

بررسی اثر تیمار تیدیازورون بر روی خصوصیات ملکولی پس از برداشت گل‌های شاخه بریده رز رقم "اسپارکل"

امید رسولی¹، نوراله احمدی^{2*}، مهرداد بهمنش³

1-دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم باغبانی، 2- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

3- دانشیار گروه ژنتیک، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

* نویسنده مسئول: ahmadin@modares.ac.ir

چکیده

در این آزمایش برای افزایش طول عمر گل‌های بریده رز رقم "اسپارکل"، $75 \mu\text{M}$ تیدیازورون استفاده شد. استفاده از این تیمار به صورت پالس 24 ساعت، باعث افزایش طول عمر گل‌های بریده به نسبت گروه شاهد شدند. تیمار $75 \mu\text{M}$ تیدیازورون در آزمایش، 2/8 روز نسبت به تیمار شاهد، عمر گل‌های بریده را افزایش دادند. علاوه بر بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی، آزمایشات ملکولی نیز در رابطه با بیان کمی ژن‌های مسیر بیوسنتز اتیلن، آکواپورین‌ها و لککیز (به ترتیب *Rh-TIP*، *Rh-ASC4* و *Rh-LAC*) درگیر در مسیر پیری گل‌های رز در اندام برگ مربوط به تیمار $75 \mu\text{M}$ تیدیازورون و شاهد، انجام داده شد. تیمار تیدیازورون باعث کاهش بیان ژن *Rh-ACS4* نسبت به گروه شاهد شد و در حالی که بیان ژن لککیز در اثر همین تیمار به میزان ناچیزی افزایش یافت. این طور استنباط می‌گردد که این افزایش بیان ژن *Rh-LAC* در رقم "اسپارکل" احتمالاً ناشی از پاسخ موقتی به شرایط استرس‌زای تیمار تیدیازورون باشد. بهرحال این اولین آزمایش در این زمینه می‌باشد و تحقیقات بیشتری را در این خصوص می‌طلبد.

کلمات کلیدی: گل رز، اتیلن، جذب محلول، لککیز اکواپورین.

مقدمه

گل رز با نام علمی *Rosa hybrid L.* متعلق به خانواده رزاسه¹ می‌باشد. عمر پس از برداشت این گل در اثر ظهور علائم پیری زودرس کوتاه می‌باشد. هورمون اتیلن تسریع کننده تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مرتبط با پیری می‌باشد [1، 2]. جنس‌های مختلف گیاهان به اتیلن حساسیت متفاوتی دارند به طوری که گل رز، گاز اتیلن کمی تولید می‌کند اما به آن حساسیت زیادی نشان می‌دهد [3].

سایتوکینین‌ها، گروهی از هورمون‌های موثر در کند ساختن رخداد پیری می‌باشند. اثر این ماده بر پیری به طور غیر مستقیم می‌باشد. پیشنهاد شده که سایتوکینین‌ها فرآیندهای مخرب تولید اتیلنی در دوره پس از برداشت در اندام‌ها را به تاخیر می‌اندازند [4، 5]. تیدیازورون (Thidiazuron) از ترکیبات قوی سایتوکینینی فنیل اوره‌ای است (N-phenyl-N-۱,۲,۳-thiadiazol-5-ylurea) که دارای خاصیت تنظیم‌کنندگی می‌باشد [6]. این ماده ترکیبات خیلی فعال و قوی هستند که اثرشان 50 تا 100 برابر سایتوکینین‌های معمولی می‌باشد [7]. استفاده از تیمار پالسی 24 ساعت تیدیازورون با غلظت‌های $20 \mu\text{M}$ ، 60 و 100 بر روی هفت کلتیوار رز شاخه بریده، تاثیر مثبتی گذاشته است به طوری که ماندگاری رقم First Red نسبت به بقیه 2 روز افزایش یافت [8]. مشاهده شده است که استفاده از $2 \mu\text{M}$ تا $10 \mu\text{M}$ تیدیازورون، در تیمار گل‌های آلسترومریا، لیلیوم، لاله، لوپن، فلوکس و گلدانی‌ها (مانند شمعدانی، فرزیا و بنت القنسل) به طور موثری زردی برگ‌ها را به تاخیر می‌اندازد [9، 10]. استفاده از تیدیازورون در این رقم‌ها، باعث ظاهر شدن شاخه‌های جانبی بعد از تیمار شد [8، 10]. همچنین گزارش شده است که کاربرد تیدیازورون روی قلمه‌های بریده

¹ Rosaceae

شمعدانی تولید اتیلن را بالا می‌برند و این طور پیشنهاد دادند که افزایش تولید اتیلن شاید به خاطر القای یک ژن ناشناخته ACS^1 به وسیله این تیمار باشد [11].

جذب آب یکی از فاکتورهای مهم در افزایش ماندگاری گل‌های بریده می‌باشد [12]. آکواپورین‌ها (کانال‌های بیولوژیکی پروتئینی) در عرض غشای سلولی گلبرگ‌ها، نقش مهمی در تبادل آب بین سلولی دارند که دارای انواع مختلفی می‌باشند. در گل‌های شاخه بریده اغلب بررسی‌های ملکولی بر روی آکواپورین‌های نوع TIP^2 و PIP^3 می‌باشد. بیان ژن‌های مربوط به این پروتئین‌ها، تحت تاثیر هورمون‌ها و استرس‌های غیر زنده می‌باشد. در گل‌های شاخه بریده رز که حساس به اتیلن هستند در صورتی که اتیلن داخلی افزایش یابد و یا کاهش آب (استرس کم آبی) در اندام‌ها صورت گیرد، بیان این ژن‌ها دچار نقص می‌شوند و تبادل آبی لازم جهت باز شدن گلبرگ‌ها و آماس سلولی به وجود نمی‌آید [13، 14].

برای اولین بار احمدی و همکاران⁴ [15] توالی مربوط به ژن لککیز تحت تیمار اتیلن را شناسایی کردند. مطالعات آنها مشخص کرد که، بیان این ژن در رزه‌های مینیاتور حساس به اتیلن بیشتر از ارقام غیر حساس می‌باشد. چنین گزارش شده است که بیان این ژن در فرآیند ریزش و تسریع ظهور اثر پیری موثر می‌باشد [16].

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی به صورت تجاری از بازار گل تهیه گردید و به آزمایشگاه پس از برداشت تحت شرایط دمای $20 \pm 1^\circ C$ ، شدت نور ($15 \mu mol m^{-2} s^{-1}$)، رطوبت نسبی 60-70% با سیکل نوری 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی، منتقل گردید.

تهیه محلول تیدیاورون و نحوه تیمار گیاهی

برای تهیه محلول تیدیاورون از حلال KOH 1M استفاده شد. از اسید کلریدریک، برای خنثی نمودن اثر قلیایی حلال و رساندن به $pH = 5/8$ استفاده گردید و در نهایت با استفاده از آب مقطر، به حجم نهایی رسیده شد. از تیدیاورون با استفاده از حلال اشاره شده، غلظت $75 \mu M$ تهیه شد. تیمار به صورت پالس 24 ساعت بر روی گل‌های رز شاخه بریده کلتیوار اسپارکل انجام گردید سپس به بطری‌های شیشه‌ای حاوی محلول نگه‌دارنده $150 mg l^{-1}$ ، 8- هیدروکسی کوئینولین سترات و 3% سوکروز انتقال داده شدند.

بررسی بیان ژن‌های درگیر در فرآیند پیری در بافت‌های برگ گل بریده رز

برای استخراج RNA از 70 mg بافت برگ گل رز، از کیت [Invitex Co.] Invisorb® Spin Plan tRNA Mini Kit استفاده شد. به منظور حذف DNA احتمالی در نمونه‌های استخراج شده، با استفاده از آنزیم DNaseI تیمار حذف DNA ژنومی انجام شد. پس از سنتز cDNA و تعیین کمیت و کیفیت آن از روش اسپکتوفوتومتری و ژل آگارز، بررسی کمی بیان ژن‌ها با استفاده از پرایمرهای پیشرو و معکوس در دستگاه Real-time مدل Rotor Gene 3000 (Corbett Life Science Co.) در 40 چرخه انجام شد [16].

نتایج

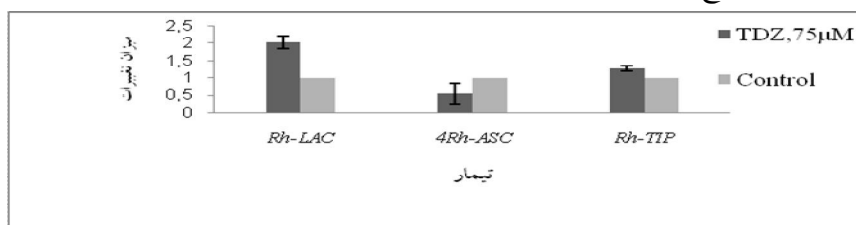
تاثیر غلظت $75 \mu M$ تیدیاورون به نسبت گروه شاهد بر بیان ژن‌های درگیر در سنتز اتیلن $Rh-ACS4$ ، فعالیت آکواپورین‌های نوع $Rh-TIP$ و ژن $Rh-LAC$ درگیر در پیری و ریزش اندام‌های رز

¹ 1- Amino cyclopropane -1-carboxylate synthesis

² Tonoplast intrinsic protine

³ Plasma intrinsic protine

در این مطالعه به منظور درک بهتر تاثیر هورمون‌های تیدیاورون، علاوه بر مطالعه اثرات فیزیولوژیکی، به بررسی بیان ژن‌های درگیر در مسیر تولید اتیلن، فرآیند پیری و ریزش اندام‌ها پرداخته شد. نتایج بررسی کمی بیان ژن *Rh-ACS4* در تیمار $75 \mu\text{M}$ تیدیاورون نشان داد که بیان ژن در این تیمار نسبت به گروه شاهد، کاهش یافت. اما بررسی کمی بیان ژن در رابطه با تیمار تیدیاورون نسبت به گروه شاهد با آزمون LSD در سطح 5% هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. مطالعه بیان ژن *Rh-TIP* تحت تاثیر تیدیاورون نشان داد که این تیمار به نسبت گروه شاهد، اثر افزایشی بر بیان این ژن داشته است. اما آنالیز داده‌ها از طریق آزمون LSD نشان داد که تغییرات بیان ژن در تیمار $75 \mu\text{M}$ تیدیاورون در مقایسه با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری در سطح 1% داشت. بیان ژن *Rh-LAC* در بررسی‌های کمی بافت برگ نشان داد که تیمار تیدیاورون $75 \mu\text{M}$ باعث افزایش بیان این ژن می‌شود. چنانچه این تغییرات در سطح 1% دارای اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت.



نمودار 1. بررسی کمی بیان ژن‌های *Rh-ACS4*، *Rh-TIP* و *Rh-LAC* تحت تاثیر تیدیاورون در اندام برگ رقم اسپارکل

بحث

افزایش ماندگاری پس از برداشت گیاهان زینتی یکی از اهداف مهم در صنعت تولید گل‌های شاخه‌بریده می‌باشد. پیشنهاد شده است که سایتوکینین‌ها، به طور غیر مستقیم بر رخداد پیری تأثیر می‌گذارند [3]. این آزمایش به منظور بررسی اثر ترکیب سایتوکینین، تیدیاورون، بر خصوصیات پس از برداشت گل بریده رقم اسپارکل انجام پذیرفت. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که غلظت $75 \mu\text{M}$ تیدیاورون، اثر با اختلاف معنی‌داری بر کیفیت گل بریده گذاشتند و غلظت $75 \mu\text{M}$ این ماده در آزمایش، 2/8 روز به نسبت گروه شاهد، عمر گل‌های بریده را افزایش دادند اما غلظت $75 \mu\text{M}$ تیدیاورون تولید اتیلن را خیلی کاهش داد (داده‌های منتشر نشده). شواهد دلالت بر این دارد که تیدیاورون از طریق کاهش تولید اتیلن و افزایش کیفیت پس از برداشت باعث افزایش ماندگاری گل‌های بریده تحت تیمار می‌شود. *ACS*ها توسط چندین ژن کد می‌شوند که نقش مهمی در تولید اتیلن به عهده دارند [17]. اغلب تیمارهای پس از برداشتی به منظور تاخیر در فرآیند پیری از طریق مانع از تولید و عمل اتیلن انجام می‌شود [18]. در این آزمایش استفاده از تیمار $75 \mu\text{M}$ تیدیاورون به نسبت گروه شاهد، باعث کاهش بیان ژن *Rh-ACS4* شد. نتایج به دست آمده از مطالعات ملکولی تقویت کننده یافته‌های مربوط به تولید اتیلن در بخش فیزیولوژیکی می‌باشد. نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر با آزمایشاتی که بر روی شمعدانی انجام شد همخوانی ندارد. زیرا گزارش شده که تیدیاورون باعث افزایش بیان این ژن می‌شود ولی این تیمار، حساسیت قلمه‌های شمعدانی را به اتیلن کاهش می‌دهد [11]. بهر حال تأثیر مثبتی که تیمار تیدیاورون در این آزمایش به جایی گذاشته است می‌تواند به کاهش تولید اتیلن و یا کاهش میزان حساسیت بافت‌ها و اندام‌ها به اتیلن باشد.

گزارشات کمی در رابطه با اثر هورمون‌ها بر بیان ژن‌های *Rh-LAC* و *Rh-TIP* آمده است. پیشنهاد شده است که هورمون‌ها و استرس‌های غیر زنده بر بیان این دو ژن اثر گذار هستند [13، 16]. بیان ژن *Rh-TIP* در اثر کمبود آب و تیمار اتیلن در گلبرگ‌های گل رز، کاهش یافت [14]. در حالیکه بیان ژن *Rh-LAC* به وسیله تیمار اتیلن در گل‌های رز مینیا تور، افزایش یافته است [16]. اما در تحقیق حاضر تیمار تیدیاورون باعث افزایش بیان هر دو ژن شده است. مطالعات قبلی نشان داد که این رقم حساسیت کمی نسبت

به اتیلن دارد و افزایش بیان این ژن‌ها ممکن است مرتبط با عکس‌العمل خفیف شاخه‌های بریده به تیمار تیديازورون به‌عنوان یک عامل استرس‌زای زودگذر مرتبط باشد.

بهر حال این اولین آزمایش استفاده از تیمار تیديازورون بر روی بیان ژن‌های لککیز و آکوپورین می‌باشد و نیاز به تحقیقات جامع‌تر در این زمینه می‌باشد.

منابع

- 1- Shahri, W. and Tahir, I. ۲۰۱۱. Flower Senescence-Strategies and Some Associated Events. *The Botanical Review*, ۷۷: ۱۵۲-۱۸۴.
- ۲- Mcglasson, W.B., Poovaiah, B. and Dostal, H.C. ۱۹۷۵. Ethylene production and respiration in aging leaf segments and in disks of fruit tissue of normal and mutant tomatoes. *Plant physiology*, ۵۶: ۵۴۷-۵۵۲.
- ۳- van Doorn, W. G. ۲۰۰۱. Categories of petal senescence and abscission: a re-evaluation. *Annals of Botany* ۸۷: ۴۴۷-۴۵۶.
- ۴- Gapper, N.E., Coupe, S.A., Mckenzie, M.J., Sinclair, B.K., Lill, R.E. and Jameson, P.E. ۲۰۰۵. Regulation of harvest-induced senescence in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) by cytokinin, ethylene, and sucrose. *Journal of Plant Growth Regulation*, ۲۴: ۱۵۳-۱۶۵.
- ۵- Borochoy, A. and Woodson, W.R. ۱۹۸۹. Physiology and biochemistry of flower petal senescence. *Horticultural reviews*: ۱۵-۴۳.
- ۶- Preece, J.E., Huetteman, C.A., Ashby, W.C. and Roth, P.L. ۱۹۹۱. Micro- and cutting propagation of silver maple. I. Results with adult and juvenile propagules. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, ۱۱۶: ۱۴۲-۱۴۸.
- ۷- Genkov, T.A.II. ۱۹۹۵. Effect of cytokinin-active ives on shoot multiplication peroxidase and superoxide dismutase activities of in vitro cultured carnation. *Growth Regu* ۴۳:۵۴۳-۵۵۰.
- ۸- Chamani, E., Irving, D., Joyce, D.C. and Arshad, M. ۲۰۰۶. Studies with thidiazuron on the vase life of cut rose flowers. *The society for advancement of Horticulture*, ۸: ۴۲-۴۴.
- ۱۰- Macnish Aj, J.C., Reida Ms ۲۰۱۰. Treatment with thidiazuron improves opening and vase life of iris flowers. *Postharvest Biol Technol.*, ۵۶: ۷۷-۸۴.
- ۱۱- Mutui, T.M., Mibus, H. and Serek, M. ۲۰۰۵. Effects of thidiazuron, ethylene, abscisic acid and dark storage on leaf yellowing and rooting of Pelargonium cuttings. *Journal of horticultural science & biotechnology*, ۸۰: ۵۴۳-۵۵۰.
- ۱۲- Halevy, A.H. and Mayak, S. ۱۹۸۱. Senescence and postharvest physiology of cut flowers—Part ۲. *Horticultural reviews*: ۵۹-۱۴۳.
- ۱۳- Li, Y., Wu, Z., Ma, N. and Gao, J. ۲۰۰۹. Regulation of the rose Rh-PIP۲; ۱ promoter by hormones and abiotic stresses in Arabidopsis. *Plant Cell Reports*, ۲۸: ۱۸۵-۱۹۶.
- ۱۴- Xue, J., Yang, F. and Gao, J. ۲۰۰۹. Isolation of Rh-TIP۱; ۱, an aquaporin gene and its expression in rose flowers in response to ethylene and water deficit. *Postharvest biology and technology*, ۵۱: ۴۰۷-۴۱۳.
- ۱۵- Ahmadi, N., Mibus, H. and Serek M. ۲۰۰۸. Isolation of Ethylene-induce putative Nuclueotide Laccase in Miniature Roses (*Rosa hybrida*) *Plant Growth Regul*. ۲۷:۲۲۰-۲۳۳.
- ۱۶- Ahmadi, N., Mibus, H. and Serek, M. ۲۰۰۹. haracterization of ethylene-induced organ abscissionin F۱ breeding line miniature roses (*Rosa hybrida*) *Postharvest Biology and Technology* ۵۲:۲۶۰-۲۶۶.
- ۱۷- Wang T-W, Arteca RN. ۱۹۹۵. Identification and characterization of cDNA encoding ethylene biosynthesis enzymes from Pelargonium hortorum cv snow mass leaves. *Plant Physiol* ۱۰۹:۶۲۷-۶۳۶
- ۱۸- Abeles, F.B., Morgan, P.W., Saltveit Jr., M.E., ۱۹۹۲. Ethylene in Plant Biology, ۲nd ed. Academic Press, New York.

Effects of TDZ treatment on molecular characteristics of cut Roses (*Rosa hybrid* L.) cv. 'Sparkle' O. Rasouli^۱, N. Ahmadi^{۱*} and M. Behmanesh^۱

^۱ Horticultural Sciences Department, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

^۲ Department of Genetics, School of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

* Corresponding author

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of thidiazuron (TDZ) at molecular level on postharvest characteristics of cut rose cv. 'Sparkle'. TDZ at ۷۵ μM and concentrations was applied in vase solution for ۲۴ h as pulsing treatment. TDZ at ۷۵ μM increased the longevity of treated flowers ۲.۸ days compared to control. Expression pattern of genes involved in ethylene biosyntheses pathway (*RhACS*), Aquaporin (*RhTIP*) and Laccase (*RhLAC*) were investigated in leaf samples of control and ۷۵ μM TDZ treated. The result showed TDZ

suppressed the expression of *RhACS* gene while it slightly increased the expression of *RhLAC*. It is concluded from these results that cv. “Sparkle” has a low sensitivity to ethylene. The slight increase in the expression of *RhLAC* gene could be related to stress condition induced in cut stems in response to TDZ treatment. However, this is first study in this area and further study is required.

Keywords: Rose, Ethylene, Solution uptake, Aquaporin and Laccase.