در خامه دارای مقطع دایره‌ای شکل بود و با ذرات سیتوپلاسمی و دیواره الکترون روشن دیده می‌شد. سلول‌های بافت پیرامونی خامه خودتلقیح، مدور با سیتوپلاسم در حال تجزیه بودند که رسوبات ناشی از تجزیه سیتوپلاسم به صورت ذرات الکترون متراکم نزدیک

هدایت لوله‌گرده را به سمت تخمدان باعث می‌شوند. شیب ایجاد شده از مولکول‌های چربی که در سطح مسیر عبور لوله‌گرده وجود دارد در علامت‌دهی مناسب برای رشد لوله‌گرده ضروری می‌باشد [۱۵]. در این مطالعه میزان ترکیبات ضروری برای رشد لوله‌گرده در مادگی خودتلقیح و دگرتلقیح رقم خودسازگار و خودناسازگار و نقش احتمالی آنها در مهار رشد لوله‌گرده در مادگی خودتلقیح رقم خودناسازگار مورد مطالعه قرار گرفت.

موسیلژ کلاله‌ای و ترکیبات خارج سلولی با رنگ‌های سیتوشیمیایی آبی تولوئیدن، برای پروتئین‌ها، سیاه سودان و رودامین B هگزیل استر برای لیپیدها و PAS، برای پلی‌ساکاریدها در هر دو رقم خود و دگرتلقیح قابل رویت بودند. قابل توجه است که میزان رنگ‌پذیری به این رنگ‌ها در نواحی مختلف مادگی متفاوت بود. تفاوتی در ترشحات خارج سلولی مادگی‌های خودتلقیح و مادگی‌های دگرتلقیح در دو رقم مشاهده نشد. Williams و همکاران (۱۹۸۲) نیز به نتایج مشابهی در مطالعه ترشحات مادگی خرزهره هندی خود و دگرتلقیح اشاره کردند. آنها پیشنهاد کردند که رنگ‌پذیری متفاوت به ترکیبات سیتوشیمیایی در طول بافت مادگی نشان دهنده این است که لوله‌گرده، مسیر رشد خود را با تغییر در ویژگی‌های شیمیایی مسیر خامه پیدا می‌کند [۱۶]. رنگ‌پذیری بالای ترشحات کلاله و ترکیبات خارج سلول مسیر گذر خامه به ویژه در کلاله به رنگ‌های سیتوشیمیایی نشان دهنده مقادیر بالای این ترشحات در بافت مادگی می‌باشد. Villar و همکاران (۱۹۸۷) این رنگ‌پذیری بالا را نشانه‌ای از وجود خامه مرطوب در گیاه *Populus alba* دانسته که انتقال ترشحات از سیتوپلاسم و دیواره سلولی به سطح کلاله و فضای خارج سلولی مسیر گذر لوله‌گرده را مشخص می‌کند [۱۷]. شواهد بیان می‌کند که مسیر گذر بافت خامه شرایط بسیار مناسبی را برای رشد لوله‌گرده فراهم می‌کند. مولکول‌های آب و لیپیدها فاکتورهای بسیار مهمی برای رویش و رشد لوله‌گرده در کلاله *Nicotiana alata* می‌باشند. همچنین با حذف ترکیبات کربوهیدراته و پروتئینی و در نتیجه مهار رشد لوله‌گرده، اهمیت این ترکیبات در مسیر گذر برای رشد لوله‌گرده در مادگی گیاه *N. alata* به اثبات رسیده است [۱۵].

Konar و Linskens (۱۹۶۶) در مطالعه ریخت شناسی و تشریح مادگی گیاه اطلسی وجود ترکیبات

[۶]. Carraro و همکاران (۱۹۸۶) بیان کردند که ترشح پراکسیدازهای بافت گذر خامه پس از خودتلقیحی مسئول ضخیم شدن دیواره خارجی لوله گرده و مهار رشد لوله ناسازگار می‌باشند [۸]. Cheung و همکاران (۲۰۰۰) بیان کردند که پس از گرده‌افشانی ناسازگار سلول‌های بافت گذر به تدریج سیتوپلاسم متراکم خود را از دست داده به شکل واکوئله با دیواره نازک قابل رؤیت هستند [۱۵]. Dickinson و Herrero (۱۹۸۱) بیان کردند که در لوله‌های گرده ناسازگار، تعادل بین ترکیبات سیتوپلاسمی به طور قابل توجهی تغییر می‌کند. اولین علائم این تغییرات به زودی پس از نفوذ لوله گرده به درون بافت گذر مشاهده می‌شود. این تغییرات شامل افزایش سرعت رسوب‌گذاری در دیواره فیبریلی در نوک لوله گرده و از دست رفتن سیتوپلاسم می‌باشد. شواهد بیانگر وجود دیواره‌های بسیار ضخیم در لوله‌های گرده ناسازگار در بافت گذر می‌باشد [۷]. گزارش شده است که ضخیم‌شدگی لوله گرده و تجزیه سیتوپلاسم، پس از برهم‌کنش‌های ناسازگار رخ می‌دهد [۶].

de Nettancourt و همکاران (۱۹۷۳) بیان کردند که مقطع عرضی لوله‌های گرده ناسازگار در بخش زیر رأسی غیرمدور بوده و چند ساعت پس از گرده‌افشانی و رویش لوله گرده ناسازگار، دیواره داخلی لوله گرده نازک‌تر می‌شود. همچنین ذراتی با اندازه‌های متفاوت و تراکم الکترونی کمتر در سیتوپلاسم تجمع می‌یابد. آنها وجود پلی‌ساکاریدهایی را در دیواره خارجی لوله گرده تشخیص دادند. آنها بیان کردند که به تدریج با افزایش ذرات پلی‌ساکارییدی در دیواره خارجی، دیواره داخلی ناپدید شده و دیواره خارجی ضخیم‌تر می‌شود [۶]. گزارش شده است که در گرده‌افشانی ناسازگار، تغییرات ریخت شناسی متعددی در لوله گرده ناسازگار رخ می‌دهد. این تغییرات شامل تشکیل شبکه آندوپلاسمی بزرگ به شکل دوایر هم‌مرکز، سیتوپلاسم تجزیه شده لوله گرده، از دست رفتن پیوستگی غشاء و ترکیدن لوله می‌باشد. این تغییرات در نهایت منجر به مرگ سلول گرده در اثر عوامل کلاله‌ای یا خامه‌ای می‌شود. این شواهد بیان می‌کند که مهار رشد لوله گرده در خودناسازگاری گامتوفیتی شامل نکروزگی و مرگ سلولی بوده و فرایند خودکشی سلولی را شامل نمی‌شود [۱۹].

دیواره مشاهده شد. ریزنگاره‌های الکترونی بافت گذر خامه گرده‌افشانی شده با گرده خودی رقم *Bravo purple star*، سلول‌هایی چند وجهی فاقد سیتوپلاسم و دیواره نازک را نشان داد. دیواره سلولی در لوله گرده خودی در بافت گذر و بافت پیرامونی آن، ضخیم و چند لایه‌ای شده به طوری که دهانه لوله گرده در حال مسدود شدن بود.

فراساختار لوله‌های گرده غیرخودی سازگار مورد مطالعه در این پژوهش با شواهد به دست آمده روی گیاه اطلسی [۶، ۸] توتون [۷] و گوجه فرنگی [۱۵] مطابقت می‌کند. مطالعه فراساختار *Nicotiana tabacum* در مادگی دگر تلقیح نشان‌دهنده سلول‌های بافت پیرامونی خامه با دیواره نازک بوده که این سلول‌ها دارای سیتوپلاسم فراوان بوده که به تدریج واکوئله می‌شوند (Dickinson و Herrero, Cheung et al., 2000). (۱۹۸۱) وجود وزیکول‌های بزرگتر و دیکتیوزوم‌های کمتر را در سلول‌های سازگار بافت گذر تلقیح شده در مقایسه با بافت گذر جوان (تلقیح نشده) گیاه اطلسی مشاهده کردند. آنها همچنین وجود لوله‌های گرده خالی در این بخش که هنوز شکل مدور خود را در مقطع عرضی حفظ کرده‌اند را در تلقیح سازگار گزارش کردند [۷].

Carraro و همکاران (۱۹۸۶) بیان کردند که سلول‌های احاطه کننده بافت گذر پس از تلقیح سازگار دچار تغییراتی می‌شوند. آنها سلول‌های مدور با فضای خارج سلولی بزرگ و ماتریکس خارج سلولی متراکم را در بخش پیرامونی بافت خامه مشاهده کردند. این سلول‌ها دارای دیواره نازک و هسته مشخص و پلاستیدهای حاوی نشاسته با میتوکندری‌های کوچک و واکوئله‌های کوچک یا یک واکوئله بزرگ مرکزی بودند [۸]. de Nettancourt و همکاران (۱۹۷۳) لوله‌های گرده با مقطع عرضی مدور را در بافت خامه با تلقیح سازگار مشاهده کردند. در ناحیه رأسی، سیتوپلاسم لوله گرده دارای محتویات سلولی با اندازه‌های متفاوت بوده که به نظر می‌رسد شامل ترکیبات دیواره داخلی می‌باشند [۶].

بر اساس نتایج محققین، همزمان با رشد لوله گرده ناسازگار، تغییرات فراساختاری در سلول‌های بافت گذر و سلول‌های پیرامونی خامه خودتلقیح رخ می‌دهد که این تغییرات شامل از دست رفتن اندامک‌های سلولی و عدم تشکیل رسوبات دیواره‌ای در سلول‌های بافت گذر می‌باشد

کردند که در برهم کنش‌های ناسازگار در *Antirrhinum* سیستم یوبی کوتین/پروتئازوم داخل سلولی، که تنظیم کننده میزان پروتئین‌ها در بسیاری از مراحل نمو است، فعال می‌شود و یوبی کوتینی شدن پروتئین‌ها در مادگی ناسازگار افزایش می‌یابد. آنها همچنین عقیده دارند که اختلال در سیستم یوبی کوتین/پروتئازوم منجر به اختلال در برهم کنش‌های خودناسازگار می‌شود [۲۱].

در نتایج این تحقیق، تفاوتی بین الگوی الکتروفورزی خامه‌های خودتلقیح و دگرتلقیح هر دو رقم مشاهده نشد، اما باند پروتئین ۲۷ کیلودالتونی، تنها در رقم خودناسازگار Bravo purple star قابل مشاهده بود، در حالی که رقم خودسازگار Bravo cool water mix فاقد این باند پروتئینی بود. رقم Bravo cool water mix دارای باند پروتئینی دیگری در محدوده ۳۰ کیلودالتون بود. به احتمال، تفاوت در الگوی الکتروفورزی دو رقم به دلیل، وجود دو نوع S-RNase متفاوت در این دو رقم می‌باشد. Kondo و همکاران (۲۰۰۲) نیز الگوی الکتروفورزی رقم‌های خودسازگار و خودناسازگار گونه‌های *Lycopersicon peruvianum* و *L. esculentum* را توسط SDS-PAGE مقایسه کردند. آنها وجود یک باند الکتروفورزی بیشتر در محدوده تقریبی ۳۰ کیلودالتون را در رقم‌های خودناسازگار شناسایی کردند. در حالی که عصاره خامه ژنوتیپ خودسازگار گونه *L. esculentum* و *L. peruvianum* فاقد این باند الکتروفورزی بودند. آنها چنین نتیجه گرفتند که این باند الکتروفورزی مربوط به وجود S-RNase می‌باشد [۲۲].

ترکیبات فنلی و آنزیم PPO: گرده‌افشانی سازگار و ناسازگار منجر به تغییر در وضعیت متابولیکی سلول می‌شوند، این فرایندها نیز ممکن است تحت تاثیر وضعیت متابولیکی سلول قرار گیرند [۹]. وضعیت متابولیکی سلول وابسته به فعالیت آنزیم‌های مختلف از جمله آنزیم‌های آنتی اکسیدان یا تنش می‌باشد. به دلیل این که آنزیم‌های آنتی اکسیدان، واکنش‌های بیوشیمیایی را کنترل می‌کنند و سنتز آنها تحت کنترل ژن‌های خاص می‌باشد، هرگونه تغییر در فعالیت این آنزیم‌ها، نشان‌دهنده تغییر در الگوی بیان ژن و وقایع متابولیکی وابسته به آن است و بنابراین، به عنوان وسیله‌ای برای مطالعه فرایند خودناسازگاری در

پروتئین‌های خامه: مقدار پروتئین کل در خامه خودتلقیح رقم خودناسازگار Bravo purple star در مقایسه با خامه دگر تلقیح همین رقم کاهش یافت. مشاهدات Gray و همکاران (۱۹۹۱) درباره مقدار پروتئین پس از خود و دگرتلقیحی در گیاه *Nicotiana glauca* نتایج حاضر را تأیید می‌کند. آنها بیان کردند که میزان کاهش پروتئین ارتباط مستقیم با میزان لوله گرده ناسازگار وارد شده در بافت خامه و نیز فعالیت S-RNase (پروتئین S درگیر در فرایند خودناسازگاری گامتوفیتی) دارد. آنها همچنین مطالعاتی نیز در شرایط "درشیشه" و در حضور S-RNase روی میزان پروتئین خامه انجام دادند. نتایج آنها نشان داد که فعالیت S-RNase منجر به کاهش مقدار پروتئین در محیط "درشیشه" می‌شوند. این دانشمندان بیان کردند که اثر S-RNase در تیره بادمجان می‌تواند از طریق تاثیر مستقیم بر بیوسنتز پروتئین باشد. آنها گزارش کردند که به احتمال S-RNase می‌تواند از طریق تاثیر بر مولکول‌های درگیر در سیستم ترجمه پروتئین یا انواع RNA این عمل را انجام دهد [۲۰].

به عقیده Gray و همکاران (۱۹۹۱)، تاثیر S-RNase بر mRNA خاص بعید به نظر می‌رسد و بنابراین بین الگوی پروتئینی در خامه‌های حاوی ریبونوکلئاز فعال و غیرفعال تفاوتی وجود ندارد [۲۰]. بنابراین، به احتمال کاهش محتوای پروتئین کل در خامه خودتلقیح رقم Bravo purple star در مقایسه با خامه دگرتلقیح همین رقم، می‌تواند به دلیل وجود تعداد زیادی از لوله‌های گرده خودی و در نتیجه فعالیت زیاد ریبونوکلئاز S در خامه آن باشد که منجر به کاهش محتوای پروتئینی شده است. با توجه به این که محتوای پروتئین خامه خود و دگرتلقیح رقم Bravo cool water mix در مقایسه با پروتئین کل خامه دگرتلقیح رقم Bravo purple star تفاوت معنی داری نشان نداد، به نظر می‌رسد که در محتوای کل پروتئین در خامه دو رقم تفاوتی وجود نداشته و کاهش محتوای پروتئین خامه خودتلقیح رقم Bravo purple star در مقایسه با خامه خود و دگرتلقیح رقم Bravo cool water mix، به دلیل فعالیت بالای ریبونوکلئاز و در نتیجه تاثیر آن بر کاهش میزان پروتئین کل باشد. Qiao و همکاران (۲۰۰۴) بیان

خودسازگار Bravo cool water mix شد. بیشترین تغییرات در خامه خودتلقیح رقم خودناسازگار مشاهده شد. این تغییرات شامل تغییر در مقدار پروتئین کل و فعالیت آنزیم PPO و در نتیجه محتوای ترکیبات فنلی در خامه خودتلقیح بود.

تشکر و قدردانی

مولفین بر خود لازم می‌دانند از زحمات جناب آقای مهندس علی سیفی جهت تهیه بذر و امکان استفاده از فضای مناسب جهت کشت گیاه، سپاسگزاری نمایند.

منابع

1. Hiscock SJ; Genome Biology; 3; 1004.1-1004.6; 2002.
2. Hua ZH, Fields A, Kao TH; Molecular Plant; 1; 575-585; 2008.
3. Huang S, Lee HS, Karunanandaa B, Kao TH; Plant Cell; 6; 1021-1028; 1994.
4. Sanzol J, Rallo P, Herrero M; 90; American Journal of Botany; 78-84; 2003.
5. Johnson MA, Preuss D; Developmental Cell; 2; 273-281; 2002.
6. de Nettancourt D, Devreuk M, Bozzini A; Journal of Cell Science; 12; 403-419; 1973.
7. Herrero M, Dickinson HG; Journal of Cell Science; 47; 365-383; 1981.
8. Carraro L, Lombardo G, Gerola P; Caryologia; 49; 101-112; 1986.
9. Neog B, Singh ID; Journal of the Indian Institute of Science; 84; 47-52; 2004.
10. Holden MJ, Marty JA, Singh-Cundy A; Journal of Plant Physiology; 160; 261-269; 2003.
11. Hiscock SJ, Hoedemaekers K, Friedman WE, Dickinson HG; International Journal of Plant Sciences; 163; 1-16; 2002.
12. Bradford M; Analytical Biochemistry; 72; 248-254; 1976.
13. Kar M, Mishra D; Plant Physiology; 57; 315-319; 1976.

سطح بیوشیمیایی مورد مطالعه قرار می‌گیرد [۹]. گزارش شده است که خودتلقیحی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مادگی شامل پلی فنل اکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز تاثیر می‌گذارد [۹، ۲۳، ۲۴]. فعالیت آنزیم PPO در خامه خودتلقیح رقم خودناسازگار Bravo purple star در مقایسه با خامه دگر تلقیح همین رقم بیشتر بود. Neog و Singh (۲۰۰۴) نیز تاثیر برهم کنش ناسازگار را بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در گیاه *Camellia sinensis* بیان کردند [۹]. آنها بیان کردند که تاثیر این آنزیم بر واکنش‌های خودناسازگار به طور غیرمستقیم بوده و یک عامل تکمیلی می‌باشد که همراه با سایر عوامل از جمله زمینه ژنتیکی گیاه و عوامل محیطی، در تنظیم واکنش‌های خودناسازگار دخالت دارد. این آنزیم قادر به تولید کینون‌ها بوده و با اکسید کردن ترکیبات فنلی و تولید کینون، می‌تواند بر فعالیت سایر آنزیم‌ها تاثیر بگذارد [۹]. به نظر می‌رسد کاهش در میزان ترکیبات فنلی مشاهده شده در خامه خودتلقیح رقم Bravo purple star، به دلیل افزایش در فعالیت این آنزیم پس از شرایط خود تلقیحی بوده، در حالی که در رقم Bravo cool water mix، پس از خود و دگر تلقیحی، تفاوتی در فعالیت این آنزیم مشاهده نشد و بنابراین میزان ترکیبات فنلی خامه این رقم با تغییر نوع گرده‌افشانی، هیچ تغییری نشان نداد. از طرفی با توجه به اهمیت ترکیبات فنلی (از جمله فلاونوئیدها) در رویش و رشد لوله گرده، قطبیت و جریان قطبی اکسین، احتمال دارد که اختلال رشد لوله گرده ناسازگار با کاهش ترکیبات فنلی مرتبط باشد [۲۵، ۲۶].

بر اساس نتایج حاضر به نظر می‌رسد تفاوت اساسی در سیتوشیمی بافت گذر خامه در رقم‌های خود و دگر تلقیح وجود نداشته باشد و به احتمال این بافت در بروز واکنش‌های خودناسازگار نقش فعالی ندارد. فرایند خودتلقیحی منجر به مهار رویش لوله گرده همراه با تغییر در رسوبات کالوزی دیواره و نیز تغییرات فراساختاری در لوله گرده و بافت گذر خامه رقم خودناسازگار Bravo purple star بود. همچنین خودتلقیحی در مقایسه با دگر تلقیحی منجر به بروز تغییرات فیزیولوژیکی نیز در رقم‌های خودناسازگار Bravo purple star و

- Agriculture; 1; 1-5; 1999.
15. Cheung AY, Wu HM, Di Stilio V, Glaven R, Chen C, Wong E, Ogdahl J, Estavillo A; *Annals of Botany*; 85; 29-37; 2000.
16. Williams EG, Knox RB, Rouse JL; *Journal of Cell Science*; 53; 255-277; 1982.
17. Villar M, Gaget M, Said C, Knox RB, Dumas C; *Journal of Cell Science*; 87; 483-490; 1987.
18. Konar RN, Linskens HF; *Biochemical and Life Science*; 71; 356-371; 1966.
19. Geitmann A, Emons AM, Franklin-Tong VE; IOS press; 203-219; 2001.
20. Gray JE, McClure BA, Bonig I, Anderson MA, Clarke AE; *Plant Cell*; 3; 271-283; 1991.
14. Soland SF, Laima SK; *Plant*
21. Qiao H, Wang HY, Zhao L, Zhou JL, Huang J, Zhang YS, Xue YB; *Plant Cell*; 16; 582-595; 2004.
22. Kondo K, Yamamoto M, Matton DP, Sato T, Hirai M, Norioka S, Hattori T, Koyama Y; *Plant Journal*; 29; 627-636; 2002.
23. Tezuka T, Tsuruhara A, Suzuki H, Takahashi SY; *Plant and Cell Physiology*; 38; 107-112; 1997.
24. Tsuruhara A, Tezuka T; *Plant and Cell Physiology*; 42; 1234-1238; 2001.
25. Almaraz-Abarca N, Delgado-Alvarado EA, d Hernández-Vargas V, Ortega-Chávez M, Orea-Lara G, Cifuentes-Díaz de León A, Ávila-Reyes JA, Muñoz-Martínez R; *American Journal of Applied Sciences*; 6; 1076-1085; 2009.
26. Taylor LP, Hepler PK; *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*; 48; 461-91; 1997.

Archive of SID