بررسی تغییرات هیستولوژیکی و متابولیکی در طی بهاره سازی پیاز سوسن چلچراغ

فاطمه اباذری فرد[۱]، روح انگیز نادری[۲]، سید نجم الدین مرتضوی[*۳]، سپیده کلاته جاری[۱]

[۱] گروه علوم باغبانی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

[۲] گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

[۳] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

[*] نویسنده مسئول: *mortazavi46@gmail.com*

چکیده

سوسن چلچراغ یکی از گونه‌های نادر بومی و در حال انقراض ایران است که دارای پتانسیل بالایی جهت معرفی و عرضه به بازارهای گل ایران و جهان می‌باشد و جهت رشد و گلدهی مناسب نیاز به یک دوره سرمایی دارد. این آزمایش به‌منظور بررسی تأثیر سرمادهی بر تغییرات هیستولوژیکی مریستم انتهایی و همچنین تغییرات تنظیم‌کننده‌های رشد درون‌زای آبسیزیک اسید (ABA)، ایندول استیک اسید (IAA) و قند کل در خلال بهاره سازی پیاز سوسن چلچراغ صورت پذیرفت. برای این منظور، پیازها به مدت ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز در دمای ۱ یا ۷°C قرار گرفتند. نتایج آزمایش‌های هیستولوژیکی نشان داد که دمای ۱°C نسبت به ۷°C تغییرات تکاملی نسبتاً سریع‌تری را در مریستم انتهایی درون پیاز ایجاد نمود. دمای ۱°C به مدت ۱۲۰ روز سبب کاهش میزان ABA درون‌زا در سوسن چلچراغ شد، اما دمای ۷°C در همین مدت سبب افزایش جزی در سطح این هورمون شد. سطوح IAA و قند کل در دمای ۱°C افزایش یافتند درحالی‌که در ۷°C در طول مدت انبار تقریباً ثابت باقی ماندند. بزرگی تغییرات هورمون‌ها و قند کل اندازه‌گیری شده در دمای ۱°C بیشتر از ۷°C ارزیابی شد. تیمار ۱°C به مدت ۱۲۰ روز به لحاظ داشتن کمترین سطح از ABA و بیشترین سطح از IAA و قند کل در شکستن خواب پیازهای سوسن چلچراغ می‌تواند حائز اهمیت باشد.

کلمات کلیدی: بهاره سازی، سوسن، قند کل، مریستم، هورمون.

مقدمه

سوسن چلچراغ (*Lilium ledebourii*) یک‌گونه کمیاب و مقاوم به سرماست که همانند اغلب پیازها جهت رشد مناسب نیاز به یک دوره سرمایی دارد (میرزاخانی و همکاران، ۱۳۸۹). اغلب پیازها در جنس سوسن برای زنده ماندن در شرایط نامساعد محیطی وارد یک دوره خواب می‌شوند. در این پیازها خواب به‌وسیله یک دوره از دماهای پایین از بین می‌رود (Langens-Gerrits *et al.*, 2003). روش‌های شکستن خواب اغلب پیچیده هستند و قابل‌انتقال از گونه‌ای به گونه دیگر نمی‌باشند، اما عامل کلیدی درکشت و تجاری‌سازی ژئوفیت های جدید تعیین نیازهای سرمایی آن‌هاست (Dole, 2003). به‌طورکلی فرض می‌شود که انبار پیازها در دمای پایین سبب افزایش تشویق‌کننده‌ها و کاهش بازدارنده‌های رشد می‌شود که به جوانه‌زنی سریع شاخساره می‌انجامد (Wang and Roberts, 1970). گزارش‌شده است که مقادیر درونی آبسیزیک اسید (ABA) در پیازها با شروع و اتمام خواب ارتباط دارد (Xu *et al.*, 2006). هرچند به‌طورمعمول ژئوفیتها نسبت به دماهای پایین واکنش‌های متفاوتی بروز می‌دهند و جهت تعیین نیازهای هرگونه لازم است مطالعات خاص آن‌گونه به‌دقت انجام شود (Dole, 2003). از دیگر تغییرات مهم بیوشیمیایی رخ‌داده در پیازها در طول دماهای پایین، تغییرات در کربوهیدرات‌هاست. در طول تیمارهای سرمایی مواد ذخیره قندی متحرک شده و به‌عنوان منبع انرژی برای مریستم در حال رشد مصرف می‌شوند (Langens-Gerrits *et al.*, 2003). گزارش‌شده است که متابولیسم قندها کاملاً به پدیده خواب و جوانه‌زنی مربوط می‌شود (Aguettaz *et al.*, 1990). بررسی‌ها نشان می‌دهد که علاوه بر رویدادهای فیزیولوژیکی، تغییرات مورفولوژیکی مانند تمایز یابی گل و اندام‌زایی در بسیاری از پیازها در طول دوره خواب رخ می‌دهد و دماهای پایین در توسعه و تکامل جوانه درونی پیازها نقش دارند (Kamenetsky and Rabinowitch, 2002).

بنابراین، اهداف تحقیق بر اساس مطالعه تغییرات مریستم درون پیاز و همچنین تغییرات سطوح درون‌زای ABA، IAA و قند کل در خلال بهاره‌سازی در پیاز سوسن چلچراغ شکل گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

پیازهای سوسن چلچراغ پس از گلدهی در اواخر خردادماه از منطقه شاهکوه واقع در شهرستان چالوس و پس از اخذ مجوزهای لازم جمع‌آوری شدند. پیازها با محیط پیرامون یکسان (۲۰–۲۴cm) داخل کوکوپیت مرطوب بسته‌بندی‌شده و به مدت ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز در دمای ۱ یا ۷°C سرمادهی شدند.

مشاهدات هیستولوژیکی

در این آزمایش در هر مرحله از زمان انبار تعدادی پیاز به‌طور تصادفی انتخاب و جوانه درونی جدا و برش طولی داده شد و توسط میکروسکوپ نوری مدل Leica Gaien III مجهز به دوربین WV-CP230 Panasonic مشاهده شدند.

استخراج و خالص‌سازی آبسیزیک اسید و ایندول استیک اسید

استخراج و خالص‌سازی آبسیزیک اسید و ایندول استیک اسید بر اساس روش کیم و کیم (۲۰۰۵) انجام شد. ستون سی ۱۸ دیامونسیک و ستون سی ۱۸ هیگ سیل (قطر داخلی ۵ میکرومتر، قطر خارجی ۴/۶ میلی متر و طول ۲۵ سانتی‌متر) به ترتیب جهت جداسازی ABA و IAA در دستگاه HPLCمدل Unicam-Crystal-200UK استفاده شدند.

استخراج و اندازه‌گیری قند کل

اندازه‌گیری میزان قند کل به‌وسیله آنترون و طبق روش مک کریدی و همکاران (۱۹۵۰) انجام شد.

آنالیز آماری داده‌ها

در این مطالعه تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند. داده‌ها با نرم‌افزار Mstat-c مورد تجزیه آماری قرار گرفتند و میانگین‌ها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از بررسی‌های هیستولوژیکی

بررسی مریستم انتهایی جوانه درون پیاز نشان داد که دمای پایین انباری سبب رشد و تکامل مریستم در طول مدت انبار شد. مطابق آنچه در شکل ۱(A, A′) مشهود است، در ابتدای آزمایش که پیازها تیمار سرمایی دریافت نکردند، مریستم دارای سر پهن و بدون لایه تمایزیافته می‌باشد که توسط پریموردیای برگی احاطه‌شده است. به‌موازات دریافت تیمار سرمایی از حالت ابتدایی تغییر شکل یافته و گنبدی می‌شود. این نوع از تغییر شکل در تمام جنس‌های پیازدار قابل‌مشاهده است (Rees, 1992). در طی روزهای ۶۰ و ۹۰ از هر دو دمای انباری تمایز و تکامل بیشتر مریستم مشاهده می‌شود. مطابق شکل ۱، به نظر می‌رسد سرعت تغییرات تکاملی مریستم در ۱°C بیشتر از ۷°C می‌باشد. شدت این تغییرات رابطه مستقیمی با تقسیم و بزرگ شدن سلولی دارد که به‌نوبه خود به عواملی مانند هورمون‌های درون‌زا و ذخایر قندی بستگی دارد. تغییرات تکاملی سریع‌تر مریستم در ۱°C می‌تواند با تجمع بیشتر قند کل در ۱°C نسبت به ۷°C مشاهده‌شده در شکل ۲–ج، همبستگی داشته باشد.

تغییرات هورمون‌های درون‌زا و قند کل

نتایج نشان داد که انبار نمودن پیازها در دمای ۱°C به مدت ۱۲۰ روز توانست سطح ABA درون‌زا را کاهش دهد اما در تیمار دمایی ۷°C در مدت‌زمان مشابه افزایش جزی در سطح ABA مشاهده شد (شکل ۲–الف). زو و همکاران (۲۰۰۶) نیز کاهش سطح ABA درون‌زا در *Lilium rubellum* را در طول تیمار سرمایی گزارش کردند. آنها اشاره کردند که همبستگی کاملی بین کاهش سطح ABA و شکستن خواب در پیازها وجود دارد؛ بنابراین کاهش معنی‌دار سطح ABA در تیمار دمایی ۱°C در روز ۱۲۰ انبار می‌تواند بر اتمام خواب پیازهای سوسن چلچراغ دلالت کند.

مطابق شکل ۲-الف، سطح ABA تا روز ۳۰ از انبار سرد ۱°C روند افزایشی داشته و پس‌ازآن تا پایان دوره آزمایش کاهش پیدا کرد. در ۷°C تا روز ۹۰ انبار سطح ABA رو به افزایش و پس‌ازآن رو به کاهش گذاشت. این تغییرات افزایشی و سپس کاهشی در سطح ABA در مطابقت بامطالعه نی و همکاران (۲۰۱۶) است که افزایش سطح ABA در ۱۵ روز اول تیمار سرمایی ۲°C و سپس کاهش آن تا پایان آزمایش در مارچوبه را گزارش نمودند. این افزایش اولیه در سطح ABA می‌تواند نوعی سازگاری با شرایط تنش باشد. گزارش‌شده است که ABA میتواند تحت تنش سرمایی تولید پروتئین‌هایی را القا نماید که بر سازگاری با شرایط تنش اثر می‌گذارند (Taiz and Zeiger, 2012).

مطابق نتایج ارائه‌شده در شکل ۲-ب، تیمار دمایی ۱°C سبب افزایش در سطح *IAA*درون‌زا شد و بیشترین سطح آن در روز ۱۲۰ انبار مشاهده شد، درحالی‌که در پیازهای تیمار شده با ۷°C سطح IAA تقریباً ثابت باقی ماند. افزایش در سطح IAA در طول تیمار سرمایی توسط میرزاخانی و همکاران (۱۳۸۹) در پیاز هیبرید *LA*سوسن رقم سب دازل نیز گزارش‌شده است. چنین تغییراتی دلالت بر اتمام خواب و آماده شدن پیاز جهت تولید ساقه گل دهنده و گلدهی دارند (میرزاخانی و نادری، ۱۳۸۹).

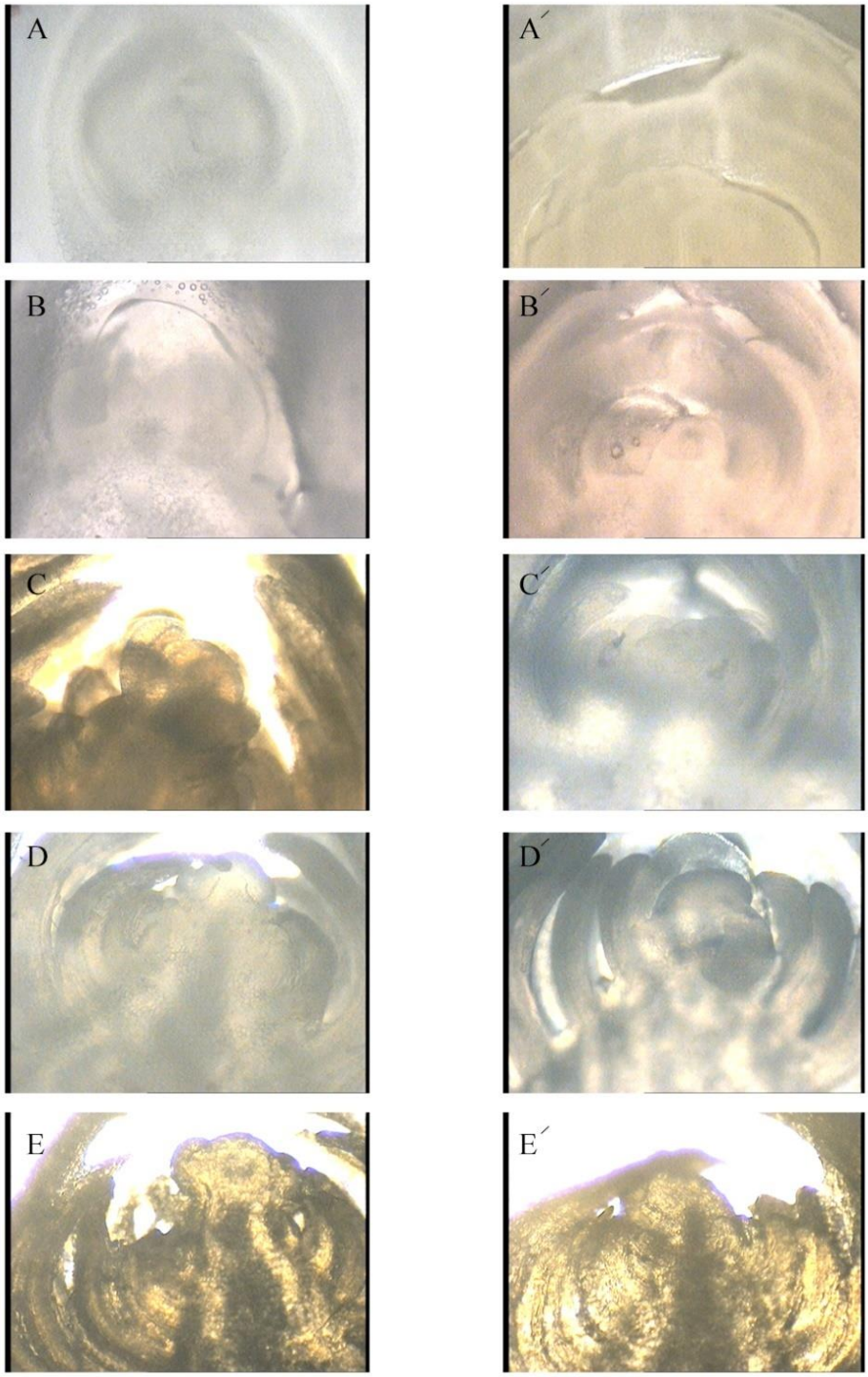
نتایج شکل ۲ نشان می‌دهد که روند تغییرات IAA متضاد تغییرات *ABA*می‌باشد. این تقابل بین ABA و سایر هورمون‌ها به‌عنوان بخشی از فرایندهایی است که در آن خواب جوانه از طریق تعادل بین بازدارنده‌های رشد و تحریک‌کننده‌های رشد تنظیم می‌شود (Taiz and Zeiger, 2012) و درواقع تاثیر توأمان کاهش ABA و افزایش IAA در شکسته شدن خواب پیازها دخالت دارد (میرزاخانی و همکاران، ۱۳۸۹).

بر اساس نتایج شکل ۲-ج، غلظت قند کل در تیمار دمایی ۱°C افزایش یافت، اما در تیمار دمایی ۷°C پس از یک‌روند افزایشی جزئی، کاهش در مقدار قند کل در پایان آزمایش مشاهده شد.

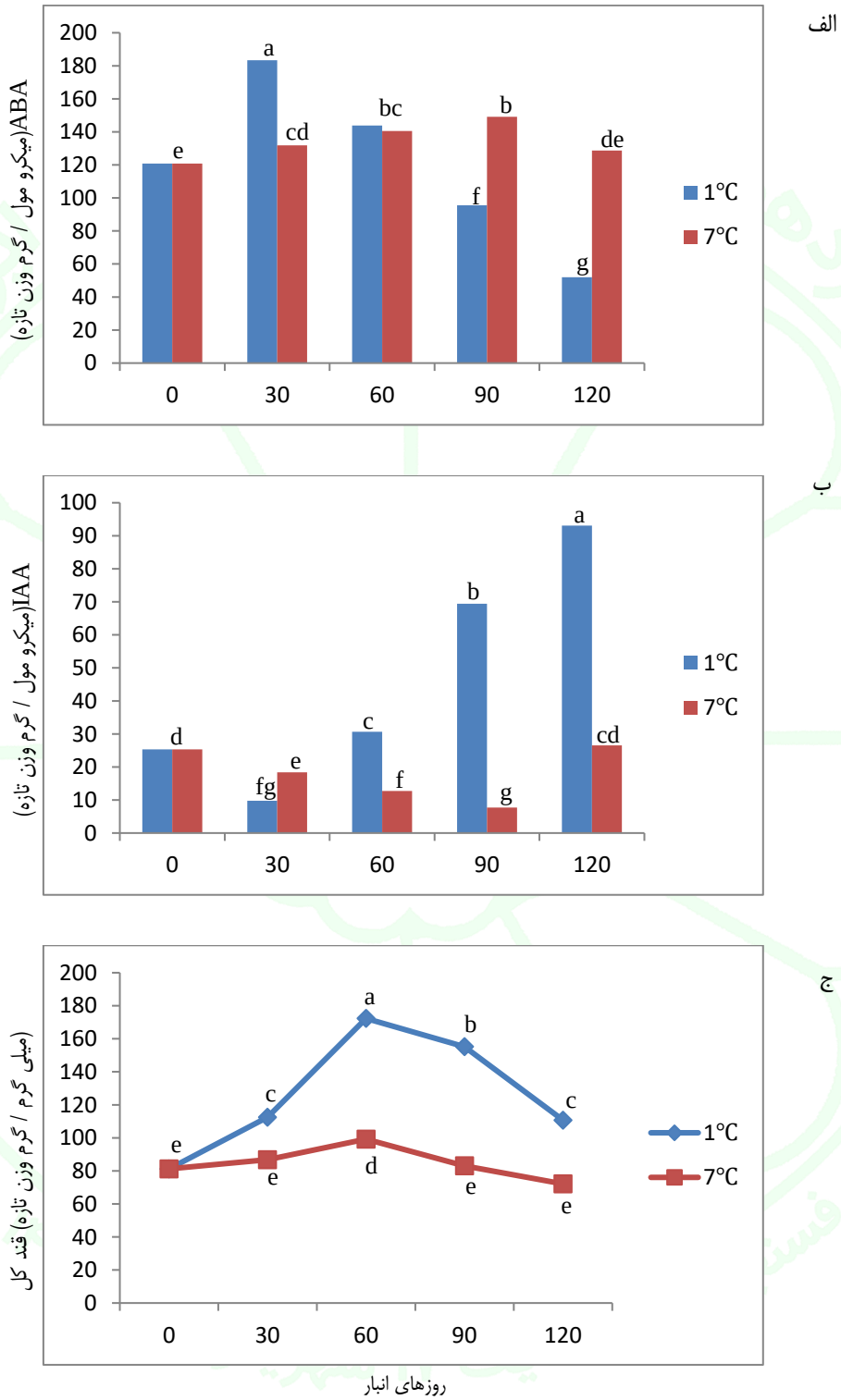
افزایش در غلظت قند کل در طول دماهای پایین در پیازچه‌های سوسن باززایی شده به روش درون شیشه‌ای گزارش‌شده است. وقتی‌که پیازها در دمای پایین انبار می‌شوند نشاسته درون آنها شکسته شده و تجمعی از ساکارز و قندهای کاهشی ایجاد می‌شود (Langens-Gerrits *et al.*, 2003).

همان‌طور که در شکل ۲-ج مشخص است پس از یک غلظت حداکثری در مقدار قند کل در روز ۶۰ از هر دو دمای ۱ و ۷°C، کاهش سطح آن تا پایان آزمایش مشاهده می‌شود. در این راستا گزارش‌شده است که در آغاز شرایط سرما قندهای محلول در جهت افزایش سازگاری با تنش سرمایی شروع به افزایش می‌کنند، سپس درشدت سرمای کامل به اوج خود می‌رسند و پس‌ازآن در اثر مصرف در فرایندهای تنفسی کاهش می‌یابند (Mornya & Cheng, 2013).

در پایان، به نظر می‌رسد خواب در پیازهای سوسن به سطوح بالای ABA مربوط باشد که طی تیمار سرمایی ۱°C به مدت ۱۲۰ روز غلظت این ماده به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد. افزایش سطح IAA و همچنین قند کل در پایان تیمار سرمایی ۱°C به مدت ۱۲۰ روز نیز نشان‌دهنده پایان خواب و آمادگی پیاز جهت جوانه‌زنی می‌باشد. به نظر می‌رسد این تیمار، تیمار مناسبی جهت بهاره سازی و شکستن خواب پیاز سوسن چلچراغ باشد. هرچند عوامل شناخته‌شده و ناشناخته بسیاری وجود دارند که در آزادسازی خواب ژئوفیتها مداخله می‌کنند.



شکل ۱- برش طولی از مریستم انتهایی سوسن چلچراغ: A، B، C، D و E مریستم انتهایی پیاز تیمار شده در دمای ۱°C و 'A، 'B، 'C، 'D و 'E مریستم انتهایی پیاز تیمار شده در دمای ۷°C به ترتیب به مدت ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز. (X - 100 500µm).



شکل ۲- تغییرات مقادیر درون‌زای آبسیزیک اسید (ABA)، ایندول استیک اسید (IAA) و قند کل در پیاز سوسن چلچراغ در دمای ۱ و ۷ درجه سانتی‌گراد در مدت ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز انبار سرد.

حروف غیرمشترک اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهند.

منابع

میرزاخانی، ع.، نادری، ر؛ و پاداشت، م. ۱۳۸۹. بررسی برخی تغییرات فیزیولوژیک در خلال بهاره سازی و تکثیر از طریق فلس برداری هیبرید LAلیلیوم رقم Ceb Dazzle و سوسن چلچراغ. پایان نامه دکترا در رشته علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

Aguettaz, P., Paffen, A., Delvallee, I., Linde, P.V.D., Klerk, G.J.D. 1990. The development of dormancy in bulblet of *Lilium speciosum* generated *in vitro* the effect of culture conditions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 22:167-172.

Dole, J.M. 2003. Research approaches for determining cold requirements for forcing and flowering of geophytes. HortScience, 38(3): 341-346.

Kamenetsky, R. and Rabinowitch, H.D. 2002. Florogenesis. In: *Allium* crop science: Recent advances, Rabinowitch, H.D., Currah, L. (ED). CAB International, Wallingford, UK.

Kim, K.J. and Kim, K.S. 2005. Changes of endogenous growth substances during bulb maturation after flowering in *Lilium* oriental hybrid 'Casa Blanca'. Acta Horticulturae, 673: 661-667.

Langens – Gerrits, M.M., Miller, W.B.M., Croes, A.F., Klerk, G.J.D. 2003. Effect of low temperature on dormancy breaking and growth after planting in lily bulblets regenerated *in vitro*. Plant Growth Regulation, 40: 267-275.

Mc Cready, R.M., Guggolz, J., Silviera, V., Owens, H.S. 1950. Determination of starch and amylase in vegetables. Analytical Chemistry, 22: 1156-1158.

Mornya, P.M.P. and Cheng, F. 2013. Seasonal changes in endogenous hormone and sugar contents during bud dormancy in tree peony. Journal of Applied Horticulture, 15(3): 159-165.

Nie, L.C., Chen, Y.H., Liu, M. 2016. Effect of low temperature and chilling duration on bud break and changes of endogenous hormones of asparagus. European Journal of Horticultural Science, 81(1):22-26.

Rees, A.R. 1992. Ornamental Bulbs, Corms and Tubers. CAB International, Oxon, UK.

Taiz, L. and Zeiger, E. 2012. Plant physiology. Fifth ed., Sinauer Associates Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts U.S.A.

Wang, S.Y. and Roberts, A.N. 1970. Physiology of dormancy in *Lilium longiflorum* Thunb. Journal of the American Society for Horticultural science, 95: 554-558.

Xu, R.Y., Nimii, Y., Han, D.S. 2006. Changes in endogenous abscisic acid and soluble sugars levels during dormancy release in bulbs of *Lilium rubellum*. Scientia Horticulturae, 111: 68- 72.

Study of Histological and Metabolic Changes during Vernalization of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss. Bulbs

Fatemeh Abazarifard[1], Rohangiz Naderi[2], Najmmaddin Mortazavi[*3], Sepideh Kalatejari[1]
[1] Department of Horticultural Sciences, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Science & Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran
[3] Department of Horticultural Sciences, College of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
**Corresponding Author: mortazavi46@gmail.com*

Abstract

Lilium ledebourii is an endangered rare species endemic to Iran with a high potential to be introduced and released in both domestic and global markets. This species needs a chilling period for proper growth and flowering. This experiment was performed to investigate the effects of cold storage on histological changes and variations of endogenous abscisic acid (ABA), indole-3-acetic acid (IAA), and total sugar during vernalization of *Lilium ledebourii* bulbs. In this experiment, the bulbs of lily were stored at 1 or 7℃, for 0, 30, 60, 90, and 120 days, and after each period removed from storage and analyzed. Histological examination showed that, meristem development was relatively faster at 1℃ than at 7℃. Cold storage at 1℃ decreased the levels of ABA while, 7℃ in the same duration increased its content slightly. The levels of IAA increased at 1℃ but remained almost constant at 7℃. Cold treatments showed that, total sugar concentration increased at 1℃, while 7℃ caused decrease in its content. The magnitude of changes in hormones and total sugar measured at 1℃ was greater than that at 7℃. It seems that, storage at 1℃ for 120 days by inducing the maximum contents of IAA and total sugar and the lowest level of ABA, is an appropriate treatment for dormancy release of *Lilium ledebourii* bulbs.

***Keywords*:** Hormone, *Lilium*, Meristem, Total sugar, Vernalization.