مجله علوم کشاورزي ايران
جلد ۳۶، شماره ۶، سال ۱۳۸۴ (۱۵۰۸-۱۴۹۹)

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

ناصربوذری [۱]، کاظم ارزانی [۲] و حسن ابراهیم زاده [۳]
۱، دانشجوی دوره دکتری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات۲، دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
۳، استاد دانشکده علوم دانشگاه تهران
تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/۷/۸

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 وتهیه نها ل و بذر کرج انجام گردید . جوانه های گل در فاصله زمانی خرداد تا اسفند ماه در ۸ نوبت جمع آوری وتغییرات پروتئین محلول وآنزیمهای پراکسیداز وپلی 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 مجددا با شروع فصل سرما و قرار گرفتن جوانه های گل درمعرض دما های موثر در شکسته شدن خواب افزایش معنی داری درپروتئین 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.

واژه‌های کلیدی: گیلاس ، نیاز سرما ئی ، مارکرهای مولکولی

مقدمه

مشخص نمودن زمان گل آغازی، شروع دوران رکودو 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 سنتزRNA , DNA و نیتروژن محلول در نقاط رویشی رخ می دهد (۲، ۶، ۱۸). بطور کلی می‌توان گفت که گل آغازی بوسیله عوامل داخلی گیاه که تعادل در جذب وهورمون 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 وتعداد شکوفه های تولیدی را به شدت کاهش می دهد (۱۸) . آبیاری زیاد که باعث طولانی شدن رشد جوانه‌های رویشی می‌شود می‌تواند باعث

مکاتبه کننده: ناصر بوذری
E-mail: bouzari1111@yahoo.com

تاخیر در زمان گل آغازی شود. پایه‌ها جدا از تاثیر آنها بر قدرت رشد می‌توانند زمان باز شدن گل و همچنین تعداد گل و در نتیجه تعداد جوانه‌های انگیزش یافته را تحت تاثیر قرار دهند. مواد شیمیائی تنظیم کننده رشد نیز می‌تواند بر روی گل آغازی موثر باشند (۱۸). گل آغازی در درختان گیلاس پس از شکوفه‌دهی و در اواخر بهار تا اوایل تابستان با تشکیل برآمدگی‌هایی درمریستم انتهایی مشخص می‌گردد (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 می‌گردد (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 رکودو 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 می‌افتد (۱۱، ۱۵) . همچنین فعالیت بعضی از آنزیم ها نظیر آمینو پپتیدازها در بذرهای در حال رکود سیب گزارش شده است (۱۶). فدری و همکاران (۱۹۷۰) نیز مشخص نمودند که مقدار نیتروژن 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 درارتباط با شناسائی گونه‌ها و بررسی مقاومتهاو ... میباشد که دراین راستا استفاده از جایگاه‌های ایزوزیمی در برنامه‌های اصلاحی و مطالعات ژنتیکی‌بسیار مفیدبوده است(۹) .

در حال حاضر یکی از روشهای رایج و کاربردی جهت اندازه‌گیری 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 فراوانی که نیاز دارد، بسیار هزینه بردار و کمی غیر دقیق خواهد بود. در پژوهش حاضر تغییرات پروتئین کل و آنزیم های پر اکسید ازوپلی فنل اکسیداز در فاصله ماههای خرداد تا اسفند در جوانه های گل دو رقم گیلاس به نامهای" فرا سیدا" و "سیاه دانشکده" و دامنه دقیق شروع دوران استراحت و رفع نیاز سرمایی و گل آغازی 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 گیلاس 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 گیلاس آغاز نماید.

مواد و روش‌ها

جوانه‌های گل دو رقم گیلاس 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 اسپورهای 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 زمانهاجهت 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 آغازی و شروع دوران رکود و رفع نیاز سرمایی را در برداشته باشد.

به منظور استخراج پروتئین های محلول از بافر تریس کلریدریک اسید باpH برابر۷ و به نسبت (W/V) ۱:۳ و پلی پیرولیدن ۰/۰۳٪ استفاده شد . همگناهای حاصل به مدت ۴۵ دقیقه و با شتاب ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانترویفوژ گردید. سپس محلول حاصل از پارچه

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 ۵±۳۰ سانتیمتر استفاده گردید . این شاخه ها در اوایل پاییز از درختان جدا و سپس در کیسه های کنفی قرار گرفت و پس از ۵۰۰، ۷۰۰، ۹۰۰ و ۱۱۰۰ ساعت سرما دهی در سردخانه با دمای ۱ ±۵ درجه سانتیگراد جهت رشد جوانه ها به دمای۲±۲۱ در روز و در شب ۲±۱۵ 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.

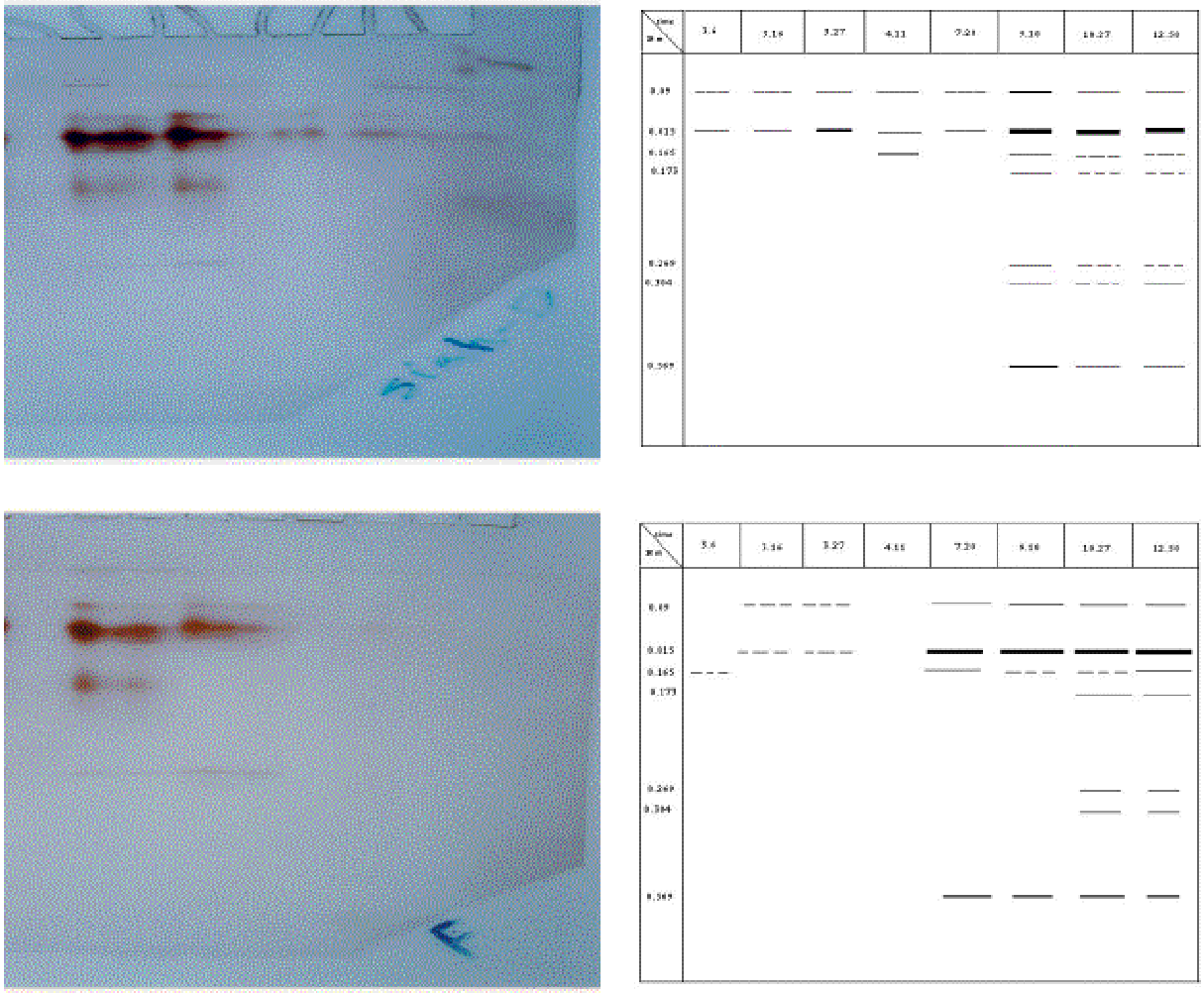
نتایج

مقدار پروتئینهای سیتو پلاسمی جوانه‌های گل طی دوره رویش و پس از آن تغییرات محسوسی در ارقام مورد بررسی می‌نماید بطوریکه از اواخر خرداد همزمان با تمایزیابی طرح‌های اولیه گل میزان آن رو به افزایش و پس از رسیدن به یک بیشینه مجدداً در اواخر تابستان با شروع دوره رکود کاهش می‌یابد. در فاصله زمانی شروع دوران رکود و کاهش دما و آغاز رفع نیاز سرمایی در ماه‌های شهریور تا آبان مقدار پروتئین محلول در جوانه‌های گل تغییر محسوسی نشان نمی‌دهد و پس از آن مجدداً یک افزایش تدریجی در میزان آن مشاهده می‌شود (شکل‌های ۵ و۷).

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نیز مشخص نمود که بین سطوح مختلف زمان و رقم از لحاظ مقدار پروتئین در سطحی کمتر از ۰/۰۰۰۱ 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 .

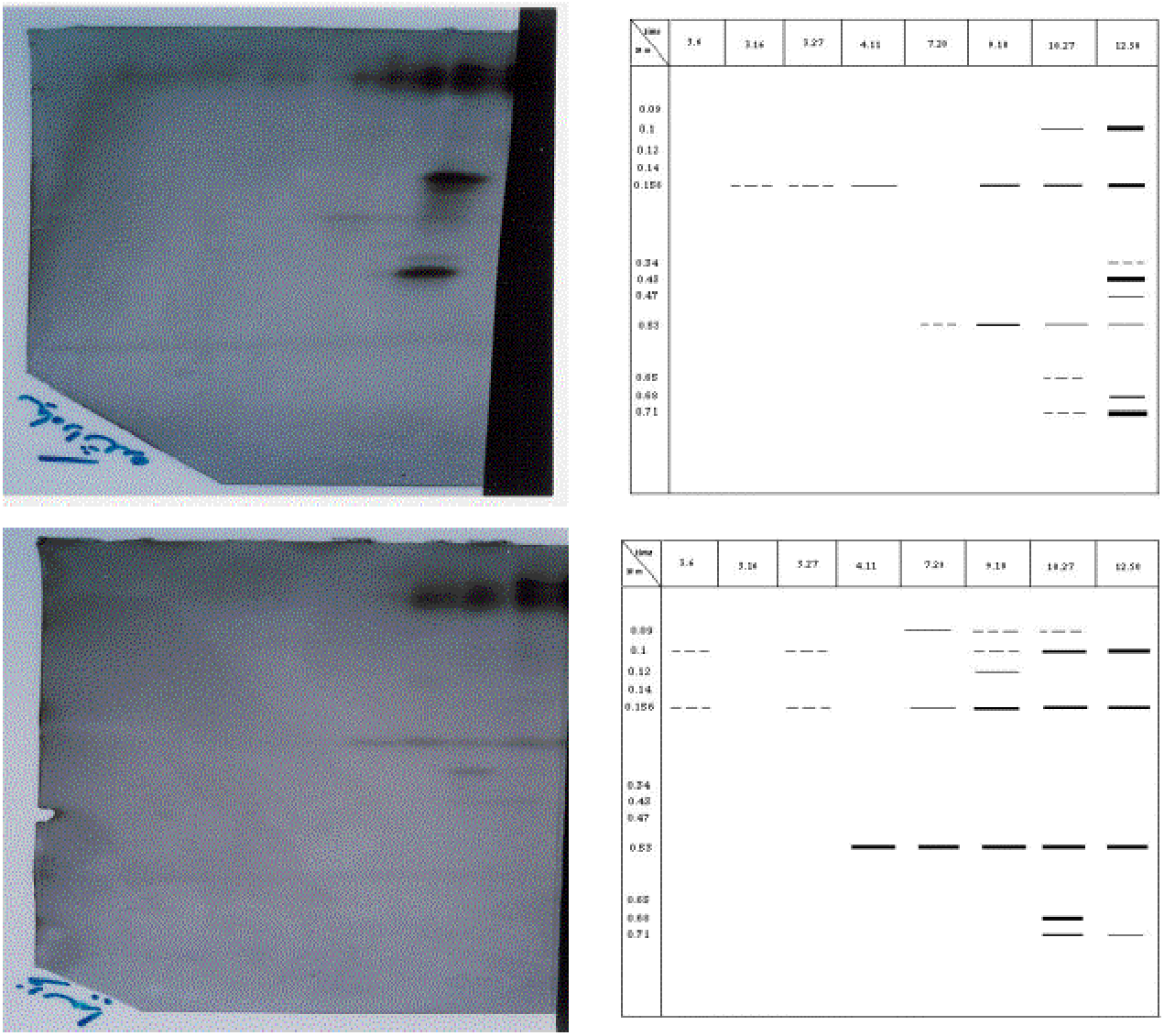
از طرفی نتایج حاصل از مقایسه میانگین ها به روش S.N.K نیز مشخص نمود که بیشترین میزان پروتئین مربوط به اواخر خرداد و اوایل ماه مرداد و کمترین میزان آن نیز مربوط به اوایل و اواسط خرداد و اسفند ماه می باشد. بررسی الگوهای باندی تولید شده در پراکسیداز در ارقام مورد بررسی نشان دهنده دو جایگاه فعال در این آنزیم می باشدکه 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 هتروزایگوت بودن جایگاه ژن با سه زیر واحد می باشد. ایزوزیمهای با فعالیت ۰/۱۶و ۰/۱۵ در این جایگاه فرم های هتروتریمری 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 هموتریمری 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 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 فعالیتی 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) وسوم (Pox3) نامگذاری گردید. باندهای مشاهده شده در جایگاه اول به دلیل هتروزایگوت بودن ژنهای



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

تشکیل دهنده آنها در نواحی مختلفی در سطح ژل مشاهده گردید بطوری که مجموعا 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 همو تریمری 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 احتمالا میتوان نتیجه گیری نمود که تعداد زیر واحد های آنزیمی تشکیل دهنده این جایگاه چهار تا میباشد که خود را به صورت یک نوار هموتترامری در حرکت ۳۴/ . و سه نوار هتروتترامری ۴۳/ .و ۴۷/ .و ۵۳/ . نشان می دهند.باندهای با حرکت نسبی برابر با ۵۳/ . تقریبا در هر دو رقم بیان شده در صورتیکه سایر آلوزیمها تنها در رقم " سیاه دانشکده "و آن هم در اسفند ماه قابل مشاهده می باشند (شکل ۳و ۴) . درجایگاه سوم (Pox3) این آنزیم نیز آلوزیم هموتترامری در حرکت نسبی ۱۵۶/ .تقریبا در هر دو رقم خصوصا در ماههای آذر تا اسفند بیان شده است .در رقم" سیاه دانشکده" این نوار از اواسط خرداد ماه به شکل نسبتا ضعیفی تا تیر ماه قابل مشاهده بود وپس ازآن در مهر ماه از میزان فعالیت آن به شدت کاهش یافته بگونه ای که درسطح ژل هیچگونه باندی قابل مشاهده نبود ومجددا دراواخر پاییز (۱۳۷۹/۹/۱۰)با ظهور یک نوار نسبتا پهن دارای فعالیت بیشینه ای میگردد.در رقم" فراسیدا " نیز باندهای نسبتا ضعیف از اوایل خرداد ماه مشاهده ودرپاییز با ظهور نوارهای پهن تا اواخر دوران زمستان به فعالیت خود



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

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

مدل یابي

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

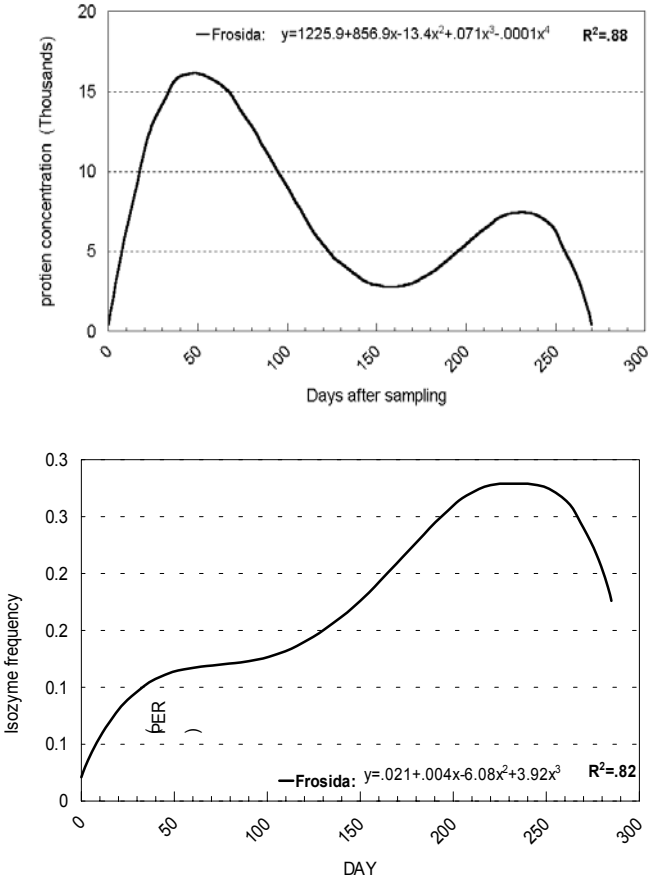
نتایج حاصل از بررسي مدل پروتئین و آنزیمهاي پراکسیداز وپلي فنل اکسیداز در رقم فراسیدا

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 وپس از آن بتدریج از غلظت آن کاهش ودر۱۵۸ روز پس از نمونه گیری یعنی در اوایل آبان ماه به حداقل میزان خود درطول دوره رشد ونمو خواهد رسید. تغییرات پروتئین پس از این مرحله دارای یک روند افزایشی بوده بگونه ای که با افزایش ساعتهای سرمایی بر

میزان آن بتدریج افزوده و۲۳۲ روز پس از نمونه گیری به سیکل ثانویه نقطه افزایشی خود خواهد رسید .حداکثر غلظت پروتئین در سیکل اولیه وثانویه افزایشی به ترتیب درمقادیر ۱۶۱۵۱/۷تا ۱۵۶۵۴/۲ و۷۳۹۷/۲ تا۷۲۴۴/۳میکروگرم در میکرولیتر معنی دار نگردیده ،بنابراین دامنه بنیان گذاری اندامهای گل در این رقم در ۴۰تا ۵۰ روز پس از نمونه گیری یعنی در نیمه دوم تیر ماه وپایان 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 جوانه‌های 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

$y=.\ /۰۲۱+۰/۰۰۴x-۶/۰۷۹۰x^2+۳/۹۲\ x^3$ باضریب تعیین ۸۲/ .گردید.براساس این مدل روند تغییرات آنزیم تا ۴۵ روز پس از نمونه گیری دارای یک افزایش تدریجی بوده وسپس با یک شیب ملایم در۲۳۸ 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 ونمو 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 $y=.\ /۰۶۳-.\ /\ ۰۰۱۷x+.\ /۰۰۰۰۲۷x^2$ با ضریب تعیین معنی دار شده گردید ($R^2=.\ /۸۴$). دراین 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 جشمگیری 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(۷۰۰ساعت سرمای موثر) بیش از ۷۰ درصد از جوانه های گل باز شده و نیاز سرمایی این رقم بطور کامل برطرف گردیده است .افزایش ساعتهای سرمایی پس از این مرحله تاثیری بر رفع نیاز سرمایی رقم نداشته بلکه تنها باعث افزایش سرعت باز شدن جوانه های گل تحت شرایط دماهای رشد شده است .

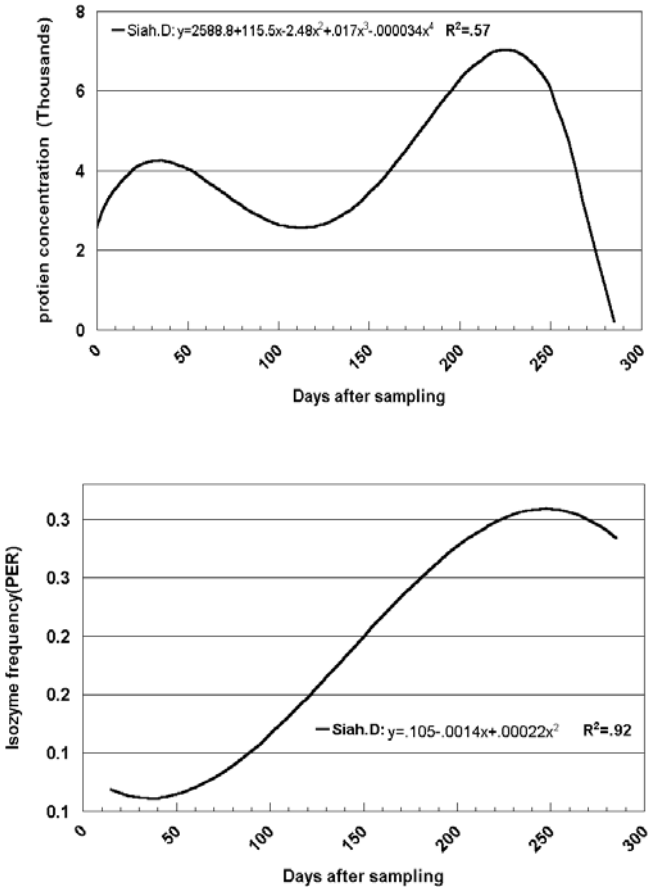


شکل ۵ و ۶- مدل و نمودار تغییرات پروتئین (بالا) و آنزیم پراکسیداز (پایین) در رقم فراسیدا نسبت به زمان

نتایج حاصل از بررسي مدل پروتئين و آنزيمهاي پراكسيداز وپلي فنل اكسيداز در رقم سياه دانشكده

براساس مدل بدست آمده مشخص گردید که روند تغییرات پروتئین در طول دوره رشد ونمو 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 شدوپس از آن غلظت پروتئین بتدریج کاهش یافته ودر شروع دوران رکود وآغاز رکود عمیق یعنی در ۱۱۳ روز پس از نمونه‌گیری به حداقل میزان خود در. طول فصل می‌رسد.

تغییرات پروتئین پس از این تاریخ جالب توجه می‌باشد زیرا علیرغم حرکت گیاه بسوی دوران رکود بر میزان غلظت آن بتدریج افزوده می گردد بطوریکه مجدداً در ۲۳۲ روز پس از نمونه گیری یعنی در اواخر دی ماه به حداکثر میزان خود رسیده وبیشینه دوم تشکیل می شود . نقطه بیشینه اولیه وثانویه و حداقل تغییرات پروتئین در دامنه غلظتهای ۴۲۴۲/۲و ۲۴۱۴/۵ و ۳۳۰۷/۵ و ۵۹۶۶/۱۰ و ۲۲۶۲/۷ و ۶۱۶۲ میکروگرم در میکرولیتر معنی دار تلقی نگردیده، بنابراین با توجه به اینکه در مسائل نیاز سرمایی و رکود و گل آغازی نمی توان یک نقطه را به عنوان شروع دوره معرفی نمود می توان با توجه به مدل تعیین شده دامنه گل آغازی وشروع دوران رکود عمیق ورفع نیاز سرمایی را به ترتیب ۴۰تا۳۰ و۱۰۵تا ۱۲۰و ۲۲۵تا۲۴۰ روز پس از نمونه گیری اعلام نمود(شکل ۷ و۸). بررسی تغییرات آنزیم پراکسیداز در طول زمان منجر به ارائه یک مدل درجه دوم با ضریب تعیین۹۲ درصد گردید. براساس مدل حاصله این آنزیم ۱۵، ۴۵روز پس از نمونه گیری دارای فعالیت معنی داری نبوده وپس از آن همزمان با شروع تشکیل بنیان گذاری گل فعالیت خود را بتدریج آغاز وپس از۲۴۹ روز پس از نمونه گیری یعنی در اواخر بهمن ماه به حداکثر میزان خود می رسد . بنابراین، با توجه به مدل ارائه شده وتغییرات یکنواخت این آنزیم در فاصله زمانی ۲۴۰ تا ۲۵۵ روز پس از نمونه گیری میتوان دامنه رفع نیاز سرمایی در این رقم را در دهه اول تا دهه سوم بهمن ماه عنوان نمود (شکل۸). آنزیم پلی فنل اکسیداز نیز به طور کلی دراین رقم همزمان با بنیان گذاری 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(شکل۹).نتایج حاصل از بررسی نیاز سرمایی قلمه های شاخه تحت شرایط کنترل شده نیز مشخص نمود که با افزایش ساعتهای سرمایی بر میزان باز شدن ۵۰ درصد از جوانه های گل تحت شرایط فورسینگ افزوده می گردد. 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 جوانه های گل تحت شرایط دماهای رشد به بالاتر از ۵۰٪ رسیده و درنتیجه ساعتهای سرمایی درآنها 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

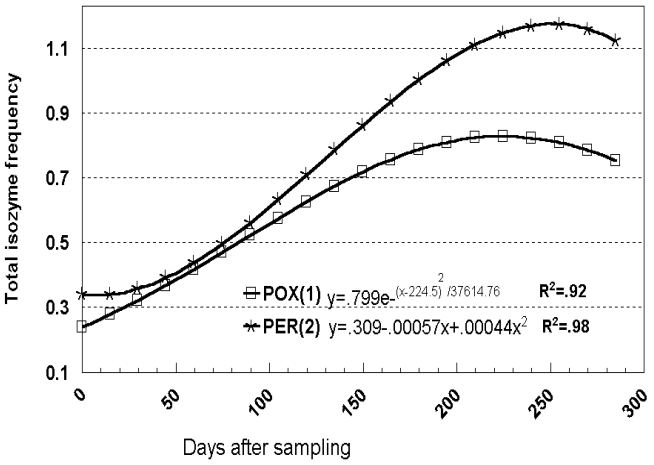
بررسی پروتئین های محلول در جوانه گل گیلاس تغییرات معنی داری را در طی مراحل نموی نشان داد. پروتئین کل در فاصله ماههای خرداد تا مرداد به طرز قابل توجهی افزایش می یابد این افزایش در ارقام مورد بررسی متفاوت بود بگونه ای که مقدار آن از سه تا هفت برابر متغیر بوده و حداکثر در رقم زود گلده و زود رس فراسیدا مشاهده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

مشاهده شده در شروع سنتزپروتئین در ارقام مورد مطالعه می‌تواند نشان دهنده اختلاف در شروع بیوسنتز پروتئینهای آنزیمی و غیر آنزیمی لازم جهت رشد و نمو جوانه ورسیدن به بیشینه آن ناشی از فعال شدن متفاوت ژن های مسئول در این فرایند باشد بگونه ای که دررقم" فرا سیدا " شروع افزایش سنتز این پروتئینها در دهه اول خرداد ودر 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 نموی 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 دورهٔ 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 انتهائی 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 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 پلی‌فنل 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 کیلودانتونی را در ارقام *P.serruata Lindl.cv.Kwanzan* و *P.avium L cv Coeurde 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 " ۱۵۸روزو در رقم "سیاه دنشکده "۱۱۳روز 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 می‌باشد (۱۱) مشخص می نماید که خروج گیاه از رکود به شکل تدریجی صورت خواهد گرفت و این خروج با افزایش

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 نموی 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). کمرر 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 ایزوزیم 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 درجه‌دوم باضریب تعیین بسیار بالا گشت بطوریکه در تمام ارقام مورد بررسی ارتباط نزدیکی بین فعالیت این آنزیم و دوره‌های 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 پریودهای 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 ایزوزیمهای پراکسیدازی به حداکثر میزان خود رسید در حالیکه در رقم تقریبا دیر گلده و دیر رس "سیاه دانشکده" فراوانی این آنزیم۲۴۹ روز پس از نمونه گیری به حداکثر میزان خود رسید .از طرفی نتایج حاصل از بررسیهای تیمارهای سرمایی قلمه های شاخه به طرز بسیار جالب توجه ای نتایج فعالیت این آنزیم را مورد تائید قرار داد بگونه ای که در این بررسی مشخص گردید که رقم "سیاه دانشکده دارای نیاز سرمایی بالای بوده و تیمارهای ۷۰۰ ساعت سرمایی نیزجهت رفع نیازسرمای 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 آنزیمهائی می باشند 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 وبه 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 نموی معینی مانند ورود به مرحله آغازش گل باشد (۲). فعالیت این آنزیم در طی مراحل مختلف نموی 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 (شکل۹).

سپاسگزاری

بدینوسیله از سرکارخانمها دکتر ابریشم چی و دکترصبورا و دکتر میقانی وآقایان دکتر رهنما و دکتر میر معصومی به خاطر مساعدت در امور آزمایشگاهی وآقای مهندس غفاری به دلیل راهنمائی در مسائل آماری وهمچنین از مسئولین باغ تحقیقاتی موسسه اصلاح وتهیه نها ل و بذر کرج تشکر می شود .

منابع مورد استفاده

REFERENCES

۱.ابراهیم زاده ، ح.، پ. ابریشم چی و ع. صبورا . ۱۳۷۷ . بررسی تغییرات اونتوژنتیکی زعفران مزروعی (*Crocus sativus* L.)از طریق مطالعه پروتئینهای محلول بنه و جوانه. نهال و بذر جلد (۲)۳۶:۱۴-۲۸

۲. ابریشم چی ، پ .۱۳۷۹. بررسی متابولیسم تشکیل گل در گیاه زعفران مزروعی. رساله دکترای تخصصی ، فیزیولوژی گیاهی. دانشکده علوم. دانشگاه تهران.

۳.صالحی شانجانی، پ. ۱۳۷۵ .کشت بافت و بررسی اثر عوامل محیطی بر متابولیسم فراورده های ثانوی و تغییرات کمّی 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, NewYork, 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 .